



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



**CARACTERIZAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E APLICAÇÃO DAS LIPASES
DE *Candida rugosa* E *Geotrichum candidum* PRODUZIDAS EM
MEIO CONTENDO MELAÇO DE SOJA**

WILSON GALVÃO DE MORAIS JÚNIOR

Uberlândia - MG
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



**CARACTERIZAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E APLICAÇÃO DAS LIPASES
DE *Candida rugosa* E *Geotrichum candidum* PRODUZIDAS EM
MEIO CONTENDO MELAÇO DE SOJA**

Wilson Galvão de Moraes Júnior

Orientador: Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Miriam Maria de Resende

Orientador no exterior: Dr. Benevides Costa Pessela

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Uberlândia - MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M827c Morais Júnior, Wilson Galvão de, 1984-
2016 Caracterização, imobilização e aplicação das lipases de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* produzidas em meio contendo melaço de soja / Wilson Galvão de Morais Júnior. - 2016.
107 f. : il.

Orientadores: Eloízio Júlio Ribeiro, Benevides Costa Pessela.

Coorientadora: Miriam Maria de Resende.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Lipase - Teses. 3. Ácidos graxos Omega-3 - Teses. 4. Hidrólise - Teses. I. Ribeiro, Eloízio Júlio, 1957- II. Costa Pessela, Benevides. III. Resende, Miriam Maria de. IV. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

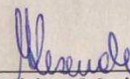
CDU: 66.0

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 16 DE DEZEMBRO DE 2016.

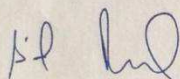
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
Orientador (FEQ/UFU)



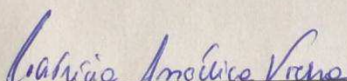
Profª. Dra. Miriam Maria de Resende
Co-orientadora (FEQ/UFU)



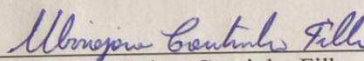
Prof. Dr. Benevides Costa Pessela
Co-orientador - PDSE (CIAL/CSIC)



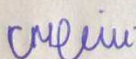
Profª. Dra. Larissa N. S. S Falleiros
(FEQ/UFU)



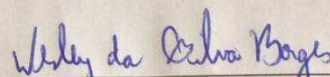
Profª. Dra. Patrícia Angélica Vieira
(FEQ/UFU)



Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
(FEQ/UFU)



Profª. Dra. Carolina Merheb Dini
(ICTE/UFTM)



Prof. Dr. Wesley da Silva Borges
(ILES/ULBRA)

Agradecimentos

Aos meus pais, meus heróis, sou-lhes grato por todo apoio, carinho e esforço dedicados para o meu engrandecimento como pessoa.

Ao meu irmão, minha cunhada, minhas tias e meus avós, que muito me apoiaram e incentivaram nesta caminhada.

Ao professor Dr. Benevides Costa Pessela, pela supervisão e parceria no desenvolvimento deste trabalho, por me receber de braços abertos em seu laboratório em Madri e disponibilizar todo material e equipamento necessários para o desenvolvimento da pesquisa, pela disponibilidade irrestrita, por me animar diante de resultados aparentemente ruins, pela confiança em meu trabalho, por todo o conhecimento transferido, pela sabedoria e amizade.

Aos professores doutores Eloízio Júlio Ribeiro e Miriam Maria de Resende pelo incentivo em buscar novas parcerias e apoio durante o estágio realizado na Espanha, empenho, paciência, estímulo e dedicação.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições.

A todos os amigos que conquistei nesse caminho, que já deixam saudades, mas que serão levados comigo por onde for. Thályta, Sueli, Lia, César, Afonso, Lara Trobo, Dani Turati, Lígia, Lívia, Eliane, Rosana, Michele Paludo e aos meus amigos hermanos da Calle San Bernardo Rahma Garcia e Emil Thyssen muito obrigado pela paciência e grande amizade com que sempre me ouviram e sensatez com que sempre me ajudaram. Pela diversão, aprendizado e convivência, que muito me estimularam nessa jornada, principalmente no tempo em que passamos juntos em Madri.

À Dra Glória Fernández-Lorente e Sonia Moreno-Pérez, por todo acolhimento e ajuda no laboratório, sempre extremamente solícitas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante o doutorado e pelo projeto BEX 14174/13-8 do “Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE)”.

Também sou grato a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me deram oportunidades, confiaram em mim, me incentivaram a lutar pelos meus ideais e me acompanharam.

Agradeço, por fim, a Deus, por abençoar e iluminar todas as oportunidades que me são dadas.

Dedico este trabalho aos meus pais
Fátima e Wilson, ao meu irmão Bruno,
aos meus avós e às minhas tias.

Muito obrigado à todos

*Around here, however, we don't look backwards for very long.
We keep moving forward, opening up new doors and
doing new things, because we're curious...
and curiosity keeps leading us down new paths.*
(Walt Disney)

[Por aqui, no entanto, não olhamos para trás por muito tempo.
Nós continuamos avançando, abrindo novas portas e
fazendo coisas novas, porque somos curiosos...
e curiosidade sempre nos conduz a novos caminhos.]

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iv
Lista de Símbolos	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Lipases	5
2.1.1. Lipases de origem microbiana	6
2.1.1.1. Lipases de <i>Geotrichum candidum</i>	7
2.1.1.2. Lipases de <i>Candida rugosa</i>	8
2.1.2. Reações Catalisadas por Lipases	9
2.2. Imobilização enzimática	10
2.2.1. Método de imobilização enzimática	11
2.2.1.1. Ligação Química	12
2.2.1.1.1. Adsorção	12
2.2.1.1.2. Ligação iônica	13
2.2.1.1.3. Ligação covalente	15
2.2.1.2. Retenção física	17
2.2.2. Imobilização de lipases	18
2.3. Aplicação de lipases imobilizadas	20
2.4. Resolução de misturas racêmicas - Enantiosseletividade	23
2.5. Ácidos polinsaturados (PUFA) Omega-3	24
CAPÍTULO 3	28
MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Enzimas	28
3.1.1. Preparação das lipases	29
3.1.2. Purificação das lipases	29
3.2. Metodologia analítica	28
3.2.1. Atividade de lipase e Concentração de proteínas	30
3.3. Caracterização das lipases produzidas	31
3.3.1. Determinação da massa molecular por SDS-PAGE	31
3.3.2. Identificação da proteína por espectrometria de massa - Proteômica	32
3.4. Efeito da temperatura e do pH na estabilidade enzimática	32
3.5. Efeito inibidor do EDTA, detergente e dos íons metálicos	33
3.6. Determinação dos parâmetros cinéticos aparentes (K_m e $V_{máx}$)	34
3.7. Estudo da imobilização das lipases	34
3.7.1. Suportes	34
3.7.2. Preparação e ativação dos suportes	35
3.7.2.1. Octil-Sefarose 4BCL, Dietilaminoetanol-Sefarose (DEAE), Carboximetil agarose e Sulfopropil agarose	35
3.7.2.2. Bromocianógeno agarose ativado (CNBr)	35
3.7.2.3. Monoaminoetil-N-etil agarose (MANAE)	35
3.7.2.4. Amino-glioxil agarose (AMG)	36
3.7.3. Procedimentos de imobilização	36

3.7.4. Aaminação química das lipases	37
3.7.5. Caracterização dos derivados imobilizados	37
3.7.5.1. Efeito do pH.....	37
3.7.5.2. Efeito da temperatura.....	38
3.4.5.3. Estabilidade em solventes orgânicos	38
3.8. Aplicação das lipases de <i>Candida rugosa</i> e <i>Geotrichum candidum</i> e seus derivados imobilizados na produção de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) Omega-3	39
3.8.1. Hidrólise do óleo de sardinha	39
3.8.2. Análise da produção de PUFA Omega-3.....	39
3.9. Teste da enantiosseletividade com os derivados imobilizados selecionados	40
3.10. Reprodutibilidade dos dados experimentais	40
CAPÍTULO 4	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Purificação das lipases de <i>C. rugosa</i> e <i>G. candidum</i> produzidas em melão de soja....	41
4.2. Caracterização das lipases de <i>C. rugosa</i> e <i>G. candidum</i>	42
4.2.1. Determinação da massa molecular	42
4.2.2. Identificação das lipases	43
4.2.3. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade enzimática.....	43
4.2.3.1. Influência de temperatura	43
4.2.3.2. Influência do pH	47
4.2.4. Efeito dos inibidores EDTA, detergente Triton X-100 e de íons metálicos.....	48
4.2.5. Determinação dos parâmetros cinéticos aparentes (Km e Vmáx)	50
4.3. Estudo da Imobilização das lipases	52
4.3.1. Imobilização das lipases de <i>C. rugosa</i> e <i>G. candidum</i> em diferentes suportes ..	52
4.3.2. Caracterização dos derivados imobilizados.....	54
4.3.2.1. Efeito do pH.....	54
4.3.2.2. Efeito da temperatura.....	56
4.3.2.3. Estabilidade em solventes orgânicos	66
4.4. Aplicação das lipases de <i>C. rugosa</i> e <i>G. candidum</i> e seus derivados imobilizados na produção de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) Omega-3.....	70
4.4.1. Determinação das concentrações dos ácidos graxos do óleo de sardinha	70
4.4.2. Produção de PUFA Omega-3	71
4.5. Hidrólise enantiosseletiva do (R,S) ácido mandélico etil éster por lipase de <i>C. rugosa</i> e <i>G. candidum</i> imobilizadas em diferentes suportes	74
CAPÍTULO 5	78
CONCLUSÕES	78
CAPÍTULO 6	81
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
APÊNDICE A	105
DOSAGEM DE PROTEÍNA	105
APÊNDICE B.....	107
CONCENTRAÇÕES DE EPA E DHA	107

Lista de Figuras

Figura 2.1 – Reações catalisadas por lipases (PAQUES & MACEDO, 2006)	9
Figura 2.2 – Principais técnicas de imobilização de enzimas (adaptado de JEGANNATHAN <i>et al.</i> , 2008)	11
Figura 2.3 – Esquema ilustrativo da interação enzima-suporte resultante da imobilização por adsorção em Octil-Sefarose, que liga à enzima através de interações hidrofóbicas	13
Figura 2.4 – Esquema ilustrativo da interação enzima-suporte resultante da imobilização por ligação iônica em suportes aniônicos: (a) MANAE-agarose; (b) DEAE-agarose, onde cada suporte é carregado positivamente e se liga à porção da enzima carregada negativamente	14
Figura 2.5 – Esquema ilustrativo da interação enzima-suporte resultante da imobilização por ligação iônica em suportes catiônicos. (a) carboximetil-agarose; (b) sulfopropil-agarose, onde o suporte é carregado negativamente e se liga à porção da enzima carregada positivamente.....	14
Figura 2.6 – Esquema ilustrativo da técnica de aminação química das lipases de <i>C. rugosa</i> e <i>G. candidum</i>	15
Figura 2.7 – Esquema ilustrativo da interação enzima-suporte resultante da imobilização covalente unipontual em suporte CNBr agarose	16
Figura 2.8 – Esquema ilustrativo da interação enzima-suporte resultante da imobilização covalente multipontual em suporte heterofuncional Amino-Glioxil agarose	17
Figura 2.9 – Mecanismo geral de imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos (FERNÁNDEZ-LORENTE <i>et al.</i> , 2011)	19
Figura 2.10 – Simetria das reações de hidrólise e transesterificação catalisadas por lipase de <i>Pseudo-monas cepacia</i> (PSL) proposta por Kazlauskas <i>et al.</i> (1991). (P: grupo pequeno; G: grupo grande)	26
Figura 3.1 – Hidrólise do substrato sintético <i>p</i> -nitrofenil butirato catalisada por lipase	30
Figura 4.1 – Perfil de eletroforese em SDS-PAGE (5-12%) das lipases de <i>C. rugosa</i> e <i>G. candidum</i> . LMW: padrões de massas moleculares: fosforilase B (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lactalbumina (14,4 kDa); (CRLc) lipase comercial de <i>C. rugosa</i> ; (CRL) amostra do caldo enzimático da lipase produzida por <i>C. rugosa</i> ; (GCL) amostra do caldo enzimático da lipase produzida por <i>G. candidum</i>	42

Figura 4.2 – Efeito da temperatura na estabilidade enzimática das lipases em diferentes temperaturas: (■) 30°C, (●) 40°C, (▲) 50°C e (▼) 60°C; (a) lipase de <i>C. rugosa</i> ; (b) lipase de <i>G. candidum</i>	44
Figura 4.3 – Efeito do pH na estabilidade enzimática das lipases de <i>C. rugosa</i> e <i>G. candidum</i>	47
Figura 4.4 – Curvas da cinética de Michaelis-Menten das lipases reagindo com diferentes concentrações de substrato <i>p</i> -NPB. (a) <i>C. rugosa</i> ; (b) <i>G. candidum</i>	49
Figura 4.5 – Efeito das diferentes concentrações de substrato <i>p</i> -NPB na atividade de lipase. (a) <i>G. candidum</i> ; (b) <i>C. rugosa</i>	51
Figura 4.6 – Efeito do pH na estabilidade enzimática da lipase de <i>C. rugosa</i> imobilizada em diferentes suportes	54
Figura 4.7 – Efeito do pH na estabilidade enzimática da lipase de <i>G. candidum</i> imobilizada em diferentes suportes	55
Figura 4.8 – Efeito da temperatura na estabilidade enzimática das lipases imobilizadas em diferentes suportes. (a) <i>C. rugosa</i> ; (b) <i>G. candidum</i> . Os experimentos foram realizados à 30°C em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0. (■) Octil; (●) CNBr; (▲) MANAE; (◆) DEAE; (□) Carboximetil; (○) Sulfopropil, (Δ) AMG	57
Figura 4.9 – Efeito da temperatura na estabilidade enzimática das lipases imobilizadas em diferentes suportes. (a) <i>C. rugosa</i> ; (b) <i>G. candidum</i> . Os experimentos foram realizados à 40°C em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0. (■) Octil; (●) CNBr; (▲) MANAE; (◆) DEAE; (□) Carboximetil; (○) Sulfopropil, (Δ) AMG	58
Figura 4.10 – Efeito da temperatura na estabilidade enzimática das lipases imobilizadas em diferentes suportes. (a) <i>C. rugosa</i> ; (b) <i>G. candidum</i> . Os experimentos foram realizados à 50°C em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0. (■) Octil; (●) CNBr; (▲) MANAE; (◆) DEAE; (□) Carboximetil; (○) Sulfopropil, (Δ) AMG	58
Figura 4.11 – Estabilidade dos derivados imobilizados na presença de metanol. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato de sódio 25mM, pH 7,0 à 25 ± 1°C com solução de metanol 50% (v/v). (a) <i>C. rugosa</i> ; (b) <i>G. candidum</i> . (■) Enzima solúvel; (●) Octil; (▲) CNBr; (◆) MANAE; (□) DEAE; (○) Carboximetil; (Δ) Sulfopropil; (◇) AMG	67
Figura 4.12 – Estabilidade dos derivados imobilizados na presença de propanol. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato de sódio 25mM, pH 7,0 à 25 ± 1°C com solução de propanol 50% (v/v). (a) <i>C. rugosa</i> ; (b) <i>G. candidum</i> . (■) Enzima solúvel; (●) Octil; (▲) CNBr; (◆) MANAE; (□) DEAE; (○) Carboximetil; (Δ) Sulfopropil; (◇) AMG	68

Figura 4.13 – Estabilidade dos derivados imobilizados na presença de ciclohexano. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato de sódio 25mM, pH 7,0 à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ com solução de ciclohexano 50% (v/v). (a) *C. rugosa*; (b) *G. candidum*. (■) Enzima solúvel; (●) Octil; (▲) CNBr; (◆) MANAE; (□) DEAE; (○) Carboximetil; (Δ) Sulfopropil; (◇) AMG69

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Imobilização de lipases em diferentes suportes e métodos	20
Tabela 2.2 – Aplicações industriais de lipases	22
Tabela 4.1 – Purificação das lipases de <i>C. rugosa</i> e <i>G. candidum</i>	41
Tabela 4.2 – Parâmetros cinéticos das lipases solúveis calculados pela equação de desativação térmica de 1ª ordem linearizada (Equação 3.2) – Estabilidade térmica	45
Tabela 4.3 – Parâmetros cinéticos das lipases solúveis calculados pela equação de desativação térmica de 1ª ordem não-linearizada (Equação 3.3) – Estabilidade térmica	45
Tabela 4.4 – Efeito do reagente EDTA, detergente Triton X-100 em diferentes concentrações e dos íons metálicos na atividade de lipases de <i>C. rugosa</i> e <i>G. candidum</i>	49
Tabela 4.5 – Imobilização das lipases de <i>C. rugosa</i> e <i>G. candidum</i> em diferentes suportes ...	52
Tabela 4.6 – Parâmetros cinéticos da lipase de <i>C. rugosa</i> imobilizada em diferentes suportes calculados pela equação de desativação térmica de 1ª ordem linearizada (Equação 3.2) – Estabilidade térmica.....	60
Tabela 4.7 – Parâmetros cinéticos da lipase de <i>C. rugosa</i> imobilizada em diferentes suportes calculados pela equação de desativação térmica de 1ª ordem não-linearizada (Equação 3.3) – Estabilidade térmica.....	61
Tabela 4.8 – Parâmetros cinéticos da lipase de <i>G. candidum</i> imobilizada em diferentes suportes calculados pela equação de desativação térmica de 1ª ordem linearizada (Equação 3.2) – Estabilidade térmica	63
Tabela 4.9 – Parâmetros cinéticos da lipase de <i>G. candidum</i> imobilizada em diferentes suportes calculados pela equação de desativação térmica de 1ª ordem não-linearizada (Equação 3.3) – Estabilidade térmica	64
Tabela 4.10 – Respostas do detector UV (area do pico e tempo de retenção) dos diferentes ácidos graxos separados por sistema HPLC	71
Tabela 4.11 – Hidrólise do óleo de sardinha em sistema bifásico orgânico-aquoso pH 7 à 37 °C catalisada pela lipase de <i>C. rugosa</i> e seus derivados imobilizados em diferentes suportes.....	72
Tabela 4.12 – Hidrólise do óleo de sardinha em sistema bifásico orgânico-aquoso pH 7 à 37 °C catalisada pela lipase de <i>G. candidum</i> e seus derivados imobilizados em diferentes suportes.....	73
Tabela 4.13 – Hidrólise enantiosseletiva do (<i>R,S</i>) – ácido mandélico catalisada pelos derivados imobilizados da lipase de <i>C. rugosa</i>	75

Tabela 4.14 – Hidrólise enantiosseletiva do (<i>R,S</i>) – ácido mandélico catalisada pelos derivados imobilizados da lipase de <i>G. candidum</i>	76
--	----

Lista de Símbolos

CRL	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
GCL	Lipase de <i>Geotrichum candidum</i>
<i>p</i> -NPB	<i>para</i> -Nitrofenil Butirato
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sódio – PoliAcrilamida Gel de Eletroforese
K_m	Constante de Michaelis
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidade máxima de reação
K_d	Constante de inativação térmica
EDTA	Etileno-Diamino Tetra Acético
CNBr	Bromocianógeno ativado
DEAE	Dietilamino Etanol
MANAE	Monoamino-N-Etil
AMG	Amino glioxil agarose
EDAC	Carbodiimida
PUFA	Ácido graxo poli-insaturado
EPA	Ácido Ecoisapentanóico
DHA	Ácido Docosahexanóico
R^2	Coefficiente de determinação

Resumo

Lipases são enzimas que hidrolisam os ésteres de glicerol, são muitas vezes utilizadas em aplicações biotecnológicas e industrial. As lipases de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* são conhecidas por terem características tais como ampla especificidade em substratos, tolerância em relação a solventes orgânicos e de elevada estabilidade térmica. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo geral caracterizar, imobilizar e aplicar as lipases de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* produzidas em meio contendo melaço de soja. As massas moleculares determinadas por SDS-PAGE foram de 59,7 kDa para a lipase de *C. rugosa* e 38,3 kDa para a lipase de *G. candidum*. A lipase solúvel de ambos os microrganismos apresentaram atividade enzimática máxima a uma temperatura de 40 °C e foram inibidas a pH 10. O K_m da lipase de *C. rugosa* foi de 200,53 μ M e o $V_{m\acute{a}x}$ 0,044 μ mol/min, a lipase de *G. candidum* apresentou um K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de 443,99 μ M e 0,382 μ mol/min, respectivamente. Ambas as lipases sofreram inibição apenas na presença do íon metálico Cu^{3+} . A imobilização destas enzimas foi realizada por adsorção em Octil-Sefarose, ligação covalente unipontual em bromocianógeno (CNBr), ligação iônica em Dietilaminoetil (DEAE), Monoaminoetil-N-Etil (MANAE), carboximetil e sulfopropil, e por ligação covalente multipontual em suporte heterogêneo aminoglixil (AMG). Os derivados imobilizados foram caracterizados em relação ao pH, à estabilidade térmica e em solventes orgânicos. As lipases estudadas tiveram sua estabilidade melhorada quando comparada com a enzima solúvel. À 50°C, a lipase de *G. candidum* imobilizada em AMG, manteve sua atividade em 90% durante 7 horas, e a lipase de *C. rugosa* imobilizada em CNBr apresentou maior estabilidade reduzindo 25,76% da atividade residual em 7 horas. As lipases estudadas imobilizadas em AMG teve a estabilidade melhorada resultando numa atividade residual superior a 95%, em pH 10. Quando comparados com a enzima solúvel, os derivados imobilizados nos suportes catiônicos carboximetil e sulfopropil (mais estáveis) foram até 6 vezes mais estáveis na presença de metanol, até 11 vezes mais estáveis na presença de metanol e até 10 vezes mais estável na presença de ciclohexano. Os derivados imobilizados foram aplicados na hidrólise do óleo de sardinha para produção de ácidos polinsaturados (PUFA) Omega-3. A lipase de *C. rugosa* (enzima solúvel e derivados imobilizados) apresentou maior seletividade (EPA/DHA) quando comparada à seletividade produzida pela lipase de *G. candidum*. Os derivados imobilizados em carboximetil e sulfopropil foram os que apresentaram maior seletividade, 11 para lipase de *C. rugosa* e 7 para a lipase de *G. candidum*. Quando aplicados na hidrólise enantiosseletiva do (*R,S*) – éster etílico de ácido mandélico, a lipase de *C. rugosa* imobilizada em AMG apresentou maior seletividade pelo isômero *S* em pH 5 e 7, já em pH 9 a maior seletividade foi pelo isômero *R*. A lipase de *G. candidum* quando imobilizada em CNBr e AMG, apresentou maior seletividade pelo isômero *S* em pH ácido e alcalino, e em pH neutro sua seletividade foi maior para isômero *R*. Quando imobilizada em DEAE, a lipase de *G. candidum* foi mais seletiva pelo isômero *R* em pH 5 e 7, e em pH 9 sua seletividade é maior pelo isômero *S*. O contrário acontece quando imobilizada em carboximetil. As técnicas de imobilização, bem como o suporte utilizado, é um método eficiente para enzimas, como lipases que sofrem alterações dramáticas na sua conformação durante a catálise, e podem alterar as propriedades catalíticas melhorando sua estabilidade térmica, com pH, em solventes orgânicos.

Palavras-chave: lipase microbiana, *Candida rugosa*, *Geotrichum candidum*, imobilização, estabilização, produção de Omega-3, hidrólise enantiosseletiva.

Abstract

Lipases are enzymes that hydrolyse the esters in glycerol, often used for biotechnological and industrial applications. *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* lipases are known to have characteristics such as broad substrate specificity, tolerance toward organic solvents and high thermal stability. Thus, the present work has the general objective to characterize, immobilize and apply the of lipase from *C. rugosa* and *G. candidum* produced in a culture medium composed of soybean molasses. The molecular weight determined by SDS-PAGE was 59.7 kDa for the *C. rugosa* lipase, and 38.3 kDa for the *G. candidum* lipase. The soluble lipase from both microorganisms show maximum enzymatic activity at a temperature of 40 °C and were inhibited at pH 10. The *C. rugosa* lipase K_m was 200.53 μ M and V_{max} 0.044 μ mol/min, the *G. candidum* lipase showed a K_m and V_{max} of 443.99 μ M and 0.382 μ mol/min, respectively. Both lipases suffer inhibition only in the presence of the metal ion Cu^{3+} . The immobilization of these enzymes was performed by adsorption on Octyl-Sepharose, by covalent unipontual bond on Cyanogen bromide (CNBr), by ionic bond on Diethylaminoethyl (DEAE) ionic bond, Monoaminoethyl–N–Ethyl (MANAE), carboxymethyl and sulfopropyl, and by multipoint covalent attachment on heterogeneous support aminoglyoxyl (AMG). The derivatives immobilized were characterized in relation to pH, thermal stability and organic solvents effect. The lipases studied had their stability improved when compared to soluble enzyme. At 50 °C, the *G. candidum* lipase immobilized on AMG retained the activity at 90% for 7 hours, and *C. rugosa* lipase immobilized on CNBr was more stable reducing the residual activity in 25.76 % in 7 hours. The lipases studied immobilized on AMG had improved stability resulting in a residual activity higher than 95%, at pH 10. Compared to soluble enzymes, the derivatives immobilized on cationic supports carboxymethyl and sulfopropyl (more stable) were up to 6-fold more stable in the presence of methanol, up to 11-fold more stable in the presence of methanol and up to 10-fold more stable in the presence of cyclohexane. The immobilized derivatives were applied in hydrolysis of sardine oil for the production of polyunsaturated acids (PUFA) Omega-3. The lipase of *C. rugosa* (soluble and immobilized derivatives) showed higher selectivity (EPA/DHA) compared to the selectivity produzidade by *G. candidum* lipase. The derivatives immobilized on carboxymethyl and sulfopropyl were those with greater selectivity, 11 for *C. rugosa* lipase and 7 for *G. candidum* lipase. When applied in enantioselective hydrolysis of (*R,S*) - mandelic acid ethyl ester, the *C. rugosa* lipase immobilized on AMG showed higher selectivity for the *S* isomer at pH 5 and 7, already at pH 9 to increased selectivity was the isomer *R*. *G. candidum* lipase immobilized on CNBr and AMG, has greater selectivity for the *S* isomer at acid and alkaline pH, and at neutral pH is greater selectivity for isomer *R*. This enzyme immobilized on carboxymethyl has the opposite behavior when compared between the cationic and anionic supports. When immobilized on DEAE, *G. candidum* lipase is more selective for the isomer *R* at pH 5 and 7, and at pH 9 its selectivity is greater to isomer *S*. The opposite happens when immobilized on carboxymethyl. The immobilization techniques, as well as the support used, is an efficient method for enzymes, such as lipases which undergo dramatic changes in its conformation during catalysis, and may change the catalytic properties improving its stability with pH, thermal and in presence of organic solvents.

Key Words: microbial lipase, *Candida rugosa*, *Geotrichum candidum*, immobilization, estabilization, Omega-3 production, enantioselective hydrolysis.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), nome sistemático das lipases classificadas como hidrolases, são enzimas que realizam a catálise na hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa (KUMAR *et al.*, 2005; SALIHU *et al.*, 2011). Elas atuam na interface orgânica aquosa catalisando a hidrólise das ligações éster-carboxílicas presentes em acilgliceróis liberando ácidos orgânicos e glicerol. Nestas condições, as lipases podem catalisar reações de esterificação, interesterificação ou transesterificação (GHALY *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2008).

As lipases são comumente encontradas na natureza e podem ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (YANG *et al.*, 2005; RIGO *et al.*, 2010), sendo que as de origem microbiana tem sido mais estudadas devido à versatilidade de suas propriedades, como a estabilidade a altas temperaturas, ampla faixa de atuação em relação ao pH, sua seletividade na resolução de misturas racêmicas e pela facilidade de produção em larga escala (COLLA *et al.*, 2012; MESSIAS *et al.*, 2011; HASAN *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2001).

Estudos envolvendo diferentes microrganismos, suplementos e substratos na produção de lipase por fermentação submersa podem contribuir na busca de condições ideais para obtenção desta enzima com altos rendimentos, visando à redução de custos do processo de produção em escala industrial (VARGAS *et al.*, 2007).

Da variedade de leveduras produtoras de lipase, a *Candida rugosa* é um potente produtor de lipase (TAN *et al.*, 2003; TOMMASO *et al.*, 2010) e o *Geotrichum candidum* produz lipases ácido-graxo específicas que são mais específicas por reagirem bem com lipídeos contendo ácidos graxos de ligações duplas (MLADENOSKA e DIMITROVSKI, 2001).

Apesar de serem biocatalisadores com alta especificidade pela reação que catalisam e operarem em condições de reação amenas, tais como pH neutro, pressão atmosférica e temperaturas próximas à ambiente, as lipases tem restrições quanto à sua aplicação na forma solúvel em reações devido à sua instabilidade em solução, tornando o processo mais caro (BON e FERRARA, 2008).

Por isso, a imobilização enzimática surge como solução para alguns destes problemas na aplicação destas enzimas como biocatalisadores em processos produtivos. Uma vez imobilizada, a enzima passa a apresentar vantagens como catalisadores heterogêneos o que leva a sua reutilização ou uso contínuo, facilidade na sua separação do meio reacional,

possibilidade de modulação de suas propriedades catalíticas, prevenção de possíveis contaminações microbianas e a possibilidade de estabilização da sua estrutura tridimensional (MATEO *et al.*, 2007). O derivado enzimático é o resultado da interação entre a enzima e o suporte apresentando propriedades químicas, bioquímicas e mecânicas específicas (TISCHER e KASCHE, 1999).

Os métodos utilizados para imobilização de enzimas são baseados em mecanismos físicos (aprisionamento e encapsulação) e químicos (adsorção, ligação iônica e ligação covalente em suporte ou por ligação cruzada) (GIRELLI e MATTEI, 2005).

Dentre os vários métodos de imobilização disponíveis, a adsorção em suportes hidrofóbicos de baixa força iônica tem se mostrado o método mais simples, além de muito eficiente na imobilização e estabilização de lipases (PALOMO *et al.*, 2005).

Em um dos muitos estudos envolvendo imobilização de lipases por adsorção interfacial em suportes altamente hidrofóbicos (octadecil sepabeads, fenil sefarose e octil agarose), Palomo *et al.* (2002a) observaram que a atividade enzimática destas enzimas sofreram hiperativação quando imobilizadas nestes suportes.

Nos últimos anos as pesquisas envolvendo imobilização de lipases vem seguindo duas vertentes, uma com estudos que utilizam lipases, normalmente comerciais, imobilizadas com objetivo de aumentar o rendimento de reações, resolução de misturas racêmicas e a reutilização destas enzimas em diversas reações (PRIETO, 2015; TURATI, 2015; MATSUMOTO, 2014; QUILLES JR, 2015; BARON, 2008) e a outra são de estudos envolvendo a utilização de novos materiais para imobilização das lipases buscando suportes que aumentem a atividade relativa do derivado enzimático, e a estabilidade térmica em relação ao pH (KIM *et al.*, 2006; YE *et al.*, 2006).

Uma vez imobilizadas, as lipases podem ser aplicadas em muitos processos na área biotecnológica, tais como no processamento de papel e celulose, na indústria de alimentos, na indústria têxtil e de cosméticos, no tratamento biológico de resíduos, na indústria de detergentes, oleoquímica, farmacêutica e química fina. Sua elevada capacidade catalítica permite que estas enzimas sejam utilizadas em reações de estereosseletividade de alcoóis, ácidos carboxílicos e aminas, ou ainda, na síntese regiosseletiva com o objetivo de obter produtos opticamente ativos, ampliando a aplicação comercial (BON e FERRARA, 2008).

Lipases são enzimas com propriedades enantiosseletivas e devido a isso, são enzimas que têm sido empregadas, também, em vários processos de resolução de misturas racêmicas por meio de hidrólise em meio aquoso ou de síntese em meio orgânico (MARGOLIN, 1996; TSAI & HUANG 1999).

Alguns modelos podem descrever o mecanismo de enantiosseletividade em uma reação enzimática, sendo possível prever a enantiopreferência pelo substrato (GHANEM *et al.*, 2004; CUNHA, 2007).

Outro processo que tem sido bastante estudado é a aplicação de lipases na hidrólise do óleo de peixe para produção de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) Omega-3, formado por dois ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexanóico (DHA), que são considerados ácidos graxos essenciais, decorrentes principalmente de animais marinhos, especialmente em peixes de água fria, como salmão, cavala, arenque e truta (VANNICE e RASMUSSEN, 2014; DE CATERINA, 2011).

Os PUFA Omega-3 não são sintetizados pelo organismo humano e sua maior fonte são os produtos marinhos. Eles são sintetizados por fitoplânctons e algas e são transferidos e incorporados aos lipídeos dos peixes e mamíferos marinhos através da cadeia alimentar (SHAHIDI, 2008). Estes ácidos graxos apresentam importante papel na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes, artrites e outras inflamações e doenças autoimunes e, são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do cérebro e da retina (RIEDIGER *et al.*, 2009; YASHODHARA *et al.*, 2009).

Baseado no exposto, o presente trabalho apresenta como objetivo geral caracterizar, imobilizar e aplicar as lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* produzidas em meio contendo melaço de soja.

Como objetivos específicos podem ser citados:

- Purificar as lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* utilizando única etapa por imobilização em suporte hidrofóbico octil-Sefarose;
- Caracterizar as lipases solúveis quanto ao peso molecular utilizando gel de eletroforese, e determinar os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de cada uma das lipases estudadas;
- Identificar cada uma das lipases através de espectrometria de massa;
- Realizar a caracterização bioquímica (efeito do pH, da temperatura, do reagente EDTA, do detergente Triton X-100 e de íons metálicos na atividade enzimática) das lipases de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*;
- Determinar os melhores suportes de imobilização das lipases com o objetivo de aumentar a estabilidade em relação à temperatura e pH, e em meios contendo solventes orgânicos;
- Realizar a caracterização bioquímica dos derivados imobilizados de cada uma das lipases estudadas;

- Aplicar os derivados imobilizados na hidrólise do óleo de sardinha para produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) Omega-3.
- Avaliar a enantiosseletividade das lipases imobilizadas por diferentes técnicas de imobilização;

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Lipases

As lipases são enzimas que pertencem ao grupo das serina hidrolases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) tendo os triglicerídeos como substratos naturais e modo de ação semelhante ao das estereases. São biocatalisadores, que atuam na interface orgânico-aquosa, liberando ácidos e alcoóis orgânicos apresentando maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa (BON e FERRARA, 2008). As lipases apresentam níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, esta propriedade facilita a catálise de muitas reações, tais como esterificação, transesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise (SUN *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2008).

As lipases podem ser extraídas das células de tecidos animais e vegetais e ainda podem ser produzidas por microrganismos (SAXENA *et al.*, 2003). Segundo Vulfson (1994), apesar das enzimas lipolíticas serem mais extensamente encontradas em plantas, o seu conhecimento é bastante limitado se comparado com as lipases de microrganismos e animais. Do ponto de vista industrial as lipases microbianas são consideradas de maior importância, por apresentarem procedimentos mais simples de obtenção, a partir do caldo fermentativo, e serem geralmente mais estáveis e possuírem propriedades mais diversificadas (GANDRA *et al.*, 2008; PASTORE *et al.*, 2003).

A especificidade das lipases é uma de suas características importantes, de forma geral, podem ser definidas quatro tipos de especificidades. Em relação à classe de lipídios, a enzima pode ser específica em relação ao tipo de éster, como por exemplo di-, tri-, ou monoglicerídeo, colesterol éster, metil éster, etc; a regioespecificidade, que promove a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula; a especificidade com relação ao resíduo de ácido graxo, na qual a enzima lipolítica é específica em relação ao comprimento da cadeia ou em relação à presença de dupla ligação nesta cadeia; e a estereoespecificidade, pelo fato de algumas destas enzimas catalisarem apenas a hidrólise ou a esterificação de um ou dois estéreisômeros (COSTA e AMORIM, 1999; SOARES, 2000).

O seu mecanismo de ação é baseado nos sítios ativos presentes, formados pela tríade de aminoácidos serina-histidina-aspartato/glutamato, sendo necessária uma “ativação

interfacial” para que se inicie a catálise (BON e FERRARA, 2008). Essa ativação é justificada pela estrutura tridimensional da lipase, pois seu sítio ativo é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa (ou borda). Esta tampa move-se quando há ligação do substrato na superfície da enzima, alterando sua forma fechada para a forma aberta, fazendo com que o centro ativo fique acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase ao substrato (CASTRO *et al.*, 2004).

Devido à sua alta especificidade, estas enzimas são importantes na área da biotecnologia, principalmente nos setores oleoquímico e em síntese orgânica, na preparação de compostos enantiosseletivos. Em função de sua grande afinidade por um largo espectro de substratos, versatilidade quanto às características do meio reacional (aquoso, orgânico ou supercrítico), atividade elevada em meio reacional livre de solventes e disponibilidade comercial, as lipases apresentam muitas vantagens em processos de biotransformações (PANDEY *et al.*, 1999). Segundo HASAN *et al.* (2006), pelas suas pontencialidades biotecnológicas e por constituírem o mais importante grupo de biocatalisadores para aplicações neste campo, as enzimas lipolíticas vem atraindo uma grande atenção.

2.1.1. Lipases de Origem Microbiana

As lipases são utilizadas há milhares de anos, da maneira direta, empregando o extrato enzimático bruto de origem animal ou vegetal e, da maneira indireta, pelo aproveitamento da ação enzimática pelo crescimento microbiano em determinados substratos. Nos últimos anos o maior enfoque da indústria biotecnológica tem sido na produção e aplicação controlada de enzimas de origem microbiana, sendo que as proteases, carboidrases e lipases são as mais comercializadas para serem aplicadas, principalmente, nas indústrias de alimentos, de ração animal e, na sua grande maioria, na fabricação de detergentes (BCC RESEARCH, 2014; VOCUS, 2011; JAEGER e EGGERT, 2002).

A grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, os possíveis rendimentos elevados, a facilidade na manipulação genética e o rápido crescimento microbiano em um meio de baixo custo faz com que as enzimas microbianas sejam mais úteis do que as enzimas derivadas de plantas ou animais (HASAN *et al.*, 2006).

As lipases de origem microbiana estão sendo muito estudadas devido à ampla perspectiva de aplicação industrial e a estabilidade, uma vez que permitem um maior controle e eficiência, características difíceis de serem obtidas com lipases de outras fontes. Além disso,

a produção de enzimas por microrganismos garante um potencial ilimitado de suprimentos, possibilitando a criação de novos sistemas enzimáticos, o que não pode ser obtido em fontes vegetais e animais (MATSUMOTO, 2014; ALVES *et al.*, 2002; JESUS *et al.*, 1999)

Os microrganismos são bastante sensíveis às condições do ambiente ao qual estão sendo submetidos, apesar da sua versatilidade. Na produção de lipases de origem microbiana, a composição do meio, temperatura, pH, aeração e a presença de compostos inibidores influenciam o processo e afetam a atividade enzimática. Uma grande variedade de microrganismos tem habilidade de produzir essas enzimas, apresentando diferentes especificidades, massa molecular, sensibilidade à temperatura e pH (BURKERT, 2003).

As manipulações genéticas ou ambientais podem proporcionar o aumento do rendimento das células acarretando num aumento da atividade enzimática, que torna a enzima de interesse constitutivo, ou seja, induzindo-a a produzir enzimas alteradas que possam ser facilmente empregadas, devido as suas relativamente simples necessidades nutricionais (JAEGER *et al.*, 1994).

O custo de produção das lipases de origem microbiana é determinado pela quantidade de enzima produzida, o processo de separação empregado e a estabilidade enzimática. O substrato utilizado como fonte de carbono e o tipo de indutor influenciam significativamente a produção destas enzimas microbianas durante a fermentação. Isso acontece porque as enzimas lipolíticas têm como função quebrar os substratos lipídicos insolúveis para poderem ser mais facilmente absorvidos, já que a maioria das enzimas microbianas é produzida extracelularmente (KANWAR *et al.*, 2002; FEITOSA, 2009).

Os fungos filamentosos são reconhecidos como sendo os melhores produtores de lipases (CARDENAS *et al.*, 2001), entre eles estão os *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Thermomyces* (OLIVEIRA, 2006). Dentre as leveduras produtoras, a *Candida rugosa* é a que mais se destaca na aplicação em processos industriais (HADEBALL, 1991).

2.1.1.1. Lipases de *Geotrichum candidum*

Geotrichum candidum é um fungo ascomiceto de colônias brancas que pode ser isolado de diferentes locais como solo, água, esgotos e produtos lácteos. As linhagens comerciais são usadas como culturas iniciadoras na fabricação e maturação de queijos. É capaz de crescer em ampla faixa de temperatura e pH, com temperatura ótima de

aproximadamente 25 °C. Três morfologias básicas podem ser observadas para este microrganismo: linhagens que se assemelham a colônias de leveduras e apresentam baixa atividade proteolítica; colônias brancas que se assemelham a fungos filamentosos, com predominância de hifas e alta atividade proteolítica; e as que se situam entre estas situações (MARCELINO *et al.*, 2001; HAYALOGU e KIRBAG, 2007; BOUTROU e GUÉGUEN, 2005, MEDVED'OVÁ *et al.*, 2008).

Este fungo produz lipases ácido-graxo específicas que atuam na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações em *cis* e hidrolisam lentamente a ligação no carbono 9, fato esse não é muito comum entre as lipases. Por isso as enzimas lipolíticas produzidas por *Geotrichum candidum* tem chamado atenção para estudos de produção, imobilização e aplicação (RAMOS *et al.*, 2015; BRABCOVÁ *et al.*, 2013; MALDONADO *et al.*, 2012). Além disso, esta habilidade de produzir novos tipos de misturas de triacilgliceróis utilizando lipases regioespecíficas é uma das características mais interessantes para a aplicação no setor de óleos e gorduras (CASTRO *et al.*, 2004).

2.1.1.2. Lipases de *Candida rugosa*

Candida rugosa, também denominada *Candida cylindracea*, é uma levedura que apresenta formato esférico, forma colônias rugosas de coloração de branca a creme e se reproduz principalmente por brotamento multilateral, podendo apresentar ramificações e pseudohifas. Apresenta temperatura ótima de crescimento variável entre 20 e 30 °C. Requer, para seu crescimento macronutrientes como enxofre, potássio e nitrogênio, além de uma fonte de carbono. Embora possa ser patogêna quando presente na corrente sanguínea, raramente causa infecção (SCHAECHTER, 2009; BENJAMIN e PANDEY, 1998; DIB *et al.*, 1996; PFALLER *et al.*, 2006).

Este microrganismo produz lipases não específicas que catalisam a hidrólise das moléculas de acilglicerol de maneira aleatória, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, mono e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares aos produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura da biocatálise ser bem inferior (RICHETTI, 2009).

2.1.2. Reações Catalisadas por Lipases

Diferentes tipos de reações catalisadas por lipases são apresentadas na Figura 2.1.

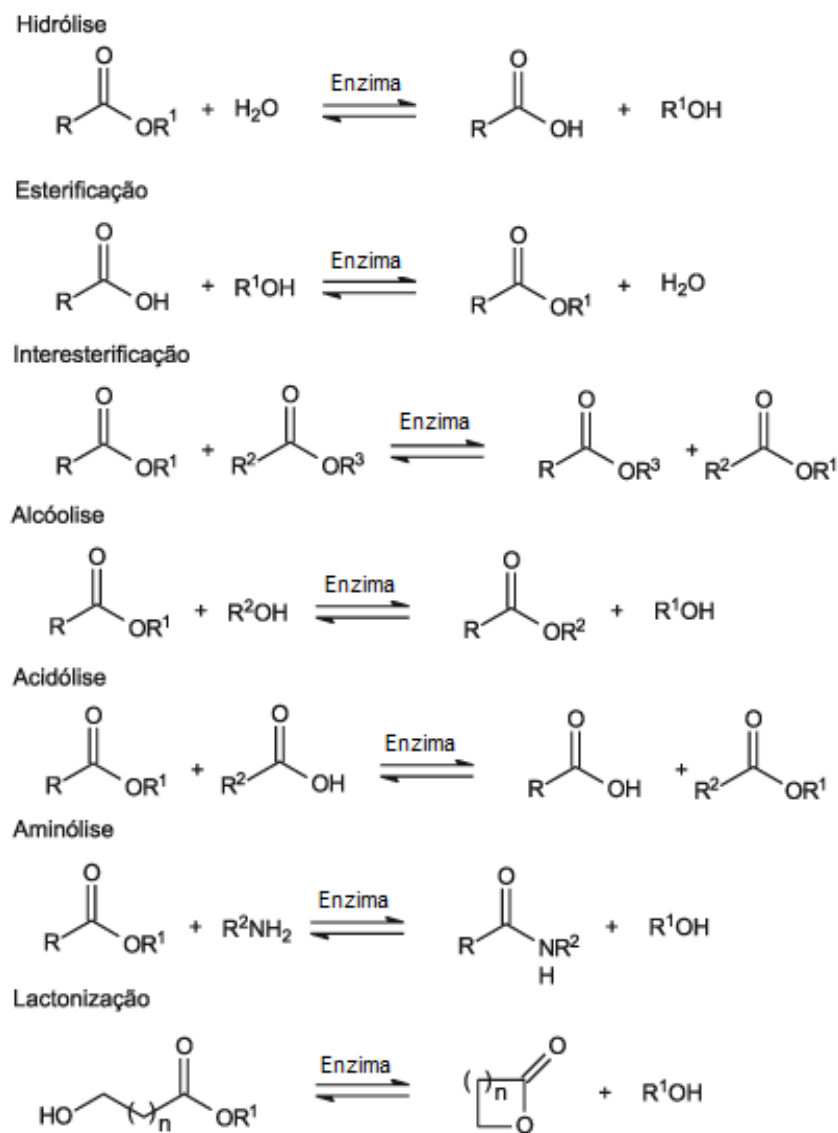


Figura 2.1 – Reações catalisadas por lipases (PAQUES e MACEDO, 2006)

As lipases são enzimas solúveis em água e atuam somente na interface óleo-água catalisando reações hidrolíticas de triglicerídeos insolúveis, por isso não obedecem às equações de Michaelis-Menten para a cinética enzimática em meio bifásico, porém, são válidas para reações catalíticas que ocorrem em fase homogênea (OLIVEIRA, 2000).

A velocidade da reação é determinada pela área superficial do substrato por unidade de volume, e não pela concentração de lipídeos na emulsão (triacilglicerol). A estabilidade da emulsão e o tamanho de suas partículas, influenciam a produção de lipase (atividade lipolítica) e, indiretamente, a taxa de crescimento do microrganismo produtor (HADEBALL, 1991).

As interferências na interface, que refletem na atividade lipolítica, podem ser causadas por proteínas, sais biliares, ácidos graxos, mono e diacilgliceróis, resultantes do triglicerol durante a ação da lipase (HADEBALL, 1991).

2.2. Imobilização Enzimática

Enzimas são proteínas com a característica funcional de catalisar reações. São biocatalisadores com alta especificidade pela reação que catalisam e operam em condições de reação amenas, tais como pH, pressão atmosférica e temperaturas próximas à ambiente (BON e FERRARA, 2008). No entanto, um dos problemas em utilizar as enzimas como biocatalisadores em reações é sua instabilidade em solução, tornando o processo mais caro. Nos últimos anos, a busca por tecnologias da aplicação de enzimas tem chamado atenção com intuito de estabelecer padrões de qualidade para os produtos, reduzir o consumo energético e os impactos ambientais dos processos, atendendo às normas ISO 9000 e 14000 (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2011).

Sendo assim, a imobilização enzimática surge como solução para alguns destes problemas na aplicação de enzimas como biocatalisadores em processos produtivos. A imobilização enzimática é a técnica que mantém o biocatalisador fisicamente confinado ou localizado numa região específica do suporte com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser re-utilizado continuamente (CHIBATA *et al.*, 1978). Uma vez imobilizada, a enzima deixa de ser um biocatalisador solúvel e passa a apresentar vantagens como catalisadores heterogêneos tais como sua reutilização ou uso contínuo, facilidade na sua separação do meio reacional, possibilidade de modulação de suas propriedades catalíticas, prevenção de possíveis contaminações microbianas e a possibilidade de estabilização da sua estrutura tridimensional (MATEO *et al.*, 2007).

O primeiro estudo realizado com imobilização de enzimas foi relatado em 1916, por Nelson e Griffin que observaram que a invertase adsorvida em carvão ativado manteve sua

atividade e não era desorvida com as lavagens (KENNEDY e WHITE, 1986). Desde então, vários métodos de imobilização foram desenvolvidos, cada um com limitações que devem ser consideradas quando aplicados. Não há um método ou suporte universal para classes específicas de enzimas e reações. Testes empíricos devem ser realizados testes empíricos afim de saber qual técnica e suporte de imobilização são mais eficientes (MENDES *et al.*, 2011).

A interação entre a enzima e o suporte irá resultar em um derivado enzimático com propriedades químicas, bioquímicas e mecânicas específicas (TISCHER e KASCHE, 1999). Assim como para outros processos químicos ou físicos, a velocidade e o rendimento de imobilização serão determinados por parâmetros como o tipo e os grupos reativos do suporte utilizado, o método de imobilização, a quantidade de enzima aplicada, o pH, a temperatura e o tempo de imobilização (BUCHHOLZ, 1979).

2.2.1. Métodos de imobilização enzimática

Os métodos utilizados para imobilizar as enzimas em suportes sólidos são baseados em mecanismos físicos e químicos (GIRELLI e MATTEI, 2005). A Figura 2.2 apresenta as principais técnicas de imobilização.

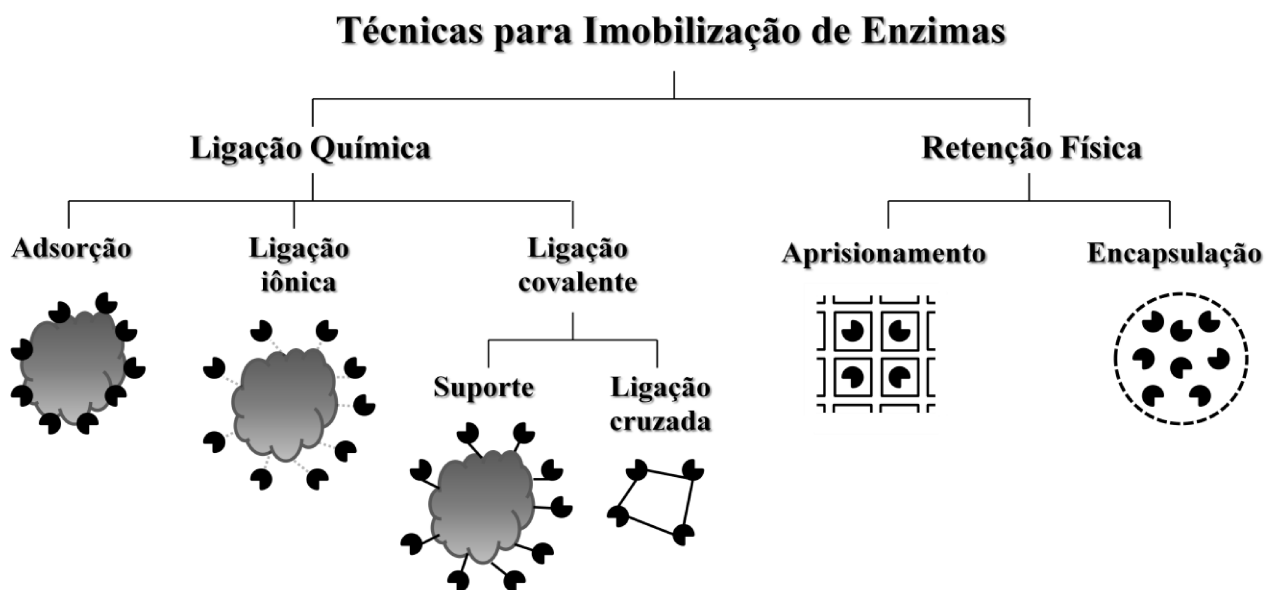


Figura 2.2 – Principais técnicas de imobilização de enzimas (adaptado de JEGANNATHAN *et al.*, 2008)

Para escolher qual o método de imobilização mais adequado a ser utilizado para imobilizar uma determinada enzima, deve-se realizar uma análise da aplicação e as condições operacionais onde a enzima irá atuar. É importante avaliar entre os métodos disponíveis, qual melhor se adequará às necessidades exigidas no processo, e também o tempo e os custos necessários a fim de viabilizar o método de imobilização escolhido, uma vez que tais parâmetros influenciarão diretamente no processo, bem como no custo do produto final (FERNANDES *et al.*, 2010).

2.2.1.1. Ligação Química

A imobilização enzimática realizada através do método de ligação química consiste na interação entre os grupos ativados da enzima com os grupos reativos da superfície do suporte e podem ser por adsorção ou por ligações covalentes (QUILLES JR, 2015).

2.2.1.1.1 Adsorção

Considerado o método mais simples de imobilização, a adsorção consiste basicamente na mistura, sob condições apropriadas, do suporte insolúvel com a solução enzimática seguida da separação do derivado imobilizado do meio reativo. A adsorção ocorre pela interação dos grupos superficiais da enzima com os grupos superficiais do suporte através de atrações eletrostáticas, força de van der Waals, interações iônicas, adsorção física ou até por interações hidrofóbicas (JEGANNATHAN *et al.*, 2008).

A eficiência deste método está diretamente ligada às variáveis do processo tais como pH, força iônica do meio e a relação entre a concentração da enzima e o suporte. Por isso, é necessário um certo cuidado com o derivado imobilizado por adsorção, para que as condições ótimas de imobilização sejam preservadas e o sistema se mantenha sem alterações significativas (MESSING, 1975).

Um exemplo de suporte utilizado no método de adsorção é o suporte hidrofóbico octil-sefaroze, onde o grupo octil é acoplado covalentemente à sefaroze, com matriz reticulada de 4%, por ligação éter criando um meio hidrofóbico com perda mínima e nenhuma propriedade iônica (Figura 2.3).

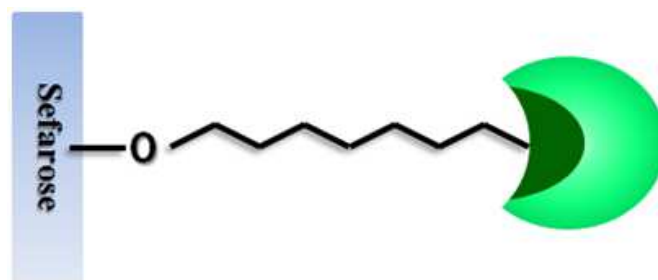


Figura 2.3 – Esquema ilustrativo da interação enzima-suporte resultante da imobilização por adsorção em Octil-Sefarose, que liga à enzima através de interações hidrofóbicas.

2.2.1.1.2 Ligação iônica

Neste método de imobilização, o suporte possui grupos funcionais ionizáveis que interagem especificamente com os grupos funcionais da enzima. Durante o processo de imobilização, pode ocorrer simultaneamente algum tipo de adsorção, porém, prevalecem as interações iônicas por serem mais fortes que as interações por adsorção (FERNANDES *et al.*, 2010). Os suportes iônicos podem ser carregados negativamente (suportes catiônicos) ou positivamente (suportes aniônicos).

A eficiência da imobilização por ligação iônica está relacionada às condições de operação do processo, como as propriedades tamponantes do meio que devem ser compatíveis com o suporte favorecendo a substituição de seus íons pelos grupos ionizados da enzima (VICHENEWSKI, 1995). Sendo assim, as condições ótimas de imobilização devem ser controladas, principalmente o pH e a força iônica do meio onde a preparação será realizada (LIM *et al.*, 2001; JANG *et al.*, 2000).

A Figura 2.4 mostra as interações iônicas da enzima com suportes aniônicos utilizados na imobilização de enzimas por ligação iônica. Os suportes monoaminoetil-N-etil agarose (MANAE) e dietilaminoetanol agarose (DEAE), carregados positivamente, são exemplos de suportes aniônicos.

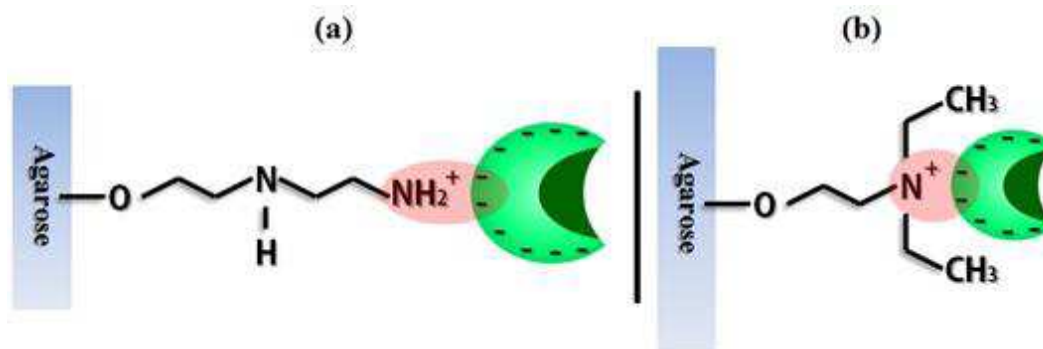


Figura 2.4 – Esquema ilustrativo da interação enzima-suporte resultante da imobilização por ligação iônica em suportes aniônicos: (a) MANAE-agarose; (b) DEAE-agarose, onde cada suporte é carregado positivamente e se liga à porção da enzima carregada negativamente.

Os suportes catiônicos carboximetil e sulfopropil são suportes carregados negativamente com os grupos funcionais OCH_2COO^- e $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$, respectivamente e são exemplos de suportes catiônicos utilizados na imobilização por ligação iônica (Figura 2.5).

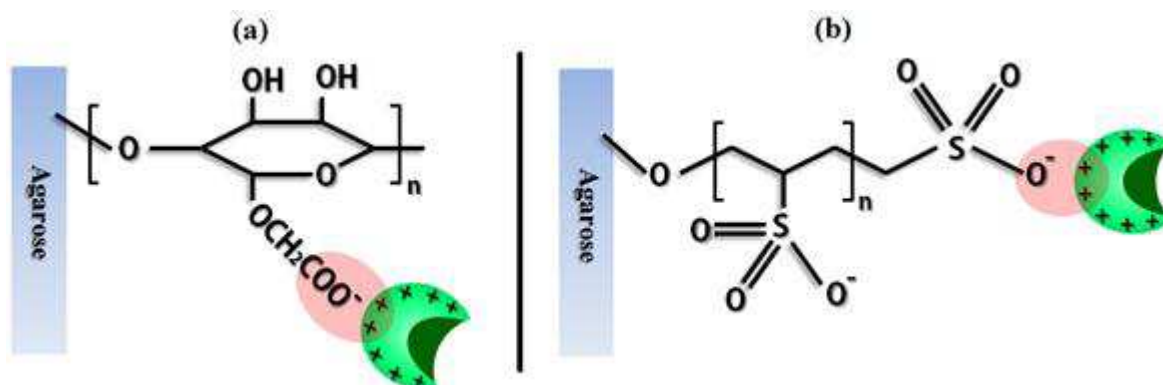


Figura 2.5 – Esquema ilustrativo da interação enzima-suporte resultante da imobilização por ligação iônica em suportes catiônicos. (a) carboximetil-agarose; (b) sulfopropil-agarose, onde o suporte é carregado negativamente e se liga à porção da enzima carregada positivamente.

As principais vantagens de utilizar-se suportes iônicos é a possibilidade de sua reutilização, a diminuição de lixiviação da enzima durante o processo de produção e a simplicidade do processo de imobilização, que o torna de fácil realização e reprodução (PESSELA *et al.*, 2003).

Estudos demonstraram que diferentes níveis de estabilização são alcançados seguindo diferentes métodos de imobilização. Em muitos casos, a imobilização não ocorre devido às características da estrutura enzimática a ser imobilizada (RUEDA *et al.*, 2016). Fatores tais

como a fonte microbiana e as condições do meio fermentativo produzem enzimas com diferentes características em sua superfície influenciando suas propriedades físico-químicas.

A aminação química da superfície enzimática é um método promissor para melhorar as propriedades enzimáticas (LÓPEZ-GALLEGUO *et al.*, 2005). Este método vem sendo demonstrado com sucesso, através de diferentes técnicas e consiste na adição de cargas positivas (NH_2^+) sobre a superfície enzimática (ABIAN *et al.*, 2004, LÓPEZ-GALLEGUO *et al.*, 2005). Por exemplo, a aminação química através da reação dos grupos carboxílicos da superfície da proteína (tais como o grupo lateral de Asp e Glu), com etilenodiamina, após a ativação com carbodiimida, é uma reação bem descrita e de fácil controle (PERFETTI *et al.*, 1976, MATYASH *et al.*, 1973, HOARE *et al.*, 1968, NAKAJIMA & IKADA, 1995). Fernández-Lorente *et al.* (2008) relataram a aminação química via ativação interfacial de lipases utilizando imobilização reversível em suportes hidrofóbicos, como uma alternativa de simplificar este processo.

A Figura 2.6 ilustra o mecanismo de aminação química da superfície enzimática.

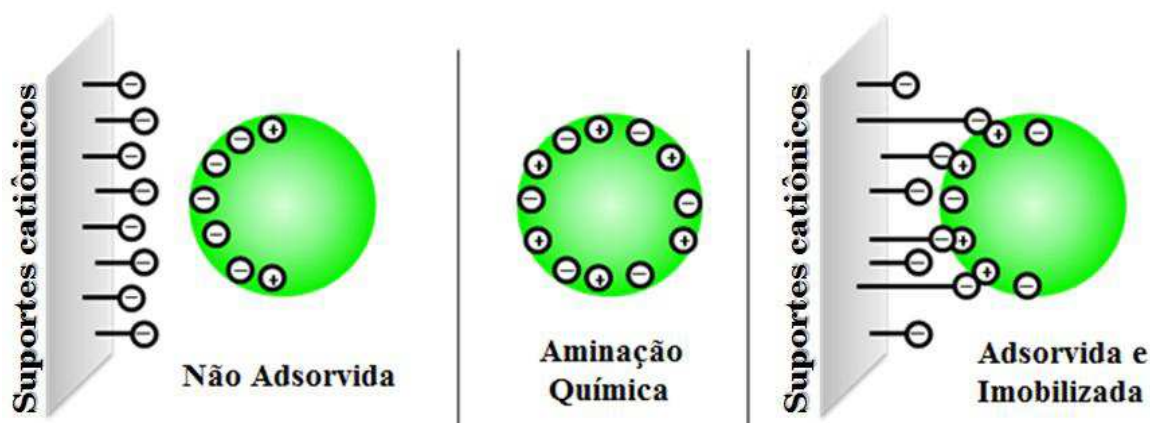


Figura 2.6 – Esquema ilustrativo da técnica de aminação química das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum*.

2.2.1.1.3 Ligação covalente

A imobilização enzimática pelo método de ligação covalente é um dos métodos mais utilizados e estudados (MOHAMAD *et al.*, 2015). Neste método ocorre os mais variados tipos de ligações, podendo imobilizar a enzima através de qualquer um dos seus grupos reativos. Este tipo de ligação ocorre entre o grupo reativo do suporte e, principalmente, com os

aminoácidos (lisina, cisteína, tirosina e histidina) da enzima, sendo que os aminoácidos de caráter hidrofóbico, por não estarem expostos na superfície protéica, são descartados neste tipo de ligação (ALFAYA e KUBOTA, 2002).

A imobilização de enzimas por ligação covalente necessita de condições apropriadas que favoreçam o processo de imobilização tais como variações no pH e da força iônica do meio reacional a fim de ativar os resíduos de aminoácidos que se ligarão ao suporte (MATEO *et al.*, 2000).

As condições mais drásticas e o maior número de etapas de reação, levando a mais tempo para sua realização, são inconvenientes deste método de imobilização. Porém, quando imobilizadas adequadamente, os derivados imobilizados apresentam grande estabilidade, de forma que somente alterações muito drásticas no meio poderão interferir neste tipo de ligação (KENNEDY e WHITE, 1986).

Outro fator importante que deve ser considerado na imobilização por ligação covalente é a rigidez da ligação enzima-suporte, a estabilidade da enzima é maior quando ocorre ligação multipontual (gloxil, epóxi e glutaraldeído) quando comparada com a estabilidade do derivado imobilizado por ligação covalente unipontual (bromocianógeno) (MATEO *et al.*, 2007).

A Figura 2.7 mostra a imobilização covalente unipontual em suporte bromocianógeno (CNBr) ativado. Esta imobilização se dá através da região amino terminal e/ou aminas de baixo pKa (PALOMO, 2003).

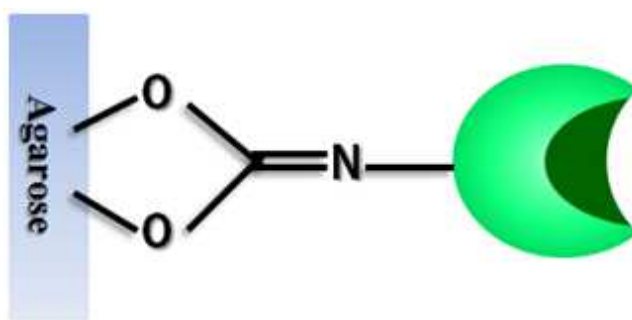


Figura 2.7 – Esquema ilustrativo da interação enzima-suporte resultante da imobilização covalente unipontual em suporte CNBr agarose.

Um exemplo de imobilização por ligação covalente multipontual em suporte heterofuncional amino-gloxil agarose é ilustrado na Figura 2.8.

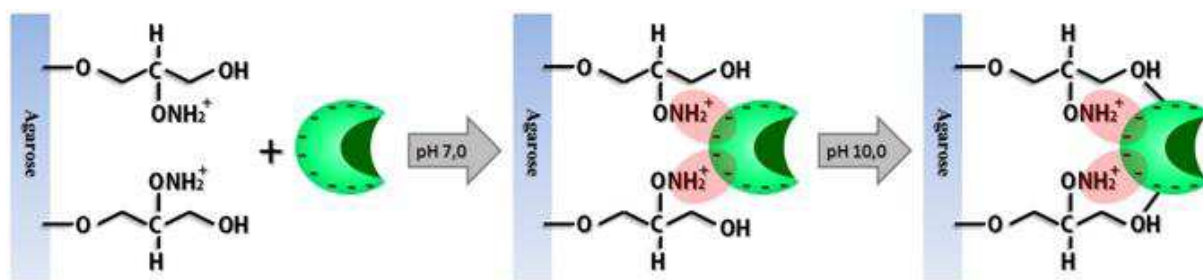


Figura 2.8 – Esquema ilustrativo da interação enzima-suporte resultante da imobilização covalente multipontual em suporte heterofuncional Amino-Glioxil agarose.

A imobilização multipontual ocorre pela formação de várias ligações covalentes entre os ânions ativos da enzima e os grupos amino do suporte. Géis glioxil-agarose possibilita uma interação enzima-suporte intensa sem que ocorra distorção na conformação estrutural da enzima devido à reversibilidade de cada ligação unipontual amina-aldeído sem impedimentos estéricos para a reação química amina-aldeído e a estabilidade dos grupos aldeídos (BON e FERRARA, 2008).

2.2.1.2. Retenção Física

O método de imobilização enzimática por retenção física é também conhecido como aprisionamento ou encapsulação e consiste na retenção da enzima no interior de matrizes poliméricas como membranas, ou em microcápsulas semipermeáveis que impedem a interação química entre o suporte e os grupos constituintes da enzima, mantendo a estrutura tridimensional e o sítio ativo da enzima sem alterações (SILVA *et al.*, 2008). Esta técnica proporciona um sistema onde as moléculas menores dos substratos e produtos se difundam da solução até o sítio ativo da enzima no interior da matriz, enquanto as enzimas (moléculas maiores) ficam retidas no interior do suporte. Assim, as principais vantagens da utilização deste método de imobilização é a grande área superficial disponível para o contato do sítio ativo da enzima com o substrato, além da possibilidade de realizar a imobilização de diferentes enzimas num mesmo suporte, ao mesmo tempo (MENDES *et al.*, 2011).

Um exemplo de imobilização de enzimas por retenção física é a microencapsulação que caracteriza-se pelo revestimento (ou aprisionamento) da enzima com um polímero formando micro-esferas (RATHORE *et al.*, 2012).

2.2.2. Imobilização de lipases

As vantagens de imobilizar enzimas como a lipase engloba sua reutilização, um melhor controle do processo, maior estabilidade e os produtos livres do biocatalisador (RAHMAN *et al.*, 2005), o aumento da sua estabilidade na presença de substratos polares, mudança do equilíbrio termodinâmico favorecendo a síntese de mais éster na hidrólise, a redução da dependência de água residuais em reações como a hidrólise e o aumento do seu potencial para uso diretamente em processos químicos, além de se mostrarem mais estáveis em meios contendo solventes orgânicos (YE *et al.*, 2005).

Dentre os vários métodos de imobilização disponíveis, a adsorção em suportes hidrofóbicos de baixa força iônica ainda é o método mais simples e muito eficiente na imobilização e estabilização de lipases que, em condições adequadas, se imobilizam em sua conformação aberta (SECUNDO *et al.*, 2008; PALOMO *et al.*, 2005; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007). Este fato se dá principalmente devido à grande porção hidrofóbica desta enzima, facilidade na preparação, menor custo e menor interferência em relação à perda de atividade enzimática (BARON, 2008).

A adsorção interfacial envolve as áreas hidrofóbicas que circundam o sítio ativo e a face interna da “tampa” (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2008; CABRERA *et al.*, 2009). Lipases imobilizadas através de adsorção interfacial apresentam-se em sua forma ativa (aberta) tornando seu sítio ativo mais acessível aos substratos, independente da presença de interfaces hidrofóbicas externas (Figura 2.9) (BATISDA *et al.*, 1998; CABRERA *et al.*, 2009; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2011).

Em estudos envolvendo imobilização de lipases por adsorção interfacial em suportes altamente hidrofóbicos (octadecil sepabeads, fenil sefarose e octil agarose), Palomo *et al.* (2002a) observaram que tais enzimas tiveram sua atividade aumentada significativamente, ou seja, as lipases imobilizadas nestes suportes hiperativaram, devido à maior exposição do centro catalítico destas enzimas no meio reativo.

No método de imobilização de lipase por ligação covalente, a primeira etapa é a adsorção das enzimas na superfície do suporte, a partir daí ocorre a ligação covalente entre os resíduos de aminoácidos e os grupos reativos do suporte. Vale ressaltar que em pH alcalino, os resíduos dos aminoácidos encontram-se na forma de nucleófilos proporcionando uma maior taxa de imobilização em menor tempo (MATEO *et al.*, 2000).

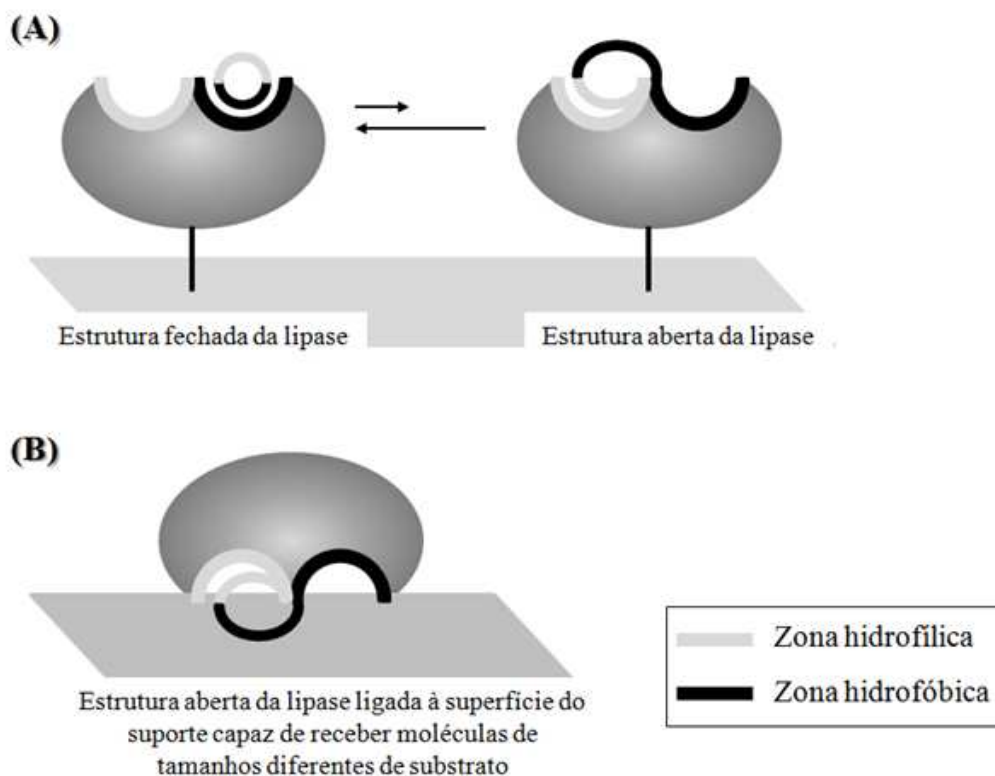


Figura 2.9 – Mecanismo geral de imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2011).

Desde a última década os pesquisadores vem estudando duas vertentes de pesquisas envolvendo imobilização de lipases. A primeira são estudos que utilizam lipases, normalmente comerciais, imobilizadas com objetivo de aumentar o rendimento de reações, resolução de misturas racêmicas e a reutilização destas enzimas em diversas reações (YAGIZ *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 2006; ADAMCZAK *et al.*, 2005; GHAMGUI *et al.*, 2004). A segunda vertente são de estudos envolvendo a utilização de novos materiais para imobilização das lipases buscando suportes que aumentem a atividade relativa do derivado enzimático, e a estabilidade térmica e em relação ao pH ótimo (KIM *et al.*, 2006; YE *et al.*, 2006). Essas pesquisas utilizam materiais como nanofibras de polianilina magnética (LEE *et al.*, 2008), membranas de algodão e polisulfona (TAN *et al.*, 2006), sílica mesoporosa hexagonal (YADAV e JADHAV, 2005), entre outros.

A Tabela 2.1 apresenta estudos mais recentes sobre imobilização de lipases em diferentes suportes utilizando diferentes métodos de imobilização.

Tabela 2.1 – Imobilização de lipases em diferentes suportes e métodos.

Suportes	Método	Rend. de imobilização (%)	Referência
Alginato de Sódio	Aprisionamento	40	KEBABCI e CIHANGIR, 2012
Nanotubos de carbono	Ligação covalente	-	FENG <i>et al.</i> , 2012
Sílica mesoporosa	Encapsulação	71	HU <i>et al.</i> , 2012
AB8	Adsorção	96	YAN <i>et al.</i> , 2013
Benoite modificado	Ligação covalente	48	RAMOS <i>et al.</i> , 2014
Glutaraldeído – agarose	Ligação covalente	80	SOLER <i>et al.</i> , 2015

2.3. Aplicações das Lipases

Lipases têm sido aplicadas em vários segmentos da biotecnologia, tais como no processamento de papel e celulose (SHARMA *et al.* 2001), na indústria de alimentos (BUSTAMANTE *et al.*, 2003), na indústria têxtil e de cosméticos (HASAN *et al.*, 2006), no tratamento biológico de resíduos (ROSA *et al.*, 2006), na indústria de detergentes (LIU *et al.*, 2008), oleoquímica (MATSUOKA *et al.*, 2009), farmacêutica e química fina (VIEIRA *et al.*, 2009). Sua elevada capacidade catalítica permite que estas enzimas sejam utilizadas em reações estereosseletiva de alcoóis, ácidos carboxílicos e aminas ou na síntese regiosseletiva, originando produtos opticamente ativos, ampliando a aplicação comercial (BON e FERRARA, 2008).

As lipases são classificadas de acordo com a sua especificidade, fator muito importante para sua aplicação industrial, e podem ser específicas com relação à molécula alcoólica ou ácida do substrato.

Lipases não específicas catalisam a quebra das moléculas de acilglicerol de maneira aleatória, produzindo intermediários como ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis. Neste caso, apesar da sua similaridade com os produzidos por catálise química, os produtos gerados possuem menor termodegradação devido às baixas temperaturas na reação (WOLSKI *et al.*, 2008).

Lipases 1,3 específicas são classificadas desta maneira por liberarem ácidos graxos nas posições 1 e 3, formando produtos com diferentes composições das obtidas por lipases não-regiosseletivas (WOLSKI *et al.*, 2008).

E por fim, as lipases ácido graxo específicas, que têm ação específica durante a hidrólise de ésteres. A habilidade de produzir novos tipos de misturas de triacilglicerídeos utilizando lipases regioespecíficas é uma das características mais importantes para serem aplicadas no setor de óleos e gorduras (CASTRO *et al.*, 2004).

As lipases representam cerca de 10% entre as enzimas empregadas em processos bioquímicos reportados na literatura. Porém, devido aos elevados custos de produção, sua aplicação em escala industrial ainda é escassa (FEITOSA, 2009).

Na indústria de papel e celulose, as lipases são utilizadas para hidrolisar mais que 90% dos triglicerídeos presentes na madeira, que causam graves problemas na fabricação de celulose e papel (SHARMA *et al.*, 2001).

No segmento alimentício, as lipases são aplicadas na melhoria da textura de pães, otimização do tempo de maturação de salsichas fermentadas e na hidrólise de gorduras (BON e FERRARA, 2008; GANDRA *et al.*, 2008).

Na indústria têxtil as lipases auxiliam na remoção de lubrificantes, proporcionando um tecido mais absorvente, facilitando no processo de tingimento, além de proporcionar suavidade e alta resistência a manchas, enrugamentos e abrasão (HASAN *et al.*, 2006).

Lipases imobilizadas são aplicadas como biocatalisadores na reação de obtenção dos derivados de retinol que são muito empregados na indústria de cosméticos, em produtos para cuidados com a pele (HASAN *et al.*, 2006).

No tratamento biológico de efluentes, as lipases são utilizadas em efluentes domésticos, na limpeza de tubulações de esgotos, fossas sépticas e sumidouros e até mesmo para acelerar a biodegradação de polímeros e lamas de perfuração de poços de petróleo contendo ésteres sintéticos emulsionados em água (JAEGER e REETZ, 1998; BON e FERRARA, 2008).

A maior aplicação destas enzimas, responsáveis por 32 % das vendas totais das lipases, é na indústria de detergentes, que ocorre desde os anos 90. Isso se deve principalmente à sua característica de suportar ampla faixa de pH e temperatura branda submetido durante o processo de lavagem (BON e FERRARA, 2008; LIU *et al.*, 2008).

Entre as aplicações na indústria oleoquímica, a interesterificação de óleos merece destaque, por ajudar na produção de um óleo mais barato devido à composição em ácidos graxos (CABRAL *et al.*, 2003). Segundo Lee *et al.* (2002), estudos envolvendo a aplicação de

lipases na obtenção do biodiesel, via rota enzimática, aumentou significativamente nos últimos anos, principalmente devido à menor geração de subprodutos (glicerol) como resíduos (YANG *et al.*, 2007). Por outro lado, as lipases também podem ser empregadas como biossensores a fim de detectar triacilgliceróis na indústria oleoquímica, na tecnologia de alimentos e em análises clínicas (BON e FERRARA, 2008).

Na indústria farmacêutica e química fina, o potencial das lipases é conferido por sua característica de regio, enantio e quimiosseletividade, permitindo serem utilizadas na remoção seletiva de alguns compostos indesejáveis e na resolução de misturas racêmicas (CABRAL *et al.*, 2003).

Devido à versatilidade das lipases, aliada ao desenvolvimento dos conhecimentos e técnicas associadas à biologia molecular dos microrganismos, a aplicação de lipases vem sendo ampliada consideravelmente nos últimos anos. A Tabela 2.2 apresenta alguns estudos mais recentes sobre aplicações de lipases.

Tabela 2.2 – Aplicações industriais de lipases

Aplicação	Lipase	Referência
Síntese de vitamina E	<i>C. rugosa</i>	HU <i>et al.</i> , 2012
Aplicação em biossensores	<i>Aspergillus</i> sp.	GOPINATH <i>et al.</i> , 2013
Produção de biodiesel	<i>P. pastoris</i>	JIN <i>et al.</i> , 2013
Produção de medicamentos quirais	<i>C. antarctica</i> B	GROENEWALD <i>et al.</i> , 2013
Biotransformação	<i>G. candidum</i>	BRABCOVÁ <i>et al.</i> , 2013
Síntese de aromatizantes de frutas	<i>T. lanuginosus</i>	MENDES <i>et al.</i> , 2014
Produção de aromatizantes	<i>C. rugosa</i>	MOHAMAD <i>et al.</i> , 2015
Síntese de éster fitosterol	<i>C. rugosa</i>	SHANG <i>et al.</i> , 2015
Produção de cera	<i>Burkholderia</i> sp.	UNGCHAROENWIWAT e H-KITTIKUN, 2015
Esterificação do ácido butírico e butanol	<i>C. rugosa</i>	NG e YANG, 2016
Produção de metil éster	<i>Bacillus</i> sp.	SIVARAMARKRISHNAN e INCHAROENSAKDI, 2016
Síntese de biodiesel a partir de microalgas	<i>A. niger</i>	GULDHE <i>et al.</i> , 2016
Síntese de biodiesel a partir de óleos ricos em fosfolipídeos	<i>F. heterosporum</i>	AMOAHA <i>et al.</i> , 2016
Síntese de polímeros a partir do óleo de plantas	diversas	TAI e ZHANG, 2016

2.4. Ácidos graxos polinsaturados (PUFA) Omega – 3

Como mencionado anteriormente, as lipases tem ampla aplicação em processos bioquímicos. Um dos processos que vem sendo bastante estudado é a aplicação de lipases como biocatalisadores da reação de hidrólise do óleo de peixe para produção de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) Omega-3.

Os ácidos graxos são compostos com múltiplas e importantes atividades biológicas. Suas características bioquímicas e função biológica são determinadas pela diferença no tamanho da cadeia e o estado de saturação. A família Omega-3 é derivada do ciclo α -linolênico (C18:3) que dá origem à dois ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, o ácido eicosapentaenóico (EPA C20:5) e o ácido docosahexanóico (DHA C22:6) (VANNICE e RASMUSSEN, 2014). Assim o EPA e o DHA são considerados ácidos graxos essenciais, decorrentes principalmente de animais marinhos, especialmente em peixes de água fria, como salmão, cavala, arenque e truta (DE CATERINA, 2011).

O PUFA Omega-3 exerce suas atividades biológicas através de três mecanismos principais, alguns efeitos biológicos dependem da incorporação em membranas celulares, outros efeitos derivam de interações diretas entre íons e outros componentes celulares e, finalmente, EPA e DHA são os compostos parentais de mediadores lipídicos bioativos (DE CATERINA, 2011). Os mecanismos exatos ainda não são completamente compreendidos, não sendo claro se o EPA e o DHA partilham das mesmas vias (WESTPHAL *et al.*, 2011).

Os PUFA Omega-3 não são sintetizados pelo organismo humano e sua maior fonte são os produtos marinhos. Eles são sintetizados por fitoplânctons e algas e são transferidos e incorporados aos lipídeos dos peixes e mamíferos marinhos através da cadeia alimentar (SHAHIDI, 2008). Estes ácidos graxos vem apresentando importante papel na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes, artrites e outras inflamações e doenças autoimunes e, são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do cérebro e da retina (RIEDIGER *et al.*, 2009; YASHODHARA *et al.*, 2009).

Suplementos de Omega-3 são geralmente considerados seguros e sem grandes reações adversas quando ingeridos pelos seres humanos. Porém, uma preocupação potencial é a presença de contaminantes, especialmente mercúrio e dioxinas em peixes e óleo de peixes, o que tem implicações diretas para a recomendação dietética, em particular para alguns grupos de pessoas, como mulheres grávidas e crianças (MOZAFFARIAN, 2009).

Os principais métodos para a concentração de PUFA Omega-3 são por separação cromatográfica, destilação fracional ou molecular, cristalização à baixas temperaturas e extração com fluido supercrítico (RUBIO-RODRIGUEZ *et al.*, 2010). Por outro lado, a hidrólise do óleo de peixe catalisada por lipase, demonstrou ser um processo simples e seletivo para a produção e concentração de PUFA Omega-3 há quase 50 anos atrás (BOTTINO *et al.*, 1967). A conformação molecular das ligações duplas *cis* carbono-carbono entre os ácidos polinsaturados que compõem o Omega-3 (EPA e DHA), faz com que haja um impedimento estérico que resulta na flexão das cadeias destes ácidos graxos deixando os grupos metil terminais próximos às ligações éster. Devido a este efeito do impedimento estérico, os sítios ativos das enzimas não podem alcançar as ligações éster destes ácidos graxos com o glicerol, protegendo o EPA e o DHA na reação catalisada por lipase (OKADA e MORRISSEY, 2007). Diferentes lipases de fungos e leveduras têm sido utilizados nestas reações.

A hidrólise ocorre em sistema aquoso bifásico com adição da lipase em água que se separa do óleo desejado, purificado em seguida. Os ácidos graxos livres produzidos podem ser removido através de métodos convencionais de fracionamento de lipídeos, tais como cromatografia em coluna, extração por solventes e destilação simples, que é o método mais vantajoso pela possibilidade de processar grandes quantidades de produto continuamente e de forma eficiente. A eficiência do processo de concentração de PUFA Omega-3 é altamente afetada pela quantidade inicial do substrato (KAHVECI e XU, 2011).

2.5. Resolução de misturas racêmicas – Enantiosseletividade

Isômeros são compostos com mesma fórmula molecular mas com diferentes disposições estruturais, conferindo a estes características químicas diversas. Os isômeros cujos átomos ou grupos de átomos possuem distribuição espacial diferente na molécula são chamados de estereoisômeros e podem ser divididos em geométricos ou ópticos. Os isômeros geométricos são estereoisômeros que não apresentam atividade óptica e são classificados através de sua disposição espacial em *cis* (do mesmo lado) e *trans* (lados opostos). Os isômeros ópticos são aqueles que apresentam atividade óptica, possuindo centros quirais ou centros assimétricos (NASIPURI, 1991).

A quiralidade representa uma propriedade intrínseca dos grupos de aminoácidos, açúcares, peptídeos, proteínas e polissacarídeos (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2006). O fenômeno da quiralidade é associado à incapacidade da realização de determinadas operações de simetria, fazendo com que todas as substâncias assimétricas sejam quirais, entretanto a recíproca não é verdadeira (NASIPURI, 1991). Este fenômeno foi observado verificando-se que as imagens não sobreponíveis desviavam a luz plano polarizada em direções opostas (LOURENÇO *et al.*, 2010).

Misturas racêmicas ou racemato são aquelas onde os enantiômeros estão em quantidades iguais e, quando estes compostos estão em quantidades desiguais, dizemos que a mistura é enantiomericamente enriquecida.

Devido a sua enantioseletividade, lipases têm sido empregadas em vários processos de resolução de misturas racêmicas por meio de hidrólise em meio aquoso ou de síntese em meio orgânico, com o objetivo de desenvolver metodologias eficientes para produção de compostos opticamente puros, biologicamente ativos (MARGOLIN, 1996; TSAI E HUANG 1999).

O mecanismo de enantioseletividade em uma reação enzimática pode ser descrito por alguns modelos, sendo possível prever a enantiopreferência pelo substrato, entretanto, o mais simples dos modelos não consegue prever o grau de enantioseletividade (GHANEM *et al.*, 2004; CUNHA, 2007). Em 1964, Prelog observou que a estereosseletividade da biorredução de cetonas se relacionava diretamente com o tamanho dos grupamentos ligados à carbonila. Assim, foi determinada a Regra de Prelog, um modelo simples que prediz que a enantioseletividade de redução de cetonas por álcool desidrogenases de leveduras é baseado no tamanho dos dois substituintes no grupamento carbonila (FABER, 1997).

Uma regra empírica para a resolução de alcoóis secundários quirais foi desenvolvida por Kazlauskas *et al.* (1991). Esta regra prevê qual enantiômero constituinte de uma mistura racêmica reagirá mais rapidamente quando catalizado por uma lipase ou uma esterase. Esta proposta é baseada fundamentalmente no efeito estéreo de cada grupo substituinte do álcool em questão e em estruturas de raios-X de enzimas.

A presença de duas porções hidrofóbicas (uma de tamanho grande e outra média) foram determinadas através da análise de estruturas das enzimas. Estas porções seriam responsáveis pela adaptação dos grupamentos substituintes de um álcool secundário durante uma reação enzimática. Sendo assim, o grupo de tamanho grande se acomoda na porção hidrofóbica grande e o grupo de tamanho médio se acomoda na porção hidrofóbica média (KAZLAUSKAS *et al.*, 1991; GHANEM *et al.*, 2004).

Esta regra está relacionada exclusivamente com o tamanho dos grupos e não com a configuração *R* ou *S* e só vale para álcoois secundários e algumas aminas primárias, embora as lipases catalisem também reações de hidrólise enantiosseletiva de alcoóis primários, lactonas e ácidos carboxílicos. A simetria da hidrólise e transesterificação enzimáticas, seguindo a regra empírica para a resolução de alcoóis secundários quirais desenvolvida por Kazlauskas *et al.* (1991) é apresentado na Figura 2.10.

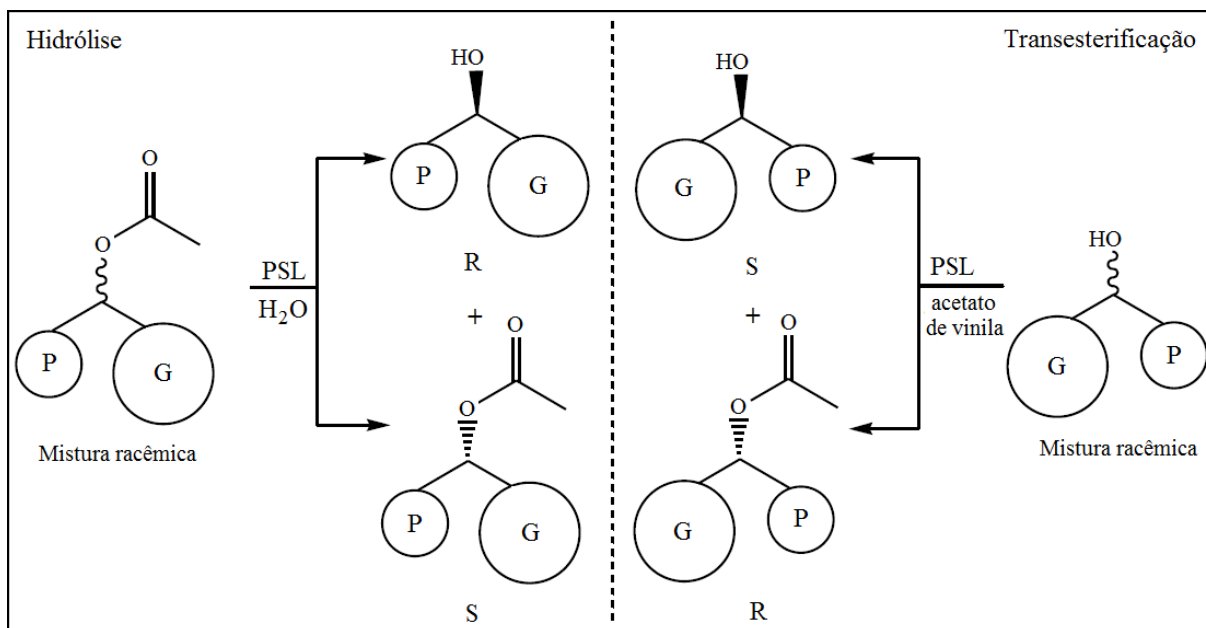


Figura 2.10 – Simetria das reações de hidrólise e transesterificação catalisadas por lipase de *Pseudomonas cepacia* (PSL) proposta por Kazlauskas *et al.* (1991). (P: grupo pequeno; G: grupo grande).

Quando submetido a uma reação enzimática, o substrato racêmico sofre discriminação entre os enantiômeros. O enantiômero que melhor se ajusta no sítio ativo da enzima é convertido em uma velocidade maior, devido à quiralidade desta enzima. A diferença na velocidade de reação dos enantiômeros individuais deve ser a maior possível para assegurar uma alta seletividade dos enantiômeros e, em condições ideais, a velocidade é tão extrema que um enantiômero é transformado rapidamente e o outro não chega a ser convertido, finalizando a reação enzimática com 50% de conversão, por falta do enantiômero reativo. Sendo assim, o rendimento máximo de cada enantiômero em uma resolução racêmica é de 50% (LOZANO *et al.*, 2006).

A escolha do método de aplicação da resolução racêmica para separar um determinado enantiômero depende de fatores como as propriedades físicas e químicas das moléculas e do custo e viabilidade do processo.

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

A produção das lipases de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* utilizadas neste trabalho foram realizadas no laboratório do Nucleo de Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (NUCBIO/FEQ/UFU). Os experimentos de caracterização, imobilização e aplicação foram realizados sob orientação e parceria com o professor Dr. Benevides Costa Pessela, no laboratório de processos bioquímicos do Instituto de Investigación en Ciencia de la Alimentación (CIAL) pertencente ao Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) localizado na Universidad Autónoma de Madrid (UAM), em Madrid – Espanha.

3.1. Enzimas

As lipases de *Candida rugosa* (CRL) e *Geotrichum candidum* (GCL) foram produzidas a partir da fermentação submersa em reatores cônicos de bancada de 250 mL, o inóculo com uma concentração inicial de células de aproximadamente $1,0 \pm 0,1$ mg p.s cel/mL foi adicionado ao meio contendo 50 mL de meio composto de melaço de soja a uma concentração de 200 g/L e pH inicial do meio de 3,5, deixado sob agitação mecânica a 130 rpm e 25 °C, como descrito por Morais Júnior *et al.* (2016). A lipase de *Candida rugosa* (NRRL Y-1506) foi produzida em 12 horas e a lipase de *Geotrichum candidum* (NRRL Y-552) em 24 horas. As cepas de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*, foram cedidas pela professora doutora Eliana Setsuko Kamimura da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, e cultivadas em tubo de ensaio contendo meio de cultura Ágar-Sabouraud e Ágar-YPD, respectivamente. O melaço de soja cedido pela empresa de processamento de soja Selecta – Araguari/MG.

3.1.1. Preparação das lipases

Decorridos os tempos de fermentação, o caldo enzimático produzido por cada microrganismo foi centrifugado (12.000 x g durante 20 min). O sobrenadante da solução centrifugada foi dialisado durante 24 horas à 4 °C com três trocas do meio dialisante (água destilada). Foi utilizada membrana Dialysis Tubing, tamanho 5, diâmetro 24/32” – 19,0 mm : 30 M; 12 – 14000 Daltons.

Após esta etapa foi avaliada a atividade de lipase e a concentração de proteínas.

3.1.2. Purificação das lipases

Para purificar as lipases de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* de outras proteínas contaminantes (por exemplo, proteases e esterases), preparou-se soluções do caldo enzimático de cada uma das lipases com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7 na proporção 1:1 (v/v). As soluções enzimáticas foram adsorvidas, separadamente, em octil-Sefarose seguindo os protocolos descritos por Batisda *et al.* (1998). Para dessorver as enzimas do suporte hidrofóbico, as lipases adsorvidas foram lavadas com Triton X-100 em solução tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7, a 4 °C. Para a lipase de *Candida rugosa*, utilizou-se uma concentração de Triton X-100 de 0,5% (v/v) e para a lipase de *Geotrichum candidum*, utilizou-se uma concentração de Triton X-100 de 0,05% (v/v).

A fim de separar a enzima solúvel do Triton X-100, aplicou-se o método descrito por Horikawa e Ogawara (1979), realizando a extração do surfactante com clorofórmio. Para cada 1 mL de solução enzimática contendo Triton X-100, adicionou-se 1 mL de clorofórmio e misturou-se por alguns segundos em agitador Vórtex. As misturas foram centrifugadas a 3000 rpm durante 30 minutos e a fase aquosa contendo a lipase de cada microrganismo foi separada. As enzimas solúveis foram analisadas e calculou-se a atividade total, proteína total, atividade específica e porcentagem de recuperação.

3.2. Metodologia Analítica

3.2.1. Atividade Enzimática e Concentração de Proteínas

A atividade enzimática das lipases foi quantificada empregando uma modificação do método proposto por Quinn *et al.* (1982), utilizando-se o substrato sintético *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB). A hidrólise do *p*-NPB foi determinada após 1 minuto de reação, em temperatura controlada, acompanhando-se a liberação do ânion *p*-nitrofenolato (*p*-NP) (Figura 3.1). A atividade enzimática da lipase foi determinada pela diferença da absorbância do *p*-nitrofenol a 348 nm, produzido pela hidrólise de 20 µL de *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB) 50 mM. Iniciou-se a reação adicionando-se 20 µL da lipase diluída em 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7.0 à 25 °C. A atividade foi expressa em unidades de lipase (U), correspondente à quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 µmol de *p*-NPB por minuto, nas condições especificadas (QUINN *et al.*, 1982).

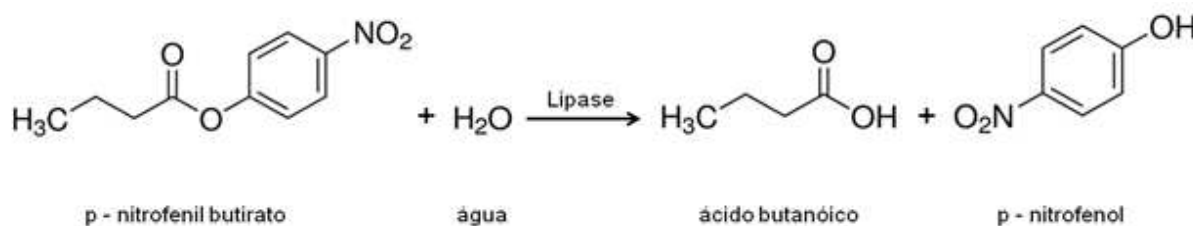


Figura 3.1 – Hidrólise do substrato sintético *p*-nitrofenil butirato catalisada por lipase

A atividade total de lipase foi calculada pela equação 3.1:

$$AL \text{ (U/mL)} = \frac{Abs \times (V_T + V_S + V_A)}{V_A \times (\epsilon / 1000)} \quad (3.1)$$

Sendo,

AL a atividade de lipase expressa em U/mL;

Abs o valor da absorbância dada pelo espectrofotômetro à 348 nm;

V_T o volume de solução tampão utilizado;

V_S o volume de substrato *p*-NPB;

V_A o volume de amostra da enzima solúvel;

ϵ o coeficiente de extinção molar (absortividade molar) = 5150.

A determinação da concentração de proteína foi realizada pelo Método de Bradford (1976) descrito no Apêndice A, a fim de calcular a atividade enzimática específica.

3.3. Caracterização das lipases

As lipases de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* produzidas em meio contendo melaço de soja, foram caracterizadas a fim de determinar: 1) suas massas moleculares aplicando gel de eletroforese SDS-PAGE, 2) sua estabilidade térmica e em relação ao pH, 3) o efeito inibidor do detergente Triton e dos íons metálicos nas atividades enzimáticas e, 4) os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ pelo estudo da influência da concentração de *p*-NPB nas atividades enzimáticas das lipases estudadas.

3.3.1. Determinação da Massa Molecular por SDS-PAGE

A metodologia de eletroforese em sistema desnaturante descrita por Laemli (1970) foi utilizada para a verificação do estado de pureza das enzimas e para determinação de suas respectivas massas moleculares, utilizando-se géis de concentração crescente de poliacrilamida (5–12%). As amostras foram preparadas na proporção de 1:1 em tampão de ruptura (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 2,5 % dodecil-sulfato de sódio (SDS), 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol e 0,002% azul de bromofenol) e aquecidas por 5 min em água fervente. As eletroforeses foram realizadas em eletrólito composto por tampão Tris 0,025 M, glicina-NaOH 0,19 M pH 8,6 e SDS 0,1% (m/v), durante aproximadamente 2 h, sob corrente de 150 V. Após a corrida, procedeu-se a coloração de proteínas com azul de coomassie R-250 0,25% (m/v) em metanol/ácido acético/água (4/1/5 v/v/v) por um período de 3 h. Posteriormente, o gel foi descorado com solução de metanol/ácido acético/água (3/1/6 v/v/v) até a visualização das bandas de proteínas. Os pesos moleculares foram estimados usando como marcadores o kit padrão de calibração de baixo peso molecular da GE Healthcare.

3.3.2. Identificação da Proteína por Espectrometria de Massa – Proteômica

Após a determinação da massa molecular por SDS-PAGE da lipase de cada microrganismo, as bandas observadas foram analisadas por espectrometria de massa no “Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CBM-CSIC” na Universidad Autónoma de Madrid, plataforma em rede de proteômica Carlos III (Proteored ISCIII). Após a secagem, as bandas do gel foram destingidas em solução acetonitrilo:água (1: 1) e digeridas em local com sequenciamento de grau tripsina (Promega, Madison, WI), de acordo com Shevchenko *et al.* (1996). A digestão da proteína dessalinizada foi seca, ressuspensa em 10 µL de ácido fórmico a 0,1% e analisadas por RP-LC-MS/MS, em um sistema Easy-nLC II acoplado a um espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap-Velos-Pro (Thermo Scientific). Os peptídeos foram concentrados (*on-line*) através de cromatografia de fase reversa usando uma pré-coluna C18 RP (Acclaim PepMap® 100, nanoViper, Thermo Scientific) de 0,1 mm x 20 mm e, em seguida, separados utilizando uma coluna C18 RP (Acclaim PepMap® 100, nanoViper, Thermo Scientific) de 0,075 mm x 250 mm operando com fluxo a 0,3 µL/min. Os peptídeos foram eluídos usando um gradiente de 5–40% solvente (solvente A: 0,1% ácido fórmico em água; solvente B: 0,1% ácido fórmico, 80% acetonitrila em água). Uma ionização foi realizada em eletrospray utilizando interface Nano-bore Emitter Stainless Steel ID 30 µm (Proxeon). A identificação do peptídeo foi efetuada utilizando o algoritmo SEQUEST HT (proteoma Discoverer 1.4, Thermo Scientific) e os resultados comparados com o banco de dados UniProt-fungi.fasta.

3.3.3. Efeito da Temperatura e do pH na Estabilidade Enzimática da Enzima Livre

A estabilidade térmica das lipases produzidas foi estudado para as temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C. As amostras foram preparadas adicionando-se 1,0 mL de lipase em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 à temperatura desejada durante 7 horas. A constante de inativação (K_d) para cada uma das lipases solúveis foi calculada pelo ajuste dos modelos de desativação térmica de primeira ordem da equação linearizada (Equação 3.2) e a equação não-linearizada (Equação 3.3).

$$\ln \frac{A_i}{A_0} = -K_d \times t \quad (3.2)$$

$$\frac{A_i}{A_0} = e^{(-K_d \cdot t)} \quad (3.3)$$

em que, A_i é a atividade enzimática após o tratamento térmico durante um determinado tempo de incubação; e A_0 é a atividade enzimática inicial, imediatamente antes de iniciar o experimento de estabilidade térmica. Os ajustes dos dados experimentais, obtidos para lipase produzida por cada microrganismo em diferentes temperaturas, foram obtidos utilizando o software Statistica® 7.0, (MORE e WATSON, 1977), para determinar os parâmetros cinéticos (HENLEY e SADANA, 1985).

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), definido como o tempo para que a atividade enzimática reduza 50%, foi determinado a partir do ajuste dos dados experimentais ao modelo descrito pelas Equações 3.2 e 3.3.

O efeito do pH na estabilidade de lipase foi avaliado nos pHs de 3,0 a 10,0. Utilizou-se tampão citrato de sódio 50 mM para os pHs de 3,0, 4,0 e 5,0, para os pHs de 6,0, 7,0 e 8,0 utilizou-se tampão fosfato de sódio 50 mM e para os experimentos em pH 9,0 e 10,0 utilizou-se tampão bicarbonato de sódio 50 mM. Preparou-se as amostras utilizando 1,0 mL de lipase e 1,0 mL do tampão desejado à temperatura ambiente e deixou-se sob agitação mecânica por 2 horas. Após este tempo, determinou-se a atividade enzimática e calculou-se as atividades residuais em relação à atividade inicial, como descrito no item 3.2.1.

3.3.4. Efeito Inibidor do EDTA, Detergente e dos Íons Metálicos

Para avaliar o efeito do inibidor na atividade da lipase, adicionou-se à 1,0 mL de cada uma das lipases, etileno-diaminotetraacético (EDTA) até a obtenção de uma concentração final de 10 mM. A fim de avaliar o efeito do detergente na atividade enzimática, preparou-se uma solução da lipase com Triton X-100 à uma concentração final de 0,02, 0,2 e 1,0%. Finalmente, o efeito dos íons metálicos foi determinado preparando-se uma solução da lipase com os sais de CuSO_4 , NiSO_4 , MgSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , Na_2SO_4 e FeSO_4 à uma concentração final de 10 mM.

Para cada experimento realizado, as amostras foram deixadas sob agitação mecânica à temperatura ambiente durante 10 minutos.

As atividades residuais foram calculadas com os resultados obtidos nas análises das atividades de lipase descritas anteriormente no item 3.2.1.

3.3.5. Determinação dos Parâmetros Cinéticos Aparentes (K_m e $V_{m\acute{a}x}$)

A atividade enzimática foi determinada pela hidrólise de 20 μ L de *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB) em diferentes concentrações. Iniciou-se a reação adicionando-se 20 μ L da lipase diluída em 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7.0 a 25 °C e a absorbância foi lida a 348 nm. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados à pH 7,0. A atividade de lipase foi testada variando a concentração de substrato entre 1,56 a 150 mM. Os dados foram ajustados na curva dada pela Equação de Michaelis-Menten linearizada pelo método de Lineweaver-Burk (duplo recíproco) (Equação 3.4), de onde os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados.

$$y = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} x + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (3.4)$$

A taxa da reação foi expressa como a concentração em μ mol de substrato reagido por miligrama de enzima por minuto.

3.4. Estudo da Imobilização das Lipases

3.4.1. Suportes

As lipases produzidas por cada um dos microrganismos estudadas foram imobilizadas em diferentes suportes. Os suportes utilizados foram Octil-Sefarose 4BCL, Bromocianógeno agarose ativado (CNBr), Dietilaminoetanol agarose (DEAE), Monoaminoetil-N-etil agarose (MANAE), Carboximetil agarose, Sulfopropil agarose adquiridos da empresa GE Healthcare Bio-Sciences e Amino-Glioxil agarose (AMG), preparado a partir do suporte glioxil também da empresa GE Healthcare Bio-Sciences.

3.4.2. Preparação e Ativação dos Suportes

3.4.2.1. Octil-Sefarose 4BCL, DEAE, Carboximetil agarose e Sulfopropil agarose

Os suportes Octil-Sefarose 4 BCL, Dietilaminoetil (DEAE), Carboximetil agarose e Sulfopropil agarose são suportes comerciais já ativados e adquiridos da empresa GE Healthcare Bio-Sciences. A suspensão de cada um destes suportes foi lavada com água destilada em abundância e o suporte foi secado por filtração à vácuo para, então, ser utilizado.

3.4.2.2. Bromocianógeno agarose ativado (CNBr)

O suporte CNBr foi preparado como indicado pelo fabricante (GE Healthcare Bio-Sciences). Suspendeu-se 1,0 g de CNBr em 100 mL de água destilada e ajustou-se o pH da solução em 2,0, utilizando-se uma solução de HCl 1 M. A suspensão foi deixada sob agitação mecânica por 45 minutos à temperatura ambiente e, após este período o suporte foi filtrado e seco à vácuo para, então, ser utilizado.

3.4.2.3. Monoaminoetil–N–Etil agarose (MANAE)

O suporte MANAE foi preparado conforme descrito por Fernandez-Lafuente *et al.* (1998). Uma solução contendo 27,07 mL de etilenodiamina 2 M, pH 4,75 e 100 mL de água destilada foi preparada, após ajustar o pH em 10 com solução de NaOH 1M, completou-se o volume para 200 mL gotejando água destilada. Adicionou-se 35 g de glioxil agarose à esta solução e deixou-se sob constante agitação mecânica durante 2 horas. Após este tempo, adicionou-se 2 g de borohidreto de sódio (NaBH_4) e deixou-se sob agitação mecânica por mais 2 horas. Finalmente, o gel foi lavado com aproximadamente 1 L de tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0 e aproximadamente 1 L de água destilada. Posteriormente, o suporte foi filtrado e seco à vácuo para, então, ser utilizado.

3.4.2.4. Amino-Glioxil agarose (AMG)

O suporte AMG foi preparado conforme descrito por Bolivar *et al.* (2010). Adicionou-se 100 g de agarose 4BCL em uma solução composta de 440 mL de água destilada, 160 mL de acetona, 32,8 g de NaOH, 2 g de NaBH₄ e 110 mL de epícloridrina. A suspensão foi deixada sob agitação mecânica branda (cerca de 100 rpm) por aproximadamente 16 horas. Decorrido este tempo, o suporte foi lavado com água destilada em excesso e foi secado por filtração à vácuo. Em seguida, o suporte foi oxidado utilizando 35 mL de uma solução contendo periodato de sódio 100 mM dissolvido em 1375 mL de água destilada. A suspensão foi suavemente agitada durante 90 minutos. Após este tempo, o suporte foi lavado com água destilada. Finalmente, adicionou-se ao gel, uma solução de 5% de mercaptoetanol a pH 8,7 deixando em descanso por 12 horas. O suporte foi seco por filtração à vácuo para ser utilizado.

3.4.3. Procedimentos de Imobilização

Para as imobilizações utilizando os suportes Octil-Sefarose, DEAE, MANAE, Carboximetil, Sulfopropil e Amino-Glioxil agarose, adicionou-se a 5 g de cada suporte 50 mL de solução contendo a lipase de cada microrganismo e tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0, na proporção 1:1. Deixou-se a suspensão sob agitação mecânica (cerca de 100 rpm) à temperatura ambiente. Periodicamente, amostrou-se o sobrenadante e a suspensão para analisar a atividade enzimática e acompanhar a imobilização. Após o processo, a solução foi lavada com água destilada e filtrada. O derivado imobilizado retido pelo filtro foi seco por filtração à vácuo.

Para o suporte Amino-Glioxil (AMG), para finalizar o processo de imobilização, a suspensão foi lavada com tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0 e seco em filtro à vácuo. Adicionou-se ao derivado, retido pelo filtro, 10 mL de tampão bicarbonato de sódio 5 mM pH 10,0 e deixou-se sob agitação mecânica durante 90 minutos à temperatura de 25 °C. Após este tempo, o suporte foi reduzido adicionando-se 10 mg de borohidreto de sódio, pH 10,0 e deixado sob agitação mecânica (cerca de 100 rpm) por 30 minutos (BLANCO e GUISÁN, 1989). Após o processo, a solução foi lavada com água destilada e filtrada. O derivado imobilizado retido pelo filtro foi seco em filtro à vácuo.

A fim de reduzir a possibilidade de ligações covalentes multipontuais entre a enzima e o suporte (e assim obter imobilização covalente unipontual), a imobilização das lipases em CNBr foi realizada durante 15 minutos à 4 °C em meio com pH 7,0 (MATEO *et al.*, 2005). Após este tempo, adicionou-se etilenoamina 1 M, pH 8,0 e deixou-se sob agitação mecânica por 2 horas. Finalmente, a suspensão foi lavada com água destilada em abundância e filtrada a vácuo (RODRIGUES *et al.*, 2009).

3.4.4. Aaminação Química das Lipases

A fim de melhorar a imobilização das lipases de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* nos suportes catiônicos, foi aplicado à estas enzimas a técnica de aaminação química.

Antes da aaminação química, as lipases de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* foram imobilizados em Octil-Sefarose 4 BCL (como descrito no item 3.7.2.1). Após 1 hora, a preparação imobilizada foi filtrada e lavada com água destilada.

Em seguida, 5 g de derivados imobilizados de cada uma das enzimas foi adicionado a 50 mL de etilenodiamina 1 M pH 4,5, e deixado sob agitação contínua à 180 rpm. Logo em seguida foi adicionado, à suspensão em agitação, carbodiimida (EDAC) para uma concentração final de 10 mM e deixado sob agitação mecânica suave (cerca de 100 rpm) por 90 minutos à 25 ± 1 °C. Após este tempo, os derivados aminados (5 g) foram filtrados e lavados 5 vezes com 80 mL de água destilada e armazenada a 4 °C. A fim de dessorver as enzimas aminadas do suporte Octil, os derivados imobilizados foram ressuspensos em 10 mL de solução de Triton X-100 2% diluída em tampão de fosfato de sódio 5 mM pH 7,0 (GALVIS *et al.*, 2012).

3.4.5. Caracterização dos Derivados Imobilizados

3.4.5.1. Efeito do pH

O efeito do pH na estabilidade enzimática dos derivados imobilizados foi estudado avaliando os pHs nos valores de 3,0 a 10,0. Os tampões utilizados para cada faixa de pH foram os mesmos descrito na seção 3.4 deste trabalho. Preparou-se as amostras utilizando 0,1

g de cada derivado imobilizado e 1,0 mL do tampão desejado à temperatura ambiente e deixou-se sob agitação mecânica por 2 horas. Após este tempo, determinou-se a atividade enzimática e calculou-se as atividades residuais em relação à atividade inicial, como descrito no item 3.2.1.

3.4.5.2. Efeito da Temperatura

O efeito da temperatura na estabilidade enzimática dos derivados imobilizados foi estudado para as temperaturas de 30, 40 e 50 °C. Os ensaios foram preparados adicionando-se 0,1 g de cada derivado imobilizado, em 1,0 mL tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e postos em banho termostático à temperatura desejada durante 7 horas, as amostras foram retiradas a cada 1 hora de experimento.

A constante de inativação (K_d) para cada derivado, em diferentes temperaturas, foi calculada pelas Equações 3.2 e 3.3 (Henley e Sadana, 1985); e o tempo de meia-vida foi calculado como descrito na seção 3.4.

3.4.5.3. Estabilidade em Solventes Orgânicos

A estabilidade das enzimas imobilizadas em solventes orgânicos foi estudada adicionando-se uma quantidade de derivado imobilizado correspondente à 1,0 U/mL de lipase, em 1 mL de solução tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0, contendo metanol, propanol e ciclo-hexano em concentração final de 50% (v/v), cada uma. Deixou-se sob agitação mecânica à 180 rpm, durante 78 horas à $37 \pm 1^\circ\text{C}$. A primeira amostragem foi realizada após 6 horas, e as seguintes a cada 12 horas. A atividade de lipase foi determinada, utilizando o ensaio padrão, como descrito no item 3.2.1, para calcular as atividades residuais.

3.5. Aplicação das Lipases de *Geotrichum candidum* e *Candida rugosa* e seus Derivados Imobilizados na Produção de Ácidos Graxos Polinsaturados (PUFA) Omega-3

3.5.1. Hidrólise do Óleo de Sardinha

A hidrólise do óleo de sardinha foi realizada em sistema bifásico contendo uma fase aquosa e outra de solvente orgânico como descrito por Fernandez-Lorente *et al.* (2011). O sistema foi constituído por 4,5 mL de ciclohexano, 5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7 e 0,5 mL de óleo de sardinha. A solução foi pré-incubada à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos sob agitação vigorosa (aproximadamente 1500 rpm). A reação foi iniciada pela adição das lipases solúveis e dos derivados de lipase, separadamente, com atividade de 4,5 U. O sistema foi mantido sob agitação magnética a 1500 rpm e $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 horas e as amostras foram retiradas a cada 24 horas.

3.5.2. Análise da Produção de PUFA Omega-3

Após 72 horas, foi retirada a agitação do sistema bifásico para que a fase orgânica fosse separada (aproximadamente 5 minutos). Para cada 100 μL de amostra da fase orgânica de cada sistema bifásico, foi adicionado, em eppendorf, 400 μL de acetonitrila. A quantificação dos ácidos graxos produzidos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência analisados em HPLC de fase reversa (Spectra Physic SP 100) acoplado à um detector UV da marca Spectra System, modelo UV1000 usando uma coluna hidrofóbica C8 (15 cm x 0,46 cm). Os produtos foram eluídos fase móvel composta por 70% acetonitrilo/30% tampão ácido acético 10 mM (v/v) a pH 3, em fluxo de 1,0 mL/min. A partir dos resultados obtidos por Fernández-Lorente *et al.* (2011), utilizou-se um comprimento de onda de 215 nm, para minimizar a interferência por impurezas presentes nas amostras de óleo de sardinha. Os ácidos graxos foram preparados em diferentes concentrações diluindo-se os padrões comerciais de EPA e DHA em hexano. Os tempos de retenção para os ácidos graxos insaturados foram de aproximadamente 9,4 minutos para o EPA e de 13,5 minutos para o DHA. Estes PUFAs produzidos enzimaticamente foram comparados com os seus padrões

comerciais puros correspondentes. As concentrações dos padrões comerciais de EPA e DHA são apresentados no Apêndice B.

3.6. Teste da Enantiosseletividade com os derivados imobilizados selecionados

Afim de avaliar o comportamento enantiosseletivo das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* imobilizadas em diferentes suportes, foi selecionado um derivado imobilizado obtido por cada uma das diferentes técnicas de imobilização utilizadas neste trabalho. Por ligação covalente unipontual em CNBr, por ligação covalente multipontual em AMG e por ligação iônica em carboximetil (suporte catiônico) e DEAE (suporte aniônico).

A reação foi iniciada adicionando-se 0,1 g de cada derivado, separadamente, em frascos contendo 10 mL do substrato quiral (*R,S*) – éster etílico de ácido mandélico 10 mM, dissolvido em tampão com pH de 5,0, 7,0 e 9,0 à temperatura de 37 °C. Utilizou-se tampão acetato de sódio 25 mM pH 5,0, tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0 e tampão bicarbonato de sódio 25 mM pH 9,0. O rendimento reacional total foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência analisados em HPLC de fase reversa (Spectra Physic SP 100 acoplado à um detector UV da marca Spectra System, modelo UV1000) usando uma coluna hidrofóbica C8 (25 cm x 0,4 cm). Os produtos foram eluídos em fase móvel composta por 30% acetonitrila/70% tampão fosfato de amônio 10 mM (v/v) com pH final de 2,95, em fluxo de 1,5 mL/min. A eluição dos produtos foi monitorada pela medida da absorbância à 254 nm. O excesso enantiomérico foi analisado pela eluição das amostras em coluna quiral Chiracel OD-R. A fase móvel utilizada foi composta por 5% acetonitrila/95% tampão fosfato de amônio 10 mM (v/v), pH 2,1 e fluxo 0,5 mL/min, com leitura da absorbância à 225 nm (PALOMO *et al.*, 2002).

3.7. Reprodutibilidade dos Dados Experimentais

Todas as análises foram realizadas em triplicata e tiveram os desvios padrões calculados a fim de confirmar os resultados obtidos.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Purificação das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* produzidas em meio contendo melaço de soja

As lipases de *C. rugosa* (CRL) e *G. candidum* (GCL) foram purificadas utilizando o método de adsorção interfacial em suporte fortemente hidrofóbico como descrito no item 3.7.2.1. Os resultados de purificação são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Purificação das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum*.

Amostras	Atividade total (U/mL)	Concentração de proteína (mg/mL)	Atividade Específica* (U/mg)	Rendimento (%)	Aumento da atividade
CRL	6,64	1,331	4,99	-	-
CRL purificada	6,44	$7,33 \times 10^{-2}$	87,82	96,9	17,6 vezes
GCL	10,98	1,804	6,09	-	-
GCL purificada	10,07	$6,98 \times 10^{-2}$	144,27	91,7	23,7 vezes

*Atividade específica expressa a quantidade de atividade enzimática por miligrama de proteína e é calculada pela razão entre a atividade total e a concentração de proteína obtido pelas análises descritas na seção 3.3.3.

Após o procedimento de purificação, a lipase solúvel de *C. rugosa* apresentou atividade específica de 87,82 U/mg, 17,6 vezes maior quando comparada com esta lipase antes da purificação, e uma recuperação final de 96,9%; a lipase de *G. candidum* apresentou atividade específica de 144,27 U/mg, 23,7 vezes maior quando comparada com esta lipase antes da purificação, e uma recuperação final de 91,7%. Isto mostra que o procedimento de purificação com apenas uma etapa, utilizando suporte hidrofóbico Octil sefarose, foi eficiente para as lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* produzidas em meio contendo melaço de soja.

4.2. Caracterização das lipases

4.2.1. Determinação da massa molecular

Para determinar as massas moleculares das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* purificadas, foi empregada a técnica de SDS-PAGE que fornece tal informação a partir da desnaturação das proteínas.

A Figura 4.1 mostra o resultado do gel de eletroforese realizado com as enzimas estudadas. A lipase de *C. rugosa* (Figura 4.1 (CRL)) apresentou apenas uma banda protéica com massa molecular de aproximadamente 59,7 kDa, valor aproximado ao encontrado pela lipase comercial de *C. rugosa* (Figura 4.1 (CRL_c)).

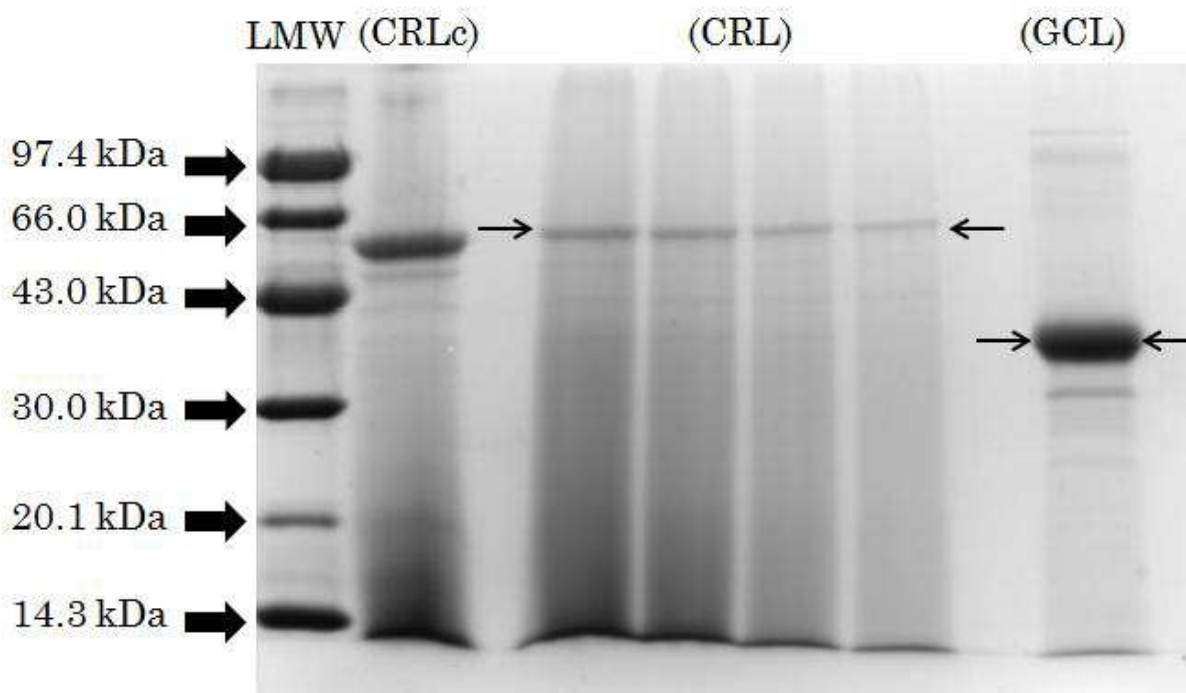


Figura 4.1 – Perfil de eletroforese em SDS-PAGE (5-12%) das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum*. **LMW**: padrões de massas moleculares: fosforilase B (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lactalbumina (14,4 kDa); **(CRL_c)** lipase comercial de *C. rugosa*; **(CRL)** amostra da lipase purificada produzida por *C. rugosa*; **(GCL)** amostra da lipase purificada produzida por *G. candidum*.

A lipase de *G. candidum* (Figura 4.1 (GCL)) apresentou duas bandas protéicas, uma banda suave de aproximadamente 34,0 kDa e uma banda intensa, que representa a lipase desejada, de aproximadamente 38,3 kDa. Em alguns estudos, foram encontradas lipases de *G. candidum* com massa molecular de cerca de 40 kDa. Gopinath *et al.* (2013) produziram uma lipase de *G. candidum* com a massa molecular aparente da enzima purificada de 32 kDa utilizando SDS-PAGE. Cai *et al.* (2009) estudaram duas novas lipases adaptadas de mesófilos *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 com massas moleculares de aproximadamente 41,1 e 35,8 kDa, por SDS-PAGE.

4.2.2. Identificação das Lipases

As duas bandas mostradas anteriormente na Figura 4.1 (colunas CRL e GCL) foram cuidadosamente cortadas e retiradas do gel para serem submetidas à digestão trípica e analisadas por RP-LC-MS/MS, em sistema Easy-nLC II acoplado a um espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap-Velos-Pro como descrito no item 3.3.2. Com 15 sequências de peptídeos e concentração de 12,80%, a proteína da coluna (CRL) (> 50 kDa) foi identificada como uma lipase do tipo 1 (acesso: P20261), a partir do microrganismo *Candida rugosa* (*Candida cylindracea*), de estirpe NRRL Y-17506, com gene LIP1_CANRU. A proteína da coluna (GCL) (> 30 kDa), com 11 sequências de peptídeos e concentração de 27,38%, foi identificada também como uma lipase do tipo 1 (acesso: P17573) de microrganismo *Geotrichum candidum* (*Oospora lactis*) de estirpe NRRL Y-552, com gene LIP1_GEOCN. A partir destes resultados pode-se confirmar que ambas as proteínas produzidas por cada microrganismo eram as proteínas esperadas.

4.2.3. Efeito da temperatura e do pH na estabilidade enzimática

4.2.3.1. Influência da temperatura na estabilidade enzimática

O efeito da temperatura na estabilidade enzimática é um parâmetro muito importante quando se trata de processos que utilizam enzimas como biocatalisadores, e muitas vezes, devido a inativação térmica das enzimas, sua aplicação fica impossibilitada (TERRASAN,

2011). Para a avaliação da termoestabilidade das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum*, a enzima foi incubada sem adição do substrato em meio contendo fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 sob as temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C. O aumento da temperatura levou à diminuição do tempo necessário para que ocorresse desnaturação e conseqüente perda de atividade.

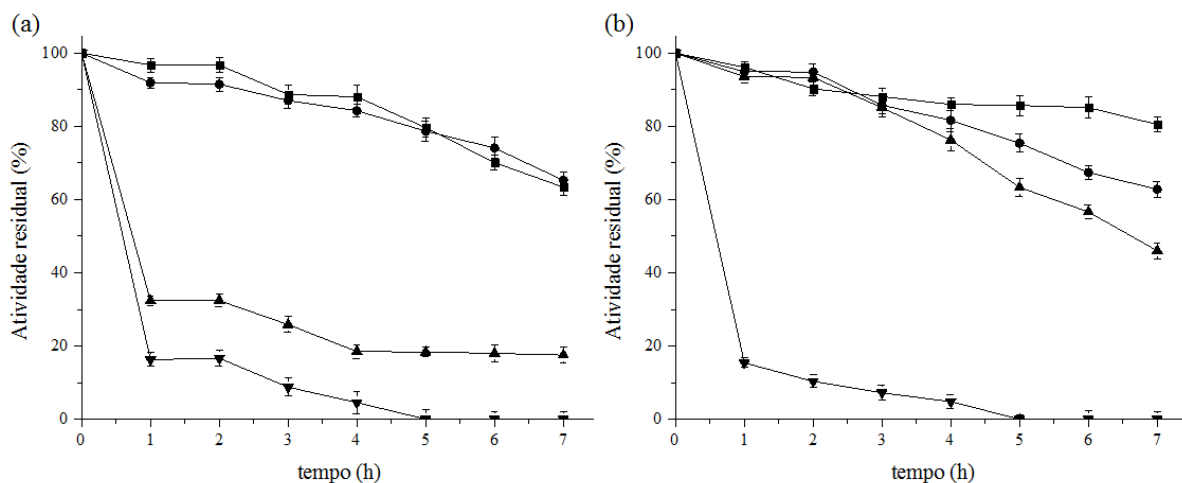


Figura 4.2 – Efeito da temperatura na estabilidade enzimática das lipases em diferentes temperaturas: (■) 30°C, (●) 40°C, (▲) 50°C e (▼) 60°C; (a) lipase de *C. rugosa*; (b) lipase de *G. candidum*.

Na Figura 4.2 pode-se observar o efeito da temperatura na atividade enzimática das lipases. A lipase de *C. rugosa* (Figura 4.2 a) se mostrou mais estável às temperaturas de 30 e 40 °C, quando comparadas às temperatura de 50 e 60 °C, sofrendo uma inativação total menor que 40% ao final das 7 horas de experimento. Já para o teste realizado à 50 °C, esta lipase sofreu inativação de quase 70% na primeira hora de experimento, resultando em uma inativação total de 83,9% após 7 horas, e no teste realizado à 60 °C, a lipase de *C. rugosa* teve sua atividade enzimática reduzida em 83,8% na primeira hora de experimento e foi inativada completamente após 5 horas. Analisando a Figura 4.2 b, observa-se que a lipase de *G. candidum* apresentou um perfil de estabilidade térmica semelhante entre as temperaturas de 30, 40 e 50°C, nas primeiras 3 horas de experimento, porém, após 7 horas, sua atividade enzimática foi reduzida em 20,3% à 30 °C, 42,5% à 40°C e 65,8% à temperatura de 50 °C. Assim como para a lipase de *C. rugosa*, a lipase produzida por *G. candidum* inativou quase que completamente (84,6%) na primeira hora de experimento à temperatura de 60 °C, não apresentando atividade enzimática após 5 horas. A partir dos dados obtidos e plotados nos

gráficos apresentados na Figura 4.2, foram calculados a constante de inativação (K_d) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para as lipases solúveis estudadas utilizando as equações 3.2 e 3.3.

As Tabelas 4.2 e 4.3 apresentam os valores de K_d e $t_{1/2}$ das lipases solúveis calculados pelas equações de desativação térmica de 1ª ordem linearizada (Equação 3.2) e não linearizada (Equação 3.3), respectivamente.

Tabela 4.2 – Parâmetros cinéticos das lipases solúveis calculados pela equação de desativação térmica de 1ª ordem linearizada (Equação 3.2) – Estabilidade térmica.

Lipase	Parâmetro	Temperatura (°C)			
		30	40	50	60
<i>C. rugosa</i>	K_d^* (h^{-1})	0,0508	0,0517	0,5373	1,4773
	$t_{1/2}^*$ (h)	13,64	13,41	1,29	0,47
	R^2	0,88	0,94	0,76	0,96
<i>G. candidum</i>	K_d^* (h^{-1})	0,0324	0,0589	0,0860	1,6750
	$t_{1/2}^*$ (h)	21,39	11,77	8,06	0,41
	R^2	0,89	0,95	0,90	0,98

*Valores calculados pela equação 3.2;

Tabela 4.3 – Parâmetros cinéticos das lipases solúveis calculados pela equação de desativação térmica de 1ª ordem não linearizada (Equação 3.3) – Estabilidade térmica.

Lipase	Parâmetro	Temperatura (°C)			
		30	40	50	60
<i>C. rugosa</i>	K_d^* (h^{-1})	0,0597	0,0522	0,4356	1,4667
	$t_{1/2}^*$ (h)	11,61	13,28	1,59	0,47
	R^2	0,90	0,94	0,79	0,97
<i>G. candidum</i>	K_d^* (h^{-1})	0,0281	0,0651	0,0983	1,6710
	$t_{1/2}^*$ (h)	24,67	10,65	7,05	0,41
	R^2	0,92	0,96	0,93	0,98

*Valores calculados pela equação 3.3;

Nota-se que as lipases de *C. rugosa*, apresentou maior estabilidade às temperaturas de 30 e 40 °C e a lipase de *G. candidum* apresentou maior estabilidade à temperatura de 30 °C, apresentando menores valores de K_d e maiores tempos de meia-vida para ambas as equações.

À 30 e 50 °C os dados de estabilidade térmica da lipase de *C. rugosa* se ajustaram melhor na equação não linearizada (Equação 3.3). Para 30 °C o valor de K_d foi de 0,0597 h⁻¹ e tempo de meia-vida de 11,61 horas, com R^2 de 0,90; para a temperatura de 50 °C o valor de K_d foi de 0,4356 e tempo de meia-vida de 1,59 horas, 7,3 vezes menor em relação ao tempo de meia-vida desta enzima à 30 °C. Avaliando os valores dos coeficientes de determinação (R^2), observa-se que os dados de estabilidade térmica apresentados pela lipase de *C. rugosa* à 50 °C, não se ajustaram bem por nenhuma das equações. À 40 e 60 °C os dados de estabilidade térmica da lipase de *C. rugosa* apresentaram ajustes muito semelhantes entre as equações linearizada e não linearizada, apresentando, à 40 °C, um K_d médio de 0,0520 h⁻¹ e tempo médio de meia vida de 13,35 horas, com R^2 de 0,94, e à 60 °C um tempo médio de meia vida de 0,47 hora e K_d médio de 1,4720 h⁻¹, aproximadamente 25 vezes maior em relação ao tempo de meia vida encontrado à 30 °C, levando à lipase de *C. rugosa* inativar pela metade em menos de uma hora.

Para a lipase de *G. candidum* os dados de estabilidade térmica se ajustaram melhor pela equação de 1ª ordem não linearizada (Equação 3.3) para as temperaturas de 30, 40 e 50 °C, e à 60 °C os ajustes foram os mesmos para ambas as equações. À 30 °C o valor de K_d apresentado foi de 0,0281 h⁻¹ e tempo de meia vida de 24,67 horas, com R^2 de 0,92. Para a temperatura de 40 °C, os valores de K_d e do tempo de meia vida foram respectivamente 0,0651 h⁻¹ e 10,65 horas, valores inferiores aos apresentados pela lipase de *C. rugosa* nesta temperatura. A 50 °C a lipase de *G. candidum* se mostrou 4,4 vezes mais estável que a lipase de *C. rugosa* nesta temperatura, apresentando um K_d de 0,0983 h⁻¹ e tempo de meia vida de 7,05 horas. Finalmente, a 60 °C a lipase de *G. candidum* apresentou comportamento semelhante ao da outra lipase, apresentando um K_d de 1,6750 h⁻¹ e tempo de meia vida de 0,41 hora.

Ramos *et al.* (2015) estudaram a estabilidade térmica da lipase de *G. candidum* em meio contendo óleo de semente de algodão e observou que após esta lipase ter sido incubada à 35°C, sofreu uma inativação de 76,3%, à 40 °C perdeu mais de 50% da sua atividade residual em 1 hora de experimento, e neste mesmo tempo inativou aproximadamente 70% à 45 °C.

A lipase de *Penicillium verrucosum* produzida por fermentação em estado sólido (PINHEIRO, 2006) sofreu hiperativação nas primeiras 4 horas de incubação à 35°C e ao final de 6 horas já apresentava inativação completa, à 45 °C sofreu inativação de 80% em 4 horas de experimento e à 55 °C apresentou atividade residual de 37% em 2 horas de incubação e total inativação nas horas seguintes.

Siqueira (2013) estudou a estabilidade térmica da lipase de *Aspergillus terreus* incubada por 1 hora às temperaturas de 30, 40 e 50 °C. À 30 °C esta lipase sofreu inativação de 80%, à 40 °C se mostrou pouco mais estável apresentando atividade residual de 35% e à 50 °C sua atividade residual diminuiu em 70%.

4.2.3.2. Influência do pH

O efeito do pH sobre a estabilidade das lipases foi analisado entre pH 3,0 e 10,0, e os resultados são apresentados na Figura 4.3. Observa-se que a lipase de *C. rugosa* sofreu hiperativação em meios com pHs de 3,0 a 7,0, inativou menos de 10% em pHs 8,0 e 9,0 e, em pH 10 perdeu 87,3% da sua atividade enzimática. A lipase de *G. candidum* também apresentou hiperativação em meios com pH 5,0 e 6,0. Nota-se um comportamento semelhante em meios com pH 3,0 e 9,0, em que a perda de atividade foi de 22,1% e 20,6%, respectivamente. Embora tenha mostrado-se mais estável em pH 10, quando comparado com a lipase de *C. rugosa*, a lipase de *G. candidum* perdeu 62,1% da sua atividade enzimática em meio a este pH.

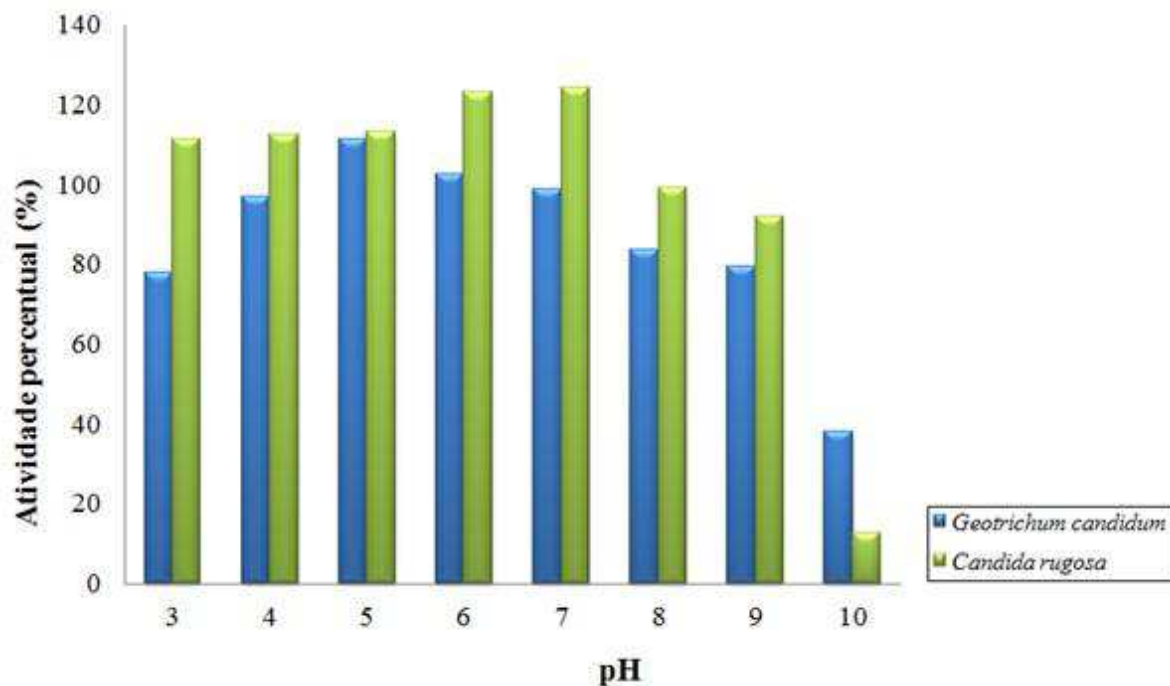


Figura 4.3 – Efeito do pH na estabilidade enzimática das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum*.

O fenômeno da hiperativação, observado em alguns resultados obtidos, ocorre em lipases de modo geral, devido à natureza destas enzimas. Quando o mecanismo de adsorção interfacial interage com uma pequena partícula de um composto hidrofóbico, estes compostos podem aderir facilmente ao sítio ativo da enzima aumentando sua atividade enzimática (PALOMO *et al.*, 2002a).

A lipase de *Bacillus sphaericus* estudada por Tamilarasan e Kumar (2012) apresentou alta estabilidade entre o pH de 6,0 e 9,0, sendo que sua maior atividade residual (aproximadamente 99%) foi em pH 8,0.

Nesta mesma faixa de pH, entre 6,0 e 9,0, pode ser observada alta estabilidade da lipase de *Saccharomyces cerevisiae* (ZENG *et al.*, 2009) que apresentou maior estabilidade, aproximadamente 97%, em pH 7,0.

Comportamento semelhante pode ser observado para a lipase de *Thermomyces lanuginosus* estudada por Mendes *et al.* (2013) que apresentou boa estabilidade entre os valores de pH de 7,0 e 9,0, também apresentando atividade residual de aproximadamente 99% em pH 8,0.

4.2.4. Efeito do reagente EDTA, detergente Triton X-100 e de íons metálicos

A Tabela 4.4 mostra os resultados obtidos nos experimentos realizados a fim de avaliar o efeito do reagente EDTA, do detergente Triton X-100 e dos íons metálicos Cu^{+2} , Ni^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Na^{+} e Fe^{+2} .

Analizando a Tabela 4.4, observa-se que o EDTA hiperativa a lipase de *C. rugosa*, aumentando sua atividade em 16,74% e, por outro lado, este reagente reduz a atividade de lipase de *G. candidum* em aproximadamente 10%.

Tabela 4.4 – Efeito do reagente EDTA, detergente Triton X-100 em diferentes concentrações e dos íons metálicos na atividade de lipases de *C. rugosa* e *G. candidum*.

Inibidor (10mM)	Atividade relativa (%)	
	<i>C.rugosa</i>	<i>G. candidum</i>
Controle	100 ± 0,2	100 ± 0,3
EDTA	116,74 ± 1,1	90,48 ± 0,9
Íon metálico (10mM)		
CuSO ₄	25,72 ± 1,7	45,15 ± 1,1
NiSO ₄	111,60 ± 1,6	92,98 ± 0,9
MgSO ₄	130,21 ± 1,1	102,98 ± 1,7
MnSO ₄	118,71 ± 0,9	93,56 ± 1,3
ZnSO ₄	105,05 ± 1,2	80,02 ± 0,8
Na ₂ SO ₄	115,34 ± 1,7	127,28 ± 1,4
FeSO ₄	56,97 ± 1,3	92,26 ± 1,3
Conc. Triton X-100 (%)		
0,02	121,52 ± 0,5	100,84 ± 0,7
0,20	62,21 ± 0,7	157,41 ± 0,6
1,00	20,21 ± 0,4	12,81 ± 0,3

Observando os resultados obtidos nos testes com os íons metálicos, nota-se que a lipase de *C. rugosa* perdeu atividade apenas na presença da solução 10 mM de CuSO₄ (74,28%) e FeSO₄ (43,03%), enquanto na presença das outras soluções 10 mM, esta lipase foi hiperativada aumentando sua atividade em 11,60% na presença de NiSO₄, 30,21% na presença de MgSO₄, 18,71% na presença de MnSO₄, 5,05% na presença de ZnSO₄ e 15,34% na presença de Na₂SO₄, como mostra a Tabela 4.4. Já para a lipase de *G. candidum*, observa-se que atividade enzimática sofre diferentes efeitos na presença de íons metálicos. Quando em presença de solução de 10 mM de NiSO₄, MnSO₄ e FeSO₄ esta lipase perdeu cerca de 7,0% da sua atividade, e na presença de solução CuSO₄ 10 mM, foi inativada em 54,8%, enquanto que na presença de solução MgSO₄ e Na₂SO₄ 10 mM ocorreu hiperativação e sua atividade enzimática foi aumentada em 2,98% e 27,28%, respectivamente (Tabela 4.4).

Avaliando-se o efeito do detergente Triton X-100 na atividade das lipases, nota-se que a lipase de *C. rugosa* sofreu inativação de 37,79% e 79,79% na presença de Triton X-100 0,2% e 1,0%, respectivamente, enquanto que na presença deste detergente a concentração de 0,02%, sua atividade enzimática aumentou em 21,52% (Tabela 4.4). Para a lipase de *G. candidum*, a adição de Triton X-100 1% inativou esta enzima em 87,19% enquanto que na presença deste detergente a uma concentração de 0,2% sua atividade foi aumentada em 57,41% e, na concentração de 0,02% não houve alteração significativa na atividade enzimática da lipase de *G. candidum* (Tabela 4.4).

4.2.5. Determinação dos parâmetros cinéticos aparentes (K_m e $V_{m\acute{a}x}$)

A fim de compreender melhor o mecanismo de ação das enzimas, realizou-se o estudo de seus parâmetros cinéticos. Porém, este estudo se torna difícil quando se trata de lipases, uma vez que seus substratos são insolúveis em água, estas enzimas atuam na interface orgânica-aquosa formando agregados moleculares. Sendo assim, a concentração efetiva de substrato corresponde ao número de moléculas por unidade de superfície, e não ocorre o aumento desta concentração pelo aumento de moléculas do substrato (VERGER, 1980).

Com o objetivo de comparar os perfis cinéticos de enzimas aplicadas na hidrólise de substratos solúveis e insolúveis, Sarda e Desnuelle (1958) estudaram a hidrólise de triacetina por esterase hepática de cavalo e lipase pancreática suína. A esterase apresentou uma relação hiperbólica entre a concentração de substrato e a atividade enzimática, comportamento michaeliano, enquanto a lipase apresentou um perfil sigmoide (não-micheliano) com significativo aumento da atividade após o limite de solubilidade do substrato.

Os parâmetros cinéticos aparentes (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* foram calculados a partir da construção das curvas (Figura 4.4) pelo método de Michaelis-Menten linearizado pela equação de Lineweaver-Burk (duplo recíproco) (Equação 3.4). As curvas linearizadas são representadas pela Figura 4.5.

Diferente do comportamento apresentado pela lipase pancreática suína (SARDA e DESNUELLE, 1985), as lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* produzidas em meio contendo melaço de soja apresentaram um comportamento micheliano (Figura 4.4), isso porque os resultados dependem das condições de misturas, por isso não se pode saber a quantidade real

de enzima que está efetivamente ligada ao substrato, então, os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ calculados para as lipases, são valores aparentes

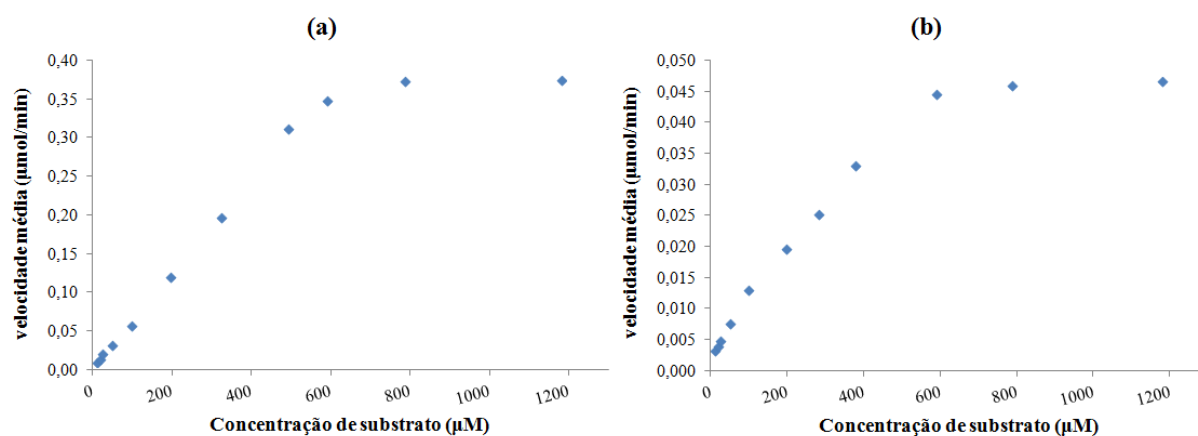


Figura 4.4 – Curva da cinética de Michaelis-Menten das lipases reagindo com diferentes concentrações de substrato *p*-NPB. (a) *C. rugosa*; (b) *G. candidum*.

A lipase de *C. rugosa* (Figura 4.5 a) apresentou um K_m de 200,53 μmol e $V_{m\acute{a}x}$ de 0,044 μmol/min, enquanto que a lipase de *G. candidum* (Figura 4.5 b) apresentou K_m de 443,99 μmol e $V_{m\acute{a}x}$ de 0,382 μmol/min.

O parâmetro K_m está relacionado com a afinidade da enzima e o substrato, quanto menor for o valor de K_m , maior será a afinidade da enzima pelo substrato (NEILANDS e STUMPF, 1955). O parâmetro $V_{m\acute{a}x}$ é o valor máximo da velocidade inicial quando todos os sítios ativos da enzima estão ocupados pelo substrato (WILSON e WALKER, 2010). Neste caso, a partir dos resultados obtidos, podemos dizer que a lipase de *C. rugosa* tem 3,6 vezes mais afinidade ao *p*-NPB que a lipase de *G. candidum*. Porém, analisando os resultados de $V_{m\acute{a}x}$, observa-se que a lipase *C. rugosa* tem um poder catalítico 11,3 vezes menor que a lipase de *G. candidum*.

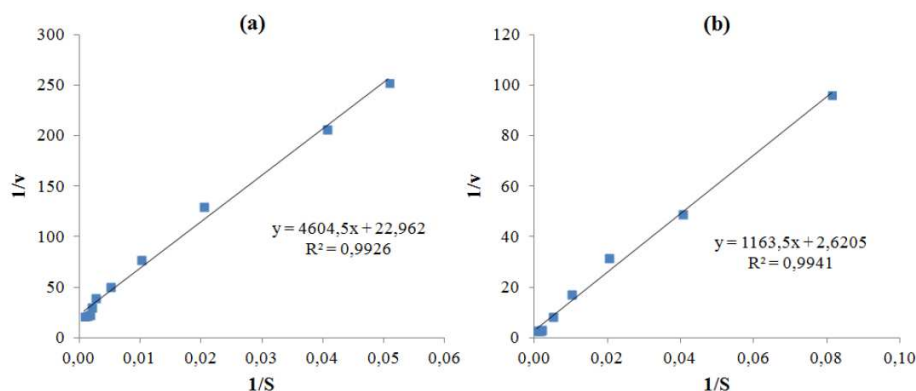


Figura 4.5 – Efeito das diferentes concentrações de substrato *p*-NPB na atividade de lipase. (a) *C. rugosa*; (b) *G. candidum*.

4.3. Estudo da Imobilização das lipases

4.3.1. Imobilização das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* em diferentes suportes

A Tabela 4.5 mostra os resultados obtidos após imobilizar as lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* em diferentes suportes.

Tabela 4.5 – Imobilização das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* em diferentes suportes.

Suportes	<i>Candida rugosa</i>			<i>Geotrichum candidum</i>		
	Rendimento Imobilização (%)	Atividade Recuperada (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento Imobilização (%)	Atividade Recuperada (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Octil	45,88 ± 1,89	3,05 ± 0,13	2,29 ± 0,09	74,34 ± 2,17	7,49 ± 0,33	4,14 ± 0,18
CNBr	67,98 ± 1,73	4,51 ± 0,11	3,39 ± 0,08	67,25 ± 1,73	6,77 ± 0,56	3,74 ± 0,31
MANAE	88,47 ± 1,04	5,87 ± 0,26	4,41 ± 0,19	92,94 ± 3,19	9,36 ± 0,97	5,17 ± 0,53
DEAE	98,05 ± 0,98	6,51 ± 0,27	4,89 ± 0,20	99,06 ± 0,53	9,98 ± 0,38	5,51 ± 0,21
Carboximetil	97,36 ± 1,07	6,46 ± 0,24	4,86 ± 0,18	98,37 ± 1,14	9,91 ± 0,59	5,47 ± 0,32
Sulfopropil	87,97 ± 1,11	5,84 ± 0,17	3,39 ± 0,13	99,42 ± 1,21	10,01 ± 0,72	5,53 ± 0,40
AMG	82,68 ± 1,28	5,49 ± 0,19	4,13 ± 0,14	91,23 ± 0,81	9,19 ± 0,44	5,08 ± 0,24

As atividades foram medidas pelo ensaio com p-NPB, descrito na seção 3.2. A atividade de lipase solúvel oferecida para a imobilização foi considerada 100%.

Pode-se observar que a lipase de *G. candidum* tem maior afinidade ao suporte hidrofóbico octil quando se compara com os resultados obtidos pela lipase de *C. rugosa* imobilizada neste mesmo suporte. A primeira teve um rendimento de imobilização de quase 75% (Tabela 4.5) enquanto a outra não alcançou uma imobilização de 50% da lipase oferecida ao processo.

Embora o procedimento de imobilização das lipases em suporte CNBr tenha sido diferente dos outros (em relação à temperatura e ao tempo), os resultados mostram que a lipase de ambos os microrganismos obtiveram quase a mesma percentagem de imobilização neste suporte (aproximadamente 70%).

A Tabela 4.5 mostra que, após incubar a lipase de *C. rugosa* por algumas horas, esta enzima mostrou uma elevada afinidade com os suportes DEAE, MANAE e AMG, sendo que em suporte DEAE, após 3 horas de incubação, a lipase foi imobilizada quase que totalmente ($98,05 \pm 0,98\%$). A mesma afinidade pelos suportes DEAE, MANAE e AMG pode ser observada pela lipase de *G. candidum*, sendo que no suporte DEAE a imobilização foi quase que completa ($99,06 \pm 0,53\%$) após 1 hora de incubação. A elevada afinidade destas lipases com os suportes aniônicos MANAE e DEAE, pode ser atribuída à predominância de grupos reativos carregados positivamente na superfície destas enzimas.

Isso pôde ser concluído ao observar os resultados de imobilização das lipases em suportes catiônicos carboximetil e sulfopropil. A princípio, após 5 horas de incubação das enzimas de ambos os microrganismos com tais suportes, não houve nenhum efeito de imobilização. Isto pode ser atribuído à ausência de grupos reativos, tais como grupos amina (com carga positiva) na superfície das enzimas, por isso não apresentaram qualquer afinidade com este tipo de suporte.

A fim de realizar a imobilização das lipases nos suportes catiônicos carboximetil e sulfopropil, aplicou-se a técnica de aminação química com o bjetivo de enriquecer as superfícies das enzimas com grupos amino. Este protocolo foi descrito na seção 3.7.4.

As atividades enzimáticas das enzimas aminadas aparentemente não foram afetadas por este tratamento. Após a aminação química, a lipase de *C. rugosa* apresentou uma atividade de 5,32 U/mL, o que corresponde a 80,12% do total da atividade inicial e, a lipase de *G. candidum*, apresentou uma atividade de 9,84 U/mL, o que corresponde a 97,76% da atividade enzimática total antes da aminação química.

Cada uma das lipases aminadas foi incubada com os suportes carboximetil e sulfopropil. Os resultados mostram que a imobilização de ambas as enzimas foi conseguida nestes suportes após 1 hora de incubação, permitindo uma recuperação maior que 87% (Tabela 4.5). Em ambos os casos, observou-se que a enzima foi rapidamente imobilizada e não apresentou inativação significativa.

Estes resultados demonstram claramente a melhoria no processo de imobilização pela introdução de grupos amina positivos na superfície enzimática das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* produzidas em meio contendo melaço de soja.

Um procedimento de aminação semelhante foi aplicado à lipase de *Thermomyces lanuginosus* antes de ser imobilizado em suporte de glioxil agarose. Após o tratamento, a imobilização ocorreu rapidamente com recuperação de 70% da atividade (RODRIGUES *et al.*, 2009).

4.3.2. Caracterização dos derivados imobilizados

4.3.2.1. Efeito do pH

O efeito do pH sobre a atividade dos derivados imobilizados das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* foi analisado entre pH 3,0 e 10,0, e os resultados apresentados nas Figuras 4.6 e 4.7, respectivamente.

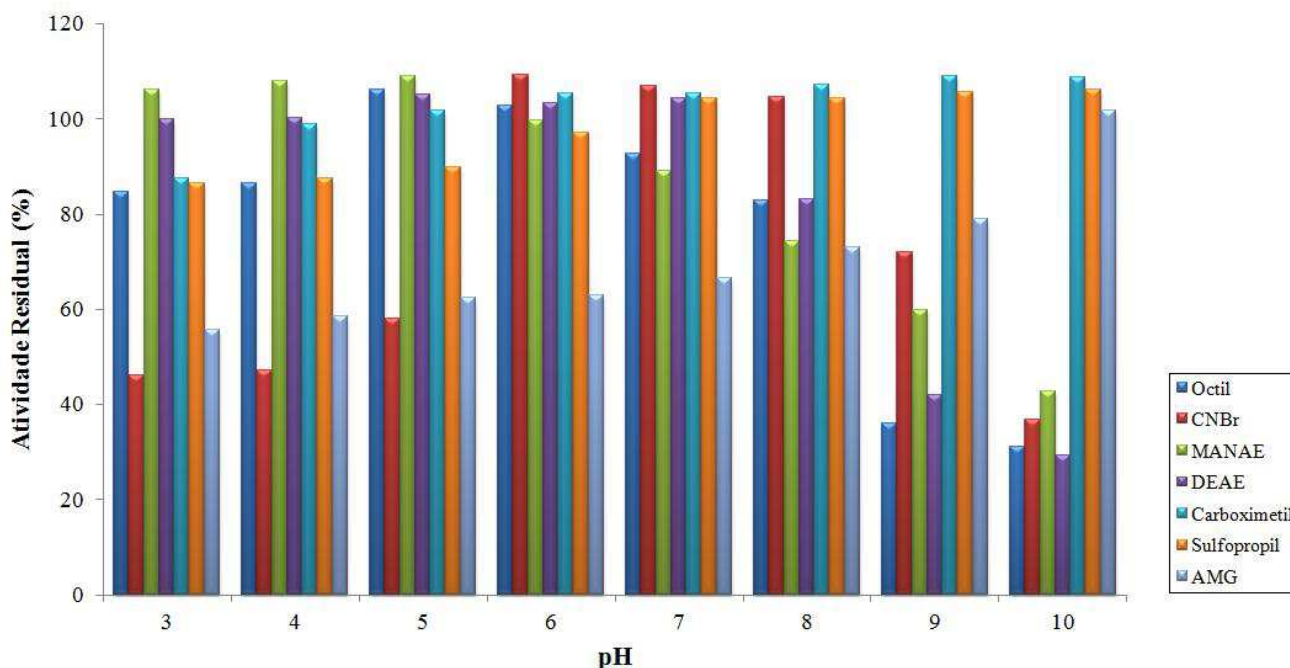


Figura 4.6 – Efeito do pH na estabilidade enzimática da lipase de *C. rugosa* imobilizada em diferentes suportes.

Analisando a Figura 4.6, observa-se que a lipase de *C. rugosa* imobilizada em octil manteve uma atividade residual superior a 80% em pHs entre 3,0 e 8,0, sendo que em pH 5,0 e 6,0 ocorreu hiperativação e sua atividade aumentou em 6,24% e 2,89%, respectivamente. Por outro lado houve uma perda de quase 70% da atividade residual em pH 9,0 e 10,0. Os resultados mostraram que entre os valores de pH 6,0 e 8,0, o derivado CNBr alcançou um atividade residual superior a 100% (ocorreu hiperativação) e sua maior inativação ocorreu em pH 10,0 alcançando uma atividade residual de apenas 36,91%. A lipase de *C. rugosa* imobilizada nos suportes aniônicos DEAE e MANAE, sofreu hiperativação resultando em uma atividade residual maior que 100% quando incubadas em pH ácido e, acima de pH 8, observa-se uma inativação da enzima maior que 45% para ambos os derivados. Analisando os

resultados obtidos pela incubação do derivado carboximetil em diferentes pHs, nota-se uma boa estabilidade em todos os experimentos, sendo que nos pHs ácidos de 3,0 e 4,0 houve uma baixa inativação (12,45% e 1,17%, respectivamente) e entre os valores de pH 5,0 e 10,0 a atividade residual foi maior que 100%. Resultados semelhantes podem ser observados para o derivado sulfopropil, que resultou em uma inativação máxima de 13,57% em pH 3,0 e, a partir do pH 7,0 ocorreu aumento da atividade residual inicial. Diferente do que observa-se nos resultados obtidos com os outros derivados, o derivado AMG obteve maior atividade residual em pH alcalino, atingindo uma atividade de 95,94% em pH 10,0.

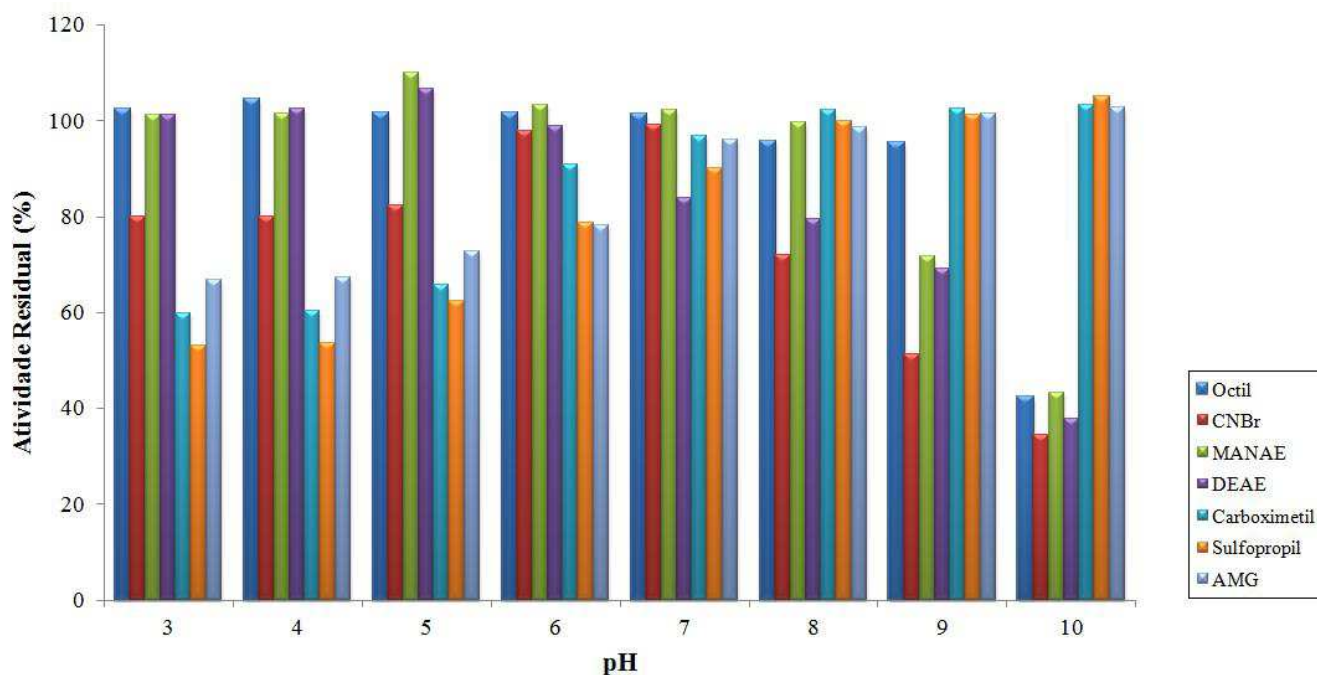


Figura 4.7 – Efeito do pH na estabilidade enzimática da lipase de *G. candidum* imobilizada em diferentes suportes.

Analisando a Figura 4.7, observa-se que o derivado da lipase de *G. candidum* imobilizado em octil sofreu uma considerável inativação (57,68%) em pH 10,0, mantendo-se a atividade residual superior a 90% em outros valores de pH. O mesmo comportamento pode ser observado para o derivado CNBr que manteve sua atividade residual superior a 80% em valores de pH entre 4,0 a 7,0 e, inativou 48,83% em pH 9 e 65,49% em pH 10,0. Como para a lipase de *C. rugosa* imobilizada em MANAE e DEAE, a atividade residual dos derivados da lipase de *G. candidum* imobilizada nestes suportes foram superiores em pH ácido. No entanto, o derivado MANAE mostrou-se mais estável quando comparado ao derivado DEAE a um pH de 7,0 a 9,0, sendo que sua maior inativação (56,69%) ocorreu em pH 10. Diferente do que ocorre com os derivados da lipase de *C. rugosa* imobilizada nos suportes catiônicos

carboximetil e sulfopropil, a lipase de *G. candidum* imobilizada nestes suportes sofreram uma inativação de aproximadamente 40% em pHs ácidos e, a partir do pH 8,0, sofreram hiperativação. Analisando os resultados obtidos com o derivado AMG, nota-se um perfil semelhante ao do obtido pela lipase de *C. rugosa* imobilizada neste suporte. A Figura 4.7 mostra que a atividade residual da *G. candidum* imobilizada em AMG foi maior em pH alcalino, alcançando uma atividade residual de 95,94% em pH 10.

Ramos *et al.* (2014) estudaram a imobilização da lipase de *C. rugosa* em bentonite modificado com cloreto de benziltriethylamônio melhorando a estabilidade para esta enzima em pH entre 5,5 e 7,0.

A lipase de *G. candidum* imobilizada em partículas de polihidroxibutirato (RAMOS *et al.*, 2015) apresentou atividade residual média de 65% em pH 5,0 e 6,0, em pH 7,0 a atividade residual diminuiu em aproximadamente 20% e sofreu total inativação em pH 9,0.

Cipolatti *et al.* (2015) mostraram que a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em suporte de poliuretano com polietileno glicol 6000 não apresentou inativação significativa em um intervalo de pH de 4,0 a 10,0.

4.3.2.2. Efeito da temperatura

Um aumento de temperatura geralmente corresponde a um aumento na taxa de reação por unidade de enzima, influenciando na atividade enzimática. Além desse aumento, o tempo de exposição da enzima à determinadas temperaturas pode promover uma elevação na taxa de inativação térmica da lipase, consequentemente, reduzindo a formação do produto (GOMES *et al.*, 2006). O efeito da temperatura na atividade das lipases imobilizadas em diferentes suportes foi avaliada pela incubação de cada enzima com tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0 nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C durante 7 horas.

As Figuras 4.8, 4.9 e 4.10 mostram os perfis de estabilidade térmica dos derivados imobilizados incubados à 30, 40 e 50 °C, respectivamente.

A Figura 4.8 mostra que a estabilidade dos derivados imobilizados das lipases de ambos os microrganismos foi maior que 50% nos testes realizados à 30°C. No entanto, a estabilidade da lipase de *G. candidum* imobilizada nos suportes estudados (Figura 4.8 b) foi maior em relação à estabilidade dos derivados da lipase de *C. rugosa* (Figura 4.8 a) à esta temperatura. A lipase de *G. candidum* imobilizada em CNBr, nos suportes aniônicos (DEAE e MANAE), nos suportes catiônicos (carboximetil e sulfopropil) e em suporte heterofuncional

(AMG) teve a estabilidade maior que 90% durante as 7 horas de experimento. Já para os derivados imobilizados da lipase de *C. rugosa*, nota-se que a estabilidade manteve-se maior que 80% durante as 7 horas de experimento, com excessão do derivado AMG que inativou 29,91% nas primeiras 6 horas e alcançando uma atividade residual de 63,34% em 7 horas.

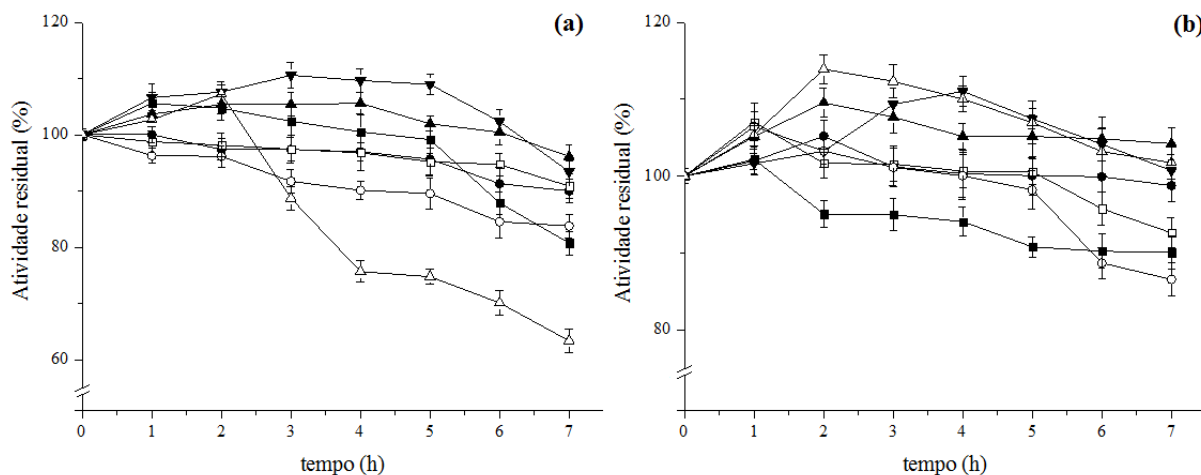


Figura 4.8 – Efeito da temperatura na estabilidade enzimática das lipases imobilizadas em diferentes suportes. (a) *C. rugosa*; (b) *G. candidum*. Os experimentos foram realizados à 30°C em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0. (■) Octil; (●) CNBr; (▲) MANAE; (▼) DEAE; (□) Carboximetil; (○) Sulfopropil, (Δ) AMG.

A Figura 4.9 mostra os resultados obtidos nas experiências realizadas a 40 °C. Analisando a Figura 4.9 (a), observa-se que a lipase de *C. rugosa* imobilizada em suporte AMG quando incubada à 40 °C, sofre uma inativação de 10,41% na primeira hora alcançando uma atividade residual de 62,89% da atividade inicial, em 7 horas de incubação. Assim como observado nos testes realizados à 30 °C, o derivado AMG desta enzima foi o menos estável quando comparado com a atividade residual dos derivados imobilizados nos outros suportes. Os derivados octil e CNBr apresentaram perfis de estabilidade semelhantes, sendo inativados aproximadamente 20% em 7 horas de incubação à 40 °C. Já os suportes iônicos (MANAE, DEAE, carboximetil e sulfopropil) apresentaram perfis de estabilidade semelhantes, estes não sofreram inativação significativa alcançando uma atividade residual maior que 90% ao final do experimento. A Figura 4.9 (b) mostra que a lipase de *G. candidum* imobilizada em octil é mais instável quando comparada aos outros derivados, tendo sua atividade residual diminuída em 25,62% na primeira hora de incubação alcançando uma atividade residual de 54,05% ao final do teste. Os derivados CNBr, MANAE, DEAE, carboximetil, sulfopropil e AMG apresentaram perfis de estabilidade semelhantes, observa-se o efeito de hiperativação nestes derivados nas primeiras 5 horas de experimento, e a partir da sexta hora, ocorreu uma baixa

inativação nos derivados CNBr, DEAE, carboximetil e sulfopropil que alcançaram uma atividade residual final de 82,82%, 92,19%, 93,26% e 89,82%, respectivamente. Os derivados MANAE e AMG não sofreram inativação significativa em 7 horas incubados à 40 °C.

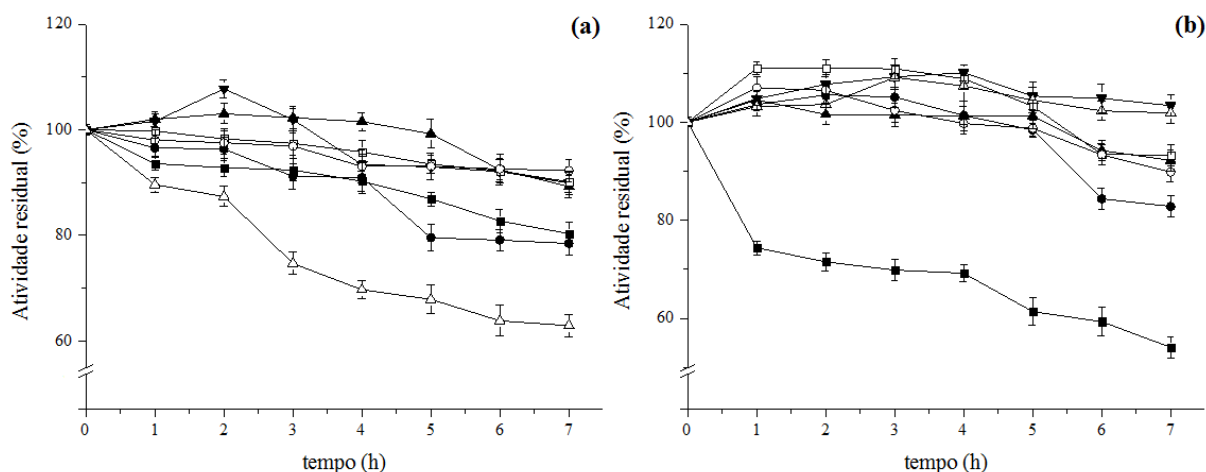


Figura 4.9 – Efeito da temperatura na estabilidade enzimática das lipases imobilizadas em diferentes suportes. (a) *C. rugosa*; (b) *G. candidum*. Os experimentos foram realizados à 40°C em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0. (■) Octil; (●) CNBr; (▲) MANAE; (▼) DEAE; (□) Carboximetil; (○) Sulfopropil, (Δ) AMG.

Os resultados obtidos nos experimentos realizados à 50 °C são apresentados na Figura 4.10.

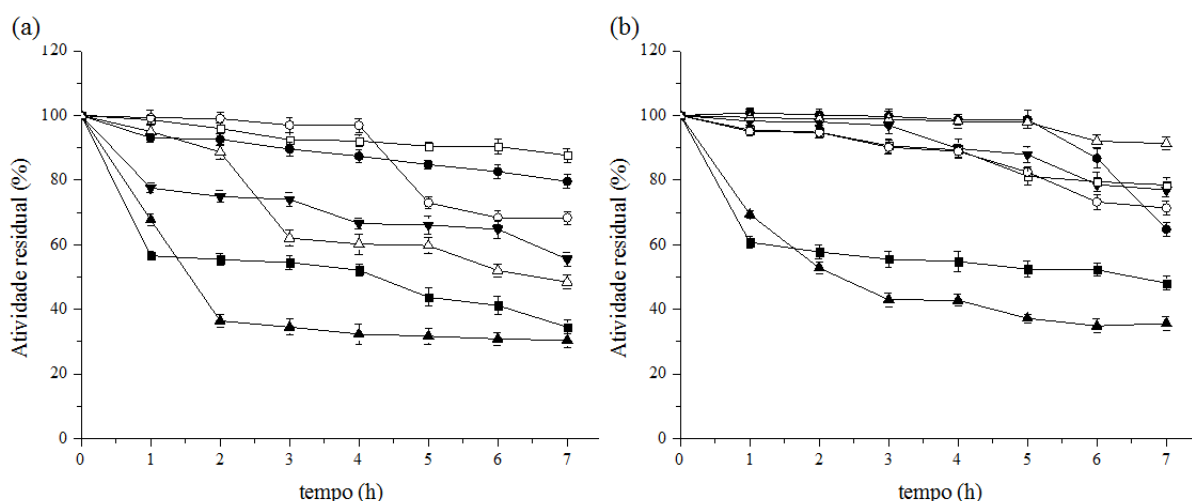


Figura 4.10 – Efeito da temperatura na estabilidade enzimática das lipases imobilizadas em diferentes suportes. (a) *C. rugosa*; (b) *G. candidum*. Os experimentos foram realizados à 50°C em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0. (■) Octil; (●) CNBr; (▲) MANAE; (▼) DEAE; (□) Carboximetil; (○) Sulfopropil, (Δ) AMG.

A Figura 4.10 (a) mostra que para a lipase de *C. rugosa* imobilizada, o derivado mais estável é o carboximetil que, em 7 horas de incubação sofreu uma inativação de apenas 12,35%, o derivado CNBr também mostrou-se com boa estabilidade alcançando uma atividade residual de 79,57%, seguido do derivado sulfopropil que alcançou uma atividade residual de 68,34% ao final do experimento. Por outro lado, os derivados octil e MANAE foram fortemente inativados na primeira hora de incubação à 50 °C, o derivado octil teve sua atividade residual reduzida em 65,50% e o derivado DEAE em 69,61%. Os derivados DEAE e AMG apresentaram perfis de estabilidade semelhantes a partir da terceira hora de experimento e alcançaram uma atividade residual de 55,51% e 48,42%, respectivamente.

A Figura 4.10 (b) mostra que a maior estabilidade à 50°C para a lipase *G. candidum* imobilizada foi obtida para o derivado AMG que teve sua atividade residual reduzida em apenas 8,70% em 7 horas de incubação. O derivado MANAE foi o mais instável sofrendo grande inativação nas primeiras 2 horas atingindo uma atividade residual de 35,63% no final do experimento, assim como o derivado octil que perdeu 39,25% da sua atividade após 1 hora de incubação à 50 °C, finalizando com uma atividade residual de 48,09%. Os derivados DEAE, carboximetil e sulfopropil apresentaram perfis de estabilidade semelhantes e alcançaram uma atividade residual de 76,94%, 78,49% e 71,39%, respectivamente.

A partir dos dados obtidos e plotados nos gráficos apresentados nas Figuras 4.8 e 4.9, foram calculados a constante de inativação (K_d) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para as lipases solúveis estudadas utilizando as Equações 3.2 e 3.3.

As Tabelas 4.6 e 4.8 apresentam os valores de K_d e $t_{1/2}$ das lipases solúveis calculados pelas equações de desativação térmica de 1ª ordem linearizada (Equação 3.2). As Tabelas 4.7 e 4.9 apresentam os valores de K_d e $t_{1/2}$ das lipases solúveis calculados pelas equações de desativação térmica de 1ª ordem não linearizada (Equação 3.3), respectivamente.

As Tabela 4.6 e 4.7 apresentam os valores de K_d e $t_{1/2}$ dos derivados imobilizados da lipase de *C. rugosa*. A partir dos coeficientes de determinação (R^2) dos valores de K_d e $t_{1/2}$, observa-se que os dados de estabilidade térmica obtidos pelos derivados imobilizados em octil, CNBr, MANAE, DEAE, carboximetil e AMG se ajustaram melhor à equação de 1ª ordem não-linearizada (Equação 3.3) e os dados de estabilidade térmica obtidos pelo derivado sulfopropil se ajustaram melhor à equação de 1ª ordem linearizada (Equação 3.2).

Tabela 4.6 – Parâmetros cinéticos da lipase de *C. rugosa* calculados pela equação de desativação térmica de 1ª ordem linearizada – Estabilidade térmica.

Derivado	Parâmetro	Temperatura (°C)		
		30	40	50
Octil	K_d^* (h ⁻¹)	0,0136	0,0303	0,1847
	$t_{1/2}^*$ (h)	50,97	22,88	3,75
	R^2	0,37	0,94	0,62
CNBr	K_d^* (h ⁻¹)	0,0125	0,0355	0,0335
	$t_{1/2}^*$ (h)	55,45	19,52	20,69
	R^2	0,85	0,91	0,95
MANAE	K_d^* (h ⁻¹)	-0,0072	0,0115	0,0906
	$t_{1/2}^*$ (h)	-	60,27	7,65
	R^2	0	0,45	0,72
DEAE	K_d^* (h ⁻¹)	-0,0027	0,0095	0,2839
	$t_{1/2}^*$ (h)	-	92,42	2,44
	R^2	0	0,35	0,77
Carboximetil	K_d^* (h ⁻¹)	0,0107	0,0131	0,0193
	$t_{1/2}^*$ (h)	64,78	52,91	35,91
	R^2	0,91	0,94	0,95
Sulfopropil	K_d^* (h ⁻¹)	0,0257	0,0132	0,0451
	$t_{1/2}^*$ (h)	26,97	52,51	15,37
	R^2	0,96	0,94	0,95
AMG	K_d^* (h ⁻¹)	0,0550	0,0772	0,1100
	$t_{1/2}^*$ (h)	12,60	8,98	6,30
	R^2	0,77	0,94	0,92

*Valores calculados pela equação 3.2.

Tabela 4.7 – Parâmetros cinéticos da lipase de *C. rugosa* calculados pela equação de desativação térmica de 1ª ordem não-linearizada – Estabilidade térmica.

Derivado	Parâmetro	Temperatura (°C)		
		30	40	50
Octil	K_d^* (h ⁻¹)	0,0757	0,0279	0,0749
	$t_{1/2}^*$ (h)	13,16	24,84	10,25
	R^2	0,92	0,94	0,88
CNBr	K_d^* (h ⁻¹)	0,0216	0,0384	0,0298
	$t_{1/2}^*$ (h)	35,09	18,05	23,26
	R^2	0,90	0,92	0,97
MANAE	K_d^* (h ⁻¹)	0,0525	0,0124	0,0486
	$t_{1/2}^*$ (h)	17,20	59,90	15,26
	R^2	0,88	0,89	0,91
DEAE	K_d^* (h ⁻¹)	0,0296	0,0456	0,2397
	$t_{1/2}^*$ (h)	27,42	19,20	2,89
	R^2	0,97	0,96	0,81
Carboximetil	K_d^* (h ⁻¹)	0,0115	0,0152	0,0185
	$t_{1/2}^*$ (h)	60,27	45,60	37,47
	R^2	0,90	0,97	0,96
Sulfopropil	K_d^* (h ⁻¹)	0,0252	0,0124	0,0591
	$t_{1/2}^*$ (h)	27,51	55,90	8,36
	R^2	0,97	0,91	0,85
AMG	K_d^* (h ⁻¹)	0,0764	0,0719	0,1153
	$t_{1/2}^*$ (h)	12,07	9,64	6,01
	R^2	0,92	0,96	0,93

*Valores calculados pela equação 3.3.

Assim como para a lipase de *C. rugosa* solúvel, que apresentou tempo de meia vida de 11,61 horas à 30 °C, o derivado imobilizado em carboximetil apresentou maior estabilidade à esta temperatura com tempo de meia vida de 60,27 horas, 5,2 vezes maior que a lipase de *C. rugosa* solúvel. O derivado imobilizado em octil apresentou um K_d de 0,0279 h⁻¹, 1,9 vezes mais estável que à 30 °C. Para a temperatura de 40 °C, os derivado imobilizado em CNBr

apresentou K_d de $0,0384 \text{ h}^{-1}$ aumentando o tempo de meia vida da enzima em aproximadamente 5 horas em relação à enzima solúvel.

Analisando a Tabela 4.7 nota-se que, os suportes MANAE e DEAE, apesar de serem suportes aniônicos, apresentaram perfis diferentes nas temperaturas estudadas. À 30°C , o derivado MANAE apresentou um tempo de meia vida de 17,20 horas, já o derivado DEAE apresentou um tempo de meia vida de 27,42 horas, 2,1 vezes maior que o apresentado pela enzima solúvel. À 40°C , o derivado imobilizado em MANAE apresentou maior estabilidade, com tempo de meia vida de 59,90 horas, 3,1 vezes maior que o tempo de meia vida apresentado pelo derivado DEAE e 4,5 vezes maior que o tempo de meia vida da enzima solúvel à esta temperatura. À 50°C , nota-se que o derivado imobilizado em MANAE apresentou tempo de meia vida de 15,26 horas, 9,6 vezes maior que o tempo de meia vida apresentado pela lipase de *C. rugosa* solúvel nesta temperatura; o derivado DEAE apresentou tempo de meia vida de 2,89 horas, menor em relação ao tempo apresentado pelo derivado MANAE.

À 30°C , o derivado carboximetil apresentou o maior tempo de meia vida (60,27 horas) quando comparado aos outros derivados e 5,2 vezes maior que o tempo de meia vida da lipase de *C. rugosa* solúvel nesta temperatura. Já para o derivado sulfopropil, o maior tempo de meia vida apresentado foi de 52,51 horas à temperatura de 40°C . À 50°C , o derivado carboximetil apresentou o maior tempo de meia vida quando comparado aos outros derivados, 23,6 vezes maior que o tempo de meia vida apresentado pela lipase de *C. rugosa* solúvel.

A lipase de *C. rugosa* imobilizada em AMG apresentou tempo de meia vida de 12,07 horas, semelhante ao da enzima solúvel a 30°C . À 40°C a estabilidade deste derivado foi 1,4 vezes menor que o da enzima solúvel, apresentando um tempo de meia vida de 9,64 horas. Já na temperatura de 50°C o derivado AMG apresentou um tempo de meia vida 3,8 maior que o da enzima solúvel.

As Tabelas 4.8 e 4.9 apresentam os valores de K_d e $t_{1/2}$ dos derivados imobilizados da lipase de *G. candidum*. Assim como para os dados de estabilidade térmica apresentados para esta enzima solúvel, a partir dos coeficientes de determinação (R^2) dos valores de K_d e $t_{1/2}$, observa-se que os resultados obtidos pelos seus derivados imobilizados em todos os suportes estudados se ajustaram melhor à equação de 1ª ordem não-linearizada (Equação 3.3), apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.8 – Parâmetros cinéticos da lipase de *G. candidum* calculados pela equação de desativação térmica de 1ª ordem linearizada (Equação 3.2) – Estabilidade térmica.

Derivado	Parâmetro	Temperatura (°C)		
		30	40	50
Octil	K_d^* (h ⁻¹)	0,0165	0,1007	0,1459
	$t_{1/2}^*$ (h)	42	6,88	4,75
	R^2	0,83	0,69	0,32
CNBr	K_d^* (h ⁻¹)	-0,0006	0,0135	0,0251
	$t_{1/2}^*$ (h)	-	51,34	27,61
	R^2	0	0,35	0,43
MANAE	K_d^* (h ⁻¹)	-0,0101	-0,0115	0,0313
	$t_{1/2}^*$ (h)	-	-	22,14
	R^2	0	0	0,84
DEAE	K_d^* (h ⁻¹)	-0,0105	0,0047	0,2157
	$t_{1/2}^*$ (h)	-	147	3,21
	R^2	0	0,24	0,83
Carboximetil	K_d^* (h ⁻¹)	0,0041	-0,0021	0,0357
	$t_{1/2}^*$ (h)	169	-	19,41
	R^2	0,18	0	0,96
Sulfopropil	K_d^* (h ⁻¹)	0,0112	0,0066	0,0428
	$t_{1/2}^*$ (h)	61,88	105	16,19
	R^2	0,41	0,24	0,92
AMG	K_d^* (h ⁻¹)	-0,0119	-0,0081	0,0097
	$t_{1/2}^*$ (h)	-	-	71,46
	R^2	0	0	0,70

*Valores calculados pela equação 3.2.

Tabela 4.9 – Parâmetros cinéticos da lipase de *G. candidum* calculados pela equação de desativação térmica de 1ª ordem não-linearizada – Estabilidade térmica.

Derivado	Parâmetro	Temperatura (°C)		
		30	40	50
Octil	K_d^* (h ⁻¹)	0,0132	0,0342	0,0502
	$t_{1/2}^*$ (h)	54,51	21,27	14,81
	R^2	0,89	0,96	0,93
CNBr	K_d^* (h ⁻¹)	0,0065	0,0761	0,1992
	$t_{1/2}^*$ (h)	109,64	13,11	8,48
	R^2	0,83	0,90	0,95
MANAE	K_d^* (h ⁻¹)	0,0045	0,0477	0,1816
	$t_{1/2}^*$ (h)	159,03	19,53	3,82
	R^2	0,97	0,92	0,88
DEAE	K_d^* (h ⁻¹)	0,0324	0,0093	0,0438
	$t_{1/2}^*$ (h)	25,39	79,53	16,83
	R^2	0,99	0,90	0,91
Carboximetil	K_d^* (h ⁻¹)	0,0295	0,0574	0,0365
	$t_{1/2}^*$ (h)	27,50	16,08	18,99
	R^2	0,90	0,91	0,96
Sulfopropil	K_d^* (h ⁻¹)	0,0534	0,0323	0,0467
	$t_{1/2}^*$ (h)	16,98	24,46	14,84
	R^2	0,92	0,95	0,93
AMG	K_d^* (h ⁻¹)	0,0271	0,0187	0,0278
	$t_{1/2}^*$ (h)	29,58	40,07	28,93
	R^2	0,98	0,96	0,86

*Valores calculados pela equação 3.3.

O derivado imobilizado em octil apresentou uma estabilidade maior à 30 °C quando comparado às outras temperaturas, apresentando um tempo de meia vida de 54,51 horas, 2,2 vezes maior que o tempo de meia vida da lipase de *G. candidum* solúvel nesta temperatura. À temperatura de 40 °C, com tempo de meia vida de 21,27 horas, 2,6 vezes maior que o encontrado na temperatura de 30 °C e 1,5 vezes menor que o valor da constante de inativação encontrado para este derivado à 50 °C. O derivado imobilizado em CNBr apresentou tempo de

meia vida de 109,54 horas à temperatura de 30 °C, 2,0 vezes maior quando comparado ao derivado octil nesta temperatura. Porém, nas temperaturas de 40 e 50 °C, o derivado octil apresentou estabilidade superior a do derivado CNBr, à 40 °C o tempo de meia vida do derivado octil foi 1,6 vezes maior e à 50 °C 1,7 vezes maior que o tempo de meia vida do derivado CNBr.

Analisando a Tabela 4.9 nota-se o derivado MANAE apresentou maior estabilidade térmica à 30 °C com tempo de meia vida de 159,03 horas, 6,4 vezes maior que o tempo de meia vida apresentado pela lipase de *G. candidum* nesta temperatura. nas temperaturas de 30 e 40 °C, já a 50 °C a estabilidade térmica deste derivado foi 1,8 vezes menor que a enzima solúvel, apresentando um tempo de meia vida de 3,82 horas. O DEAE, também derivado aniônico, apresentou melhor estabilidade térmica à 40 °C, com tempo de meia vida de 79,53 horas foi o derivado mais estável quando comparado com os outros derivados nesta temperatura. À 50 °C, o derivado DEAE apresentou tempo de meia vida de 2,4 vezes maior que o apresentado pela enzima solúvel.

Os derivados imobilizados nos suportes catiônicos carboximetil e sulfopropil apresentaram perfis diferentes entre eles. À 30 °C, os derivado carboximetil apresentou tempo de meia vida de 27,50 horas, enquanto o derivado sulfopropil apresentou um tempo de meia vida de 16,98 horas, 1,6 vezes menor. À 40 °C o derivado carboximetil foi menos estável e o derivado sulfopropil foi mais estável quando comparado às temperaturas de 30 e 50°C. Estes derivados apresentaram parâmetros cinéticos próximos à 50°C, o derivado carboximetil apresentou tempo de meia vida de 18,99 horas enquanto o derivado sulfopropil apresentou tempo de meia vida de 14,84 horas.

A maior estabilidade encontrada para a lipase de *G. candidum* imobilizada à 50 °C foi para o derivado AMG que, apesar do modelo não calcular o tempo de meia vida nas temperaturas de 30 e 40 °C. Quando comparado aos outros derivados imobilizados, apresentou tempo de meia vida de 28,93 horas, 4,1 vezes maior que a enzima solúvel à temperatura de 50 °C.

Ao comparar-se os derivados de diferentes lipases imobilizadas num mesmo suporte, separadamente, pode-se observar que estes possuem um comportamento diferente, tais como os derivados imobilizados em AMG avaliados nas três temperaturas. Este efeito pode ter ocorrido em primeiro lugar devido à estrutura da enzima. A lipase de *G. candidum*, por exemplo, tem uma estrutura com maior afinidade ao suporte AMG, ou seja, a ligação enzima-suporte tem uma interação mais forte e isso promove uma maior resistência (PALOMO *et al.*, 2006).

Observou-se o efeito da hiperativação em alguns derivados incubados a diferentes temperaturas, assim como nos resultados obtidos nos experimentos para avaliar o efeito do pH na estabilidade enzimática dos derivados. Isto se deve provavelmente porque o centro catalítico das enzimas torna-se mais exposto quando imobilizada sobre estes suportes (PALOMO *et al.*, 2002a).

4.3.2.3. Estabilidade em solventes orgânicos

A estabilidade em solventes orgânicos é uma característica importante para as lipases e seus derivados imobilizados pois, além de indicar quais solventes poderão ser utilizados nos meios de reação, pode determinar a aplicação destas enzimas como biocatalisadores em reações de síntese. Entretanto, a atividade das lipases em sistemas orgânico-aquosos são normalmente muito menores do que em sistemas aquosos (PENCREAC'HE e BARATTI, 2001). A estabilidade das proteínas é menor em solventes hidrofóbicos quando comparada com os solventes miscíveis em água, o que representa um problema para o uso da lipase, por exemplo, na esterificação de açúcares para produção de biossurfactantes resultado da reação contendo solventes polares como 2-metil e 2-butanol (SOULTANI *et al.*, 2001).

Conforme descrito na seção 3.7.5.3, a estabilidade das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* e seus respectivos derivados imobilizados, foram testados em relação aos solventes orgânicos metanol, propanol e ciclohexano.

As Figuras 4.11, 4.12 e 4.13 mostram os perfis de estabilidade das lipases na presença dos diferentes solventes orgânicos.

Analisando a Figura 4.11 (a), observa-se que, em presença de metanol, embora o tempo de meia vida para a lipase de *C. rugosa* solúvel ser praticamente o mesmo do seu derivado imobilizado em CNBr (aproximadamente 6 horas), o derivado CNBr foi inativado em 79,39% em 72 horas enquanto a enzima solúvel inativou completamente em 60 horas de experimento. Apesar de apresentar o mesmo perfil de estabilidade do derivado CNBr, o derivado AMG se mostrou mais estável que aquele, apresentando um tempo de meia vida de 18 horas e uma atividade residual de 27,79% ao final do experimento. Os derivados octil, MANAE e DEAE, apresentaram perfil de estabilidade semelhantes com tempo de meia vida aproximadamente 36 horas, alcançando uma atividade residual final de 38,18%, 42,22% e 42,49%, respectivamente. Os derivados imobilizados nos suportes catiônicos carboximetil e sulfopropil se mostraram mais estáveis quando comparados aos outros suportes analisados,

em média foram 2,5 vezes mais estáveis que os derivados CNBr e AMG (menos estáveis) 1,5 vezes mais estáveis que os suportes octil, MANAE e DEAE. O derivado carboximetil sofreu uma inativação total de 42,34% e o derivado sulfopropil de 38,05% em 72 horas de experimento.

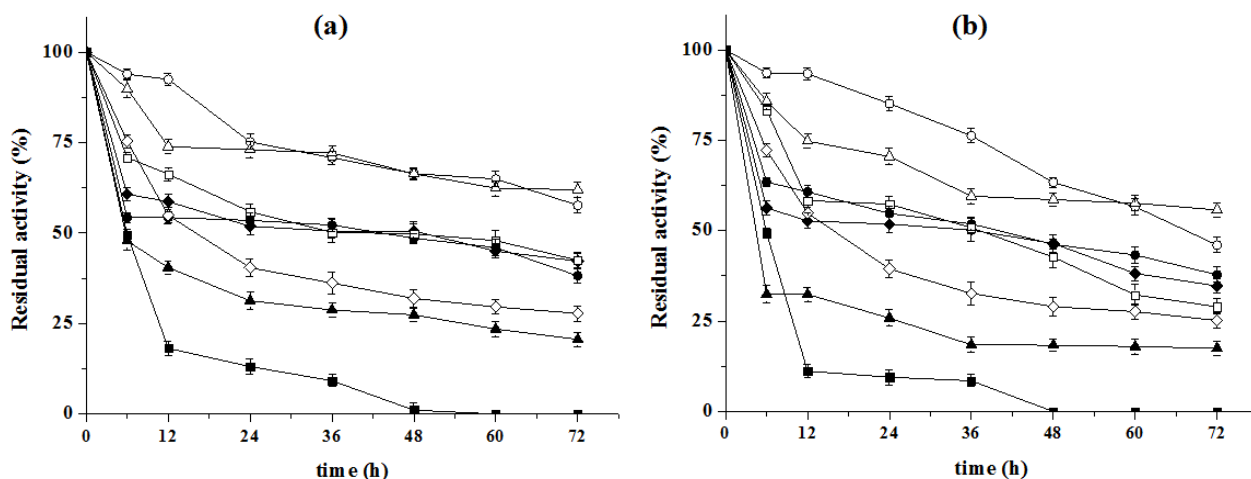


Figura 4.11 – Estabilidade dos derivados imobilizados na presença de metanol. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato de sódio 25mM, pH 7,0 à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ com solução de metanol 50% (v/v). (a) *C. rugosa*; (b) *G. candidum*. (■) Enzima solúvel; (●) Octil; (▲) CNBr; (◆) MANAE; (□) DEAE; (○) Carboximetil; (Δ) Sulfopropil; (◇) AMG.

A Figura 4.11 (b) mostra que mesmo o tempo de meia vida apresentado pelo derivado CNBr (6 horas) ter sido menor que o da lipase de *G. candidum* solúvel (7,5 horas), a enzima imobilizada neste suporte se mostrou mais estável sofrendo uma inativação total de 82,52% em 72 horas de incubação, enquanto a enzima solúvel foi completamente inativada com 48 horas de incubação. Observa-se, que os derivados Octil, MANAE e DEAE apresentaram um tempo de meia vida de aproximadamente 42 horas, maior que o da lipase de *C. rugosa* imobilizada nestes mesmos suportes, porém foram menos estáveis que aqueles, sofrendo uma inativação de 62,20%, 65,27% e 71,01%, respectivamente. A lipase de *G. candidum* imobilizada em carboximetil teve sua atividade residual diminuída pela metade em aproximadamente 72 horas e, o derivado sulfopropil se mostrou mais estável quando comparado com os outros derivados imobilizados para a lipase de *G. candidum*, finalizando o experimento com uma atividade residual de 55,71%, resultando numa estabilidade de 3,2 vezes maior que o derivado de CNBr (menos estável).

Na presença de propanol, a lipase de *C. rugosa* (Figura 4.12 a) apresentou tempo de meia vida menor que 6 horas sendo inativada completamente após 72 horas de experimento.

Apesar de apresentarem perfis de estabilidade diferentes com tempo de meia vida de 19,5 horas para o derivado octil, 30,6 horas para o derivado MANAE e 9,2 horas para o derivado AMG, estes derivados apresentaram atividade residual final semelhantes, 20,73%, 24,48% e 22,32%, respectivamente. A lipase de *C. rugosa* imobilizada em CNBr teve sua atividade residual reduzida pela metade após 39,5 horas de experimento, sofrendo uma inativação total de 66,15%. Os derivados DEAE, carboximetil e sulfopropil se mostraram mais estáveis quando comparados aos outros derivados imobilizados alcançando uma atividade residual de 40,49%, 45,96% e 48,99% em 72 horas de incubação. A lipase de *C. rugosa* imobilizada em sulfopropil se mostrou 2,4 vezes mais estável que o derivado octil (menos estável) quando incubada em meio contendo propanol 50% (v/v).

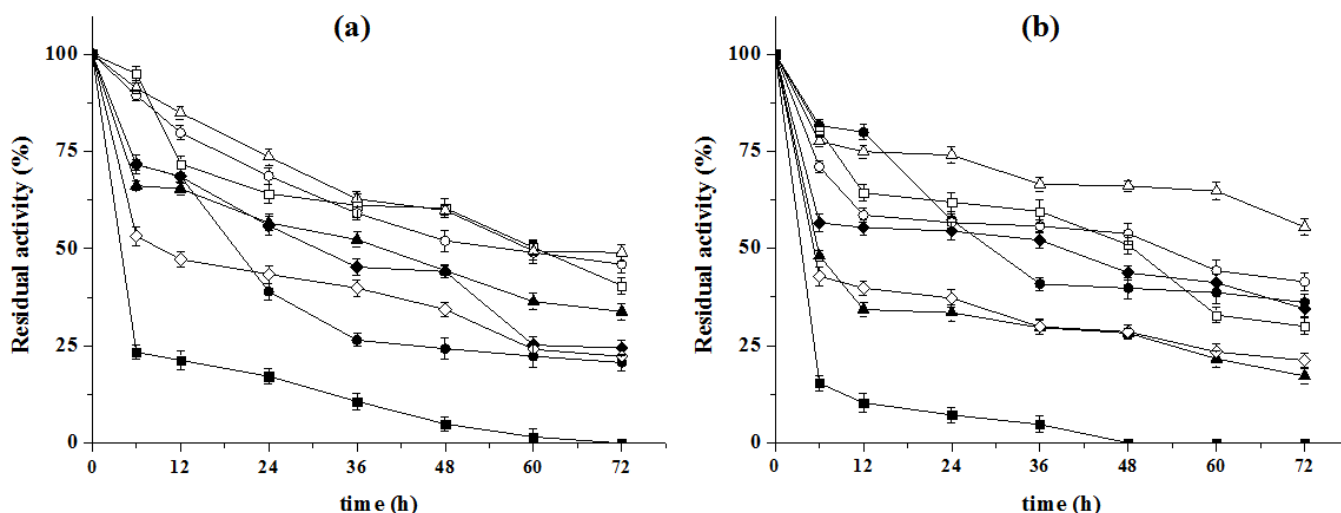


Figura 4.12 – Estabilidade dos derivados imobilizados na presença de propanol. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato de sódio 25mM, pH 7,0 à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ com solução de propanol 50% (v/v). (a) *C. rugosa*; (b) *G. candidum*. (■) Enzima solúvel; (●) Octil; (▲) CNBr; (◆) MANAE; (□) DEAE; (○) Carboximetil; (Δ) Sulfopropil; (◇) AMG.

Analisando a Figura 4.12 (b), observa-se que a lipase de *G. candidum* solúvel, na presença de propanol, apresentou um tempo de meia vida inferior a 6 horas sendo completamente inativada em 48 horas de experimento. Os derivados CNBr e AMG apresentaram perfis de estabilidade semelhantes, tendo suas atividades residuais reduzidas pela metade em aproximadamente 6 horas de incubação. O derivado octil apresentou um tempo de meia vida em aproximadamente 28 horas, o derivado MANAE de 42 horas, o derivado DEAE aproximadamente 48 horas e o derivado carboximetil em aproximadamente 54 horas. A lipase de *G. candidum* imobilizada nestes quatro suportes (octil, MANAE, DEAE

e carboximetil), separadamente, mostrou perfil de estabilidade semelhantes, no entanto entre eles, o derivado carboximetil foi mais estável sendo inativado em 58,57%, enquanto o derivado DEAE (o menos estável entre estes quatro) sofreu uma inativação de 70% após 72 horas de incubação. Assim como observado no experimento realizado na presença de metanol, o derivado sulfopropil foi o mais estável entre os derivados, alcançando uma atividade residual de 55,51%, o que equivale à 3,2 vezes mais estável que o derivado CNBr (menos estável).

Ao analisar os dados apresentados na Figura 4.13 mostra os perfis de estabilidade das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* e seus derivados imobilizados na presença de ciclohexano 50% (v/v).

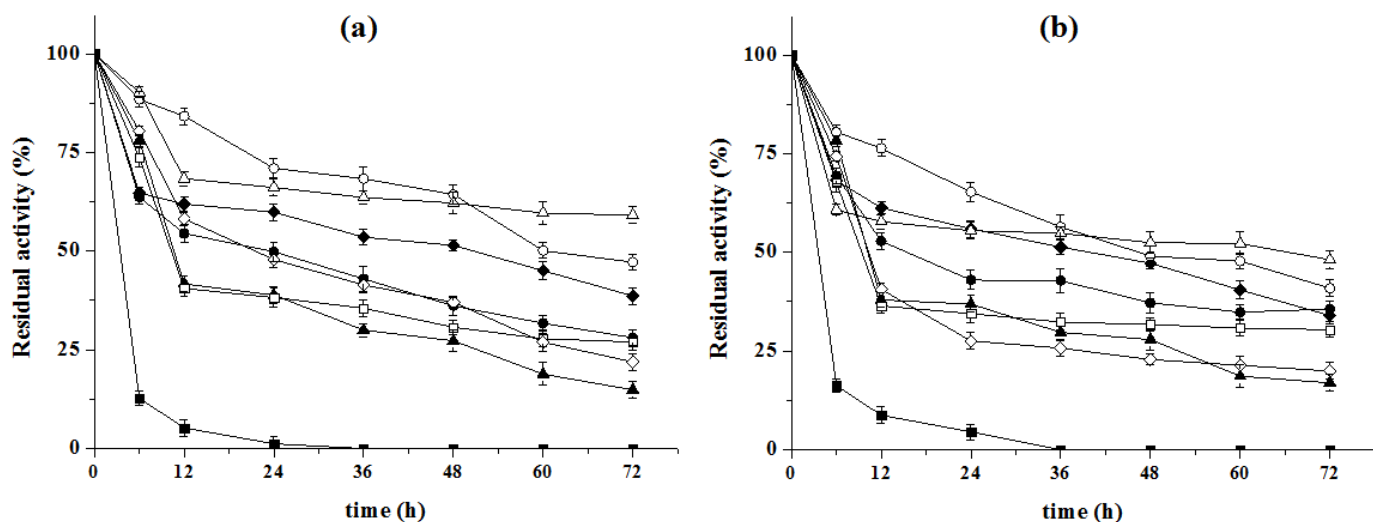


Figura 4.13 – Estabilidade dos derivados imobilizados na presença de ciclohexano. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato de sódio 25mM, pH 7,0 à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ com solução de ciclohexano 50% (v/v). (a) *C. rugosa*; (b) *G. candidum*. (■) Enzima solúvel; (●) Octil; (▲) CNBr; (◆) MANAE; (□) DEAE; (○) Carboximetil; (Δ) Sulfopropil; (◇) AMG.

Apesar de apresentarem perfis de estabilidade semelhantes, tempo de meia vida em menos de 6 horas e inativarem completamente a partir de 36 horas de incubação, a lipase de *G. candidum* solúvel (Figura 4.13 b) se mostrou mais estável que a lipase de *C. rugosa* solúvel (Figura 4.13 a). A Figura 4.13 (a) mostra que os derivados octil e AMG tiveram suas atividades residuais reduzidas pela metade em aproximadamente 24 horas de experimento e apresentaram estabilidades semelhantes durante 48 horas de incubação, porém ao final do experimento, o derivado octil alcançou um atividade residual de 28,08% e o derivado AMG de 21,09% (uma diferença aproximada de 7,0%). Os derivados CNBr e DEAE apresentaram

perfis de estabilidades muito semelhantes durante as primeiras 24 horas de incubação, com tempo de meia vida de aproximadamente 10 horas, porém o derivado DEAE se mostrou mais estável com uma atividade residual final de 26,96% contra uma atividade residual final de 14,86% do derivado CNBr. O derivado MANAE apresentou um tempo de meia vida de aproximadamente 50 horas e sofreu uma inativação total de 61,35% em 72 horas de incubação. Os derivados carboximetil e sulfopropil foram mais estáveis que os outros derivados, sendo que o derivado sulfopropil teve maior atividade residual (59,10%) representando quase 4 vezes mais que a atividade residual do derivado CNBr (menos estável).

Analisando a Figura 4.13 (b) observa-se, que na presença de ciclo-hexano os derivados da lipase de *G. candidum* imobilizada em octil tem sua atividade residual reduzida pela metade em 15,4 horas, enquanto os derivados CNBr, DEAE e AMG apresentaram tempo de meia vida de aproximadamente 9 horas, os derivados carboximetil e MANAE de 46,4 h e o derivado sulfopropil de 66,4 horas. Todos os derivados imobilizados apresentam perfis de estabilidade semelhantes, sendo que o derivado sulfopropil foi o mais estável alcançando uma atividade residual de 48,09% após 72 horas de incubação. Esta atividade equivale a 2,8 vezes mais que a atividade residual final do derivado CNBr (menos estável).

Como observado, para as lipases de ambos os microrganismos, quando incubadas em metanol, propanol e ciclohexano a uma concentração de 50% (v/v), na forma solúvel, se mostraram instáveis sofrendo inativação total antes do término dos experimentos. O derivado CNBr foi o que apresentou menor estabilidade quando incubado com os solventes orgânicos estudados e o derivado sulfopropil foi o mais estável quando comparado aos outros derivados.

4.4. Aplicação das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* e seus derivados imobilizados na produção de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) Omega – 3

4.4.1. Determinação das concentrações de ácidos graxos do óleo de sardinha

A Tabela 4.10 mostra os resultados obtidos na análise realizada para determinar as concentrações de ácidos graxos do óleo de sardinha.

Tabela 4.10 – Respostas do detector UV (area do pico e tempo de retenção) dos diferentes ácidos graxos separados por sistema HPLC.

Ác. graxo	Área do pico, un.	Concentração (mM)	Tempo de retenção (min)
Ác. oleico	35.899	0,13	21,5
EPA	3.224.882	12,12	9,4
DHA	4.807.103	18,06	13,5

Fase móvel: (70/30), acetonitrila/tampão fosfato de amônio 10 mM pH 3,0, fluxo: 1 mL/min, amostra injetada: 20 µL de ácido graxo 0,1 mM, comprimento de onda: 215 nm.

Observa-se que, para o comprimento de onda de 215 nm, o ácido graxo DHA apresentou uma concentração 49% maior do que a do ácido graxo EPA. Em contrapartida, o ácido oleico apresentou concentração de 1% da apresentada pelo EPA. Além disso, as estruturas polinsaturadas destes ácidos graxos (EPA e DHA) os tornam menos apolares e, consequentemente, os tempos de retenção em HPLC, sob condições isocráticas, foram relativamente baixos.

A análise realizada em HPLC, sob as condições mencionadas no item 3.8.2, se mostra fácil e com resultados altamente precisos para a detecção do PUFA Omega-3 produzido pela hidrólise enzimática do óleo de sardinha. Por exemplo, quando analisada uma amostra de DHA 0,1 mM com fluxo de 1 mL/min, a resposta é um pico com uma área muito grande (mais de 4,8 milhões \pm 10.000 unidades) (Tabela 4.10).

4.4.2. Produção de PUFA Omega – 3

Após a imobilização e o estudo da estabilidade dos derivados das lipase de *C. rugosa* e *G. candidum* imobilizadas nos diferentes suportes, estes foram aplicados como biocatalisadores da reação de hidrólise do óleo de sardinha.

As Tabelas 4.11 e 4.12 apresentam os resultados da hidrólise do óleo de sardinha realizado em sistema bifásico orgânico-aquoso, pH 7,0, à 37 °C, catalisada pelas lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* e seus derivados imobilizados em diferentes suportes.

A Tabela 4.11 mostra que para a lipase de *C. rugosa* os derivados dos suportes iônicos MANAE, DEAE, carboximetil e sulfopropil e do suporte heterofuncional AMG foram mais

ativos que os derivados octil e CNBr. As atividades dos derivados carboximetil e sulfopropil (mais ativos), durante a reação, foram semelhantes (192% e 188%, respectivamente) e foram 2 vezes mais ativos que o derivado CNBr (menos ativo). Os derivados dos suportes aniônicos MANAE e DEAE apresentaram boa atividade com valores próximos entre si (183% e 179%, respectivamente) durante a hidrólise do óleo de sardinha, e também foram aproximadamente 2 vezes mais ativos que o derivado CNBr.

A lipase de *C. rugosa* imobilizada nos suportes catiônicos carboximetil e sulfopropil, apresentou uma razão de EPA por DHA de 11 e nos suportes aniônicos e heterofuncional essa razão foi de 9, enquanto em octil apresentou uma especificidade de 5 e em CNBr, apresentou uma razão de 4, a menor especificidade quando comparadas aos outros derivados.

Tabela 4.11 – Hidrólise do óleo de sardinha em sistema bifásico orgânico-aquoso pH 7, durante 72 horas à 37 °C catalisada pela lipase de *C. rugosa* e seus derivados imobilizados em diferentes suportes.

Enzima/Derivado	EPA/DHA *	PUFA (μ M) *	Atividade (%)
Enzima solúvel	4 \pm 0,68	198 \pm 1,3	92 \pm 5,2
Octil	5 \pm 0,99	379 \pm 3,4	166 \pm 3,3
CNBr	4 \pm 0,47	218 \pm 4,4	94 \pm 1,9
MANAE	9 \pm 0,33	545 \pm 5,9	183 \pm 3,7
DEAE	9 \pm 0,81	536 \pm 5,4	179 \pm 2,8
Carboximetil	11 \pm 0,53	582 \pm 3,8	192 \pm 6,6
Sulfopropil	11 \pm 0,62	577 \pm 4,3	188 \pm 5,7
AMG	9 \pm 0,42	554 \pm 3,7	157 \pm 4,2

*EPA/DHA é a razão entre ambos os ácidos gráxos produzido pela hidrólise do óleo de sardinha (conversão de 15%). PUFA é a soma das quantidades de EPA e DHA produzidos.

A lipase de *G. candidum* imobilizada em suportes iônicos (MANAE, DEAE, carboximetil e sulfopropil) se mostrou mais ativa quando comparada à enzima imobilizada em octil, CNBr e AMG (Tabela 4.9). Assim como observado na lipase de *C. rugosa* imobilizada em carboximetil e sulfopropil, estes derivados imobilizados para a lipase de *G. candidum* também apresentaram atividades semelhantes de 165% e 170%, respectivamente, representando 2 vezes mais a atividade apresentada pelos derivados CNBr e AMG que foram os menos ativo durante a hidrólise do óleo de sardinha. Os derivados MANAE e DEAE

apresentaram uma atividade média de 151%. Como para os derivados dos suportes catiônicos, também apresentaram atividades semelhantes durante a reação e foram 1,8 vezes mais ativo do que os derivados CNBr e AMG.

A maior seletividade EPA/DHA para a lipase de *C. rugosa* (valor de 7) foi apresentada pelos derivados carboximetil e sulfopropil, os derivados MANAE e DEAE apresentaram uma seletividade de 5, enquanto os derivados CNBr e AMG apresentaram uma especificidade de 4 e o derivado que apresentou a menor razão entre EPA e DHA foi o imobilizado em octil que apresentou uma especificidade de 3.

Tabela 4.12 – Hidrólise do óleo de sardinha em sistema bifásico orgânico-aquoso pH 7 a 37 °C catalisada pela lipase de *G. candidum* e seus derivados imobilizados em diferentes suportes.

Ezima/Derivado	EPA/DHA *	PUFA (μM) *	Atividade (%)
Enzima solúvel	2 \pm 0.34	150 \pm 4.6	74 \pm 2.6
Octil	3 \pm 0.91	258 \pm 5.8	100 \pm 6.5
CNBr	4 \pm 0.73	213 \pm 3.2	85 \pm 7.5
MANAE	5 \pm 0.53	278 \pm 2.9	152 \pm 3.3
DEAE	5 \pm 0.50	265 \pm 9.2	149 \pm 1.5
Carboximetil	7 \pm 0.80	354 \pm 1.7	165 \pm 5.0
Sulfopropil	7 \pm 0.64	482 \pm 5.1	170 \pm 8.4
AMG	4 \pm 0.08	244 \pm 2.3	88 \pm 8.9

*EPA/DHA é a razão entre ambos os ácidos gráxos produzido nas primeiras fases da hidrólise do óleo de sardinha (conversão de 15%). PUFA é a soma das quantidades de EPA e DHA produzidos.

Analisando as Tabelas 4.11 e 4.12 observa-se que, as lipases de ambos os microrganismos na sua forma solúvel se mostraram menos ativas e com menor rendimento na produção do PUFA Omega-3. De um modo geral, os derivados imobilizados da lipase de *C. rugosa*, foram mais ativos e tiveram maiores rendimentos na produção de PUFA Omega-3 quando comparados com os resultados obtidos pelos derivados imobilizados da lipase de *G. candidum*.

As lipases imobilizadas em suportes iônicos têm uma ligação enzima-suporte mais forte, em comparação com os outros suportes estudados. A imobilização pode causar

distorção no sítio catalítico da lipase interferindo diretamente com a especificidade. Sendo assim, a imobilização em suportes iônicos podem alterar a especificidade da hidrólise de óleo de sardinha em relação à razão de EPA/DHA, o que torna a utilização destes derivados atraentes para aplicação industrial (PEREIRA *et al.*, 2015).

A partir dos resultados apresentados nesta seção, é possível observar que, assim como apresentado pelo estudo realizado por Fernández-Lorente *et al.* (2011), ocorre uma ativação interfacial promovida pela imobilização nos suportes, este fato pode ser explicado devido à proteção das enzimas imobilizadas nos suportes estudados, evitando uma inativação pelas interfaces hidrofóbicas (BETANCOR *et al.*, 2004).

4.5. Hidrólise enantiosseletiva do (R,S) – éster etílico de ácido mandélico aplicando as lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* imobilizadas em diferentes suportes

As Tabelas 4.13 e 4.14 apresentam o rendimento reacional total quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência analisados em HPLC de fase reversa com coluna hidrofóbica, e o excesso enantiomérico analisado pela eluição das amostras em coluna quiral.

A lipase de *C. rugosa* imobilizada em CNBr, AMG, DEAE e carboximetil para o substrato utilizado não apresentou uma alta enantiosseletividade, o que facilitou as análises das alterações das propriedades dos derivados.

Analisando a Tabela 4.13 observa-se que, a enantiosseletividade do derivado CNBr aumenta com o aumento do pH porém a hidrólise do isômero *R* continua sendo mais rápida em relação ao isômero *S*, apresentando uma razão enantiomérica maior em pH 9,0. Para o derivado AMG, nota-se que este hidrolisa mais rápido o isômero *S* em pH ácido e neutro, apresentando uma enantiosseletividade mais alta em pH 5,0 e, em pH alcalino, a reação passa a ser mais rápida para o isômero *R* que é produzido 34% a mais que o outro isômero. Para os derivados imobilizados em suportes iônicos, pode-se observar o mesmo comportamento em relação à produção dos isômeros. Diferente do apresentado para o derivado AMG, em pH ácido e neutro, estes derivados hidrolisam mais rápido o isômero *R* e em pH alcalino, o isômero *S*. O derivado DEAE apresentou uma razão enantiomérica maior, produzindo 47,4% mais o isômero *R* em pH 7,0. Já o derivado carboximetil apresentou a maior razão enantiomérica produzindo 79,2% do isômero *R* em pH 5,0.

Tabela 4.13 – Hidrólise enantiosseletiva do (*R,S*) – éster etílico de ácido mandélico catalisada pelos derivados imobilizados da lipase de *C. rugosa*.

Derivado	pH	Rendimento (%)	Atividade (U/g _{suporte})	ee ^a (%)	E ^b	Enantiômero
CNBr	5,0	47,8	0,37	31,4	19,1	<i>R</i>
	7,0	54,9		39,1	22,8	<i>R</i>
	9,0	44,3		29,9	30,0	<i>R</i>
AMG	5,0	43,7	0,41	4,01	22,4	<i>S</i>
	7,0	49,2		38,3	10,8	<i>S</i>
	9,0	43,5		34,0	20,3	<i>R</i>
DEAE	5,0	49,6	0,34	31,2	19,1	<i>R</i>
	7,0	46,9		47,4	28,0	<i>R</i>
	9,0	45,8		35,5	21,0	<i>S</i>
Carboximetil	5,0	49,8	0,39	79,2	86,2	<i>R</i>
	7,0	47,9		19,4	14,8	<i>R</i>
	9,0	48,5		5,8	11,2	<i>S</i>

^a ee: Excesso enantiomérico^b E: Razão enantiomérica (especificidade)

Analisando a Tabela 4.14, observa-se que os derivados CNBr e AMG apresentaram resultados semelhantes. Em pH ácido e alcalino, o isômero *S* foi hidrolizado mais rápido e em pH neutro a hidrólise foi mais rápida para o isômero *R*. Porém, o derivado CNBr apresentou maior seletividade para o isômero *S* em pH 5,0, já em pH 7,0 a hidrólise do isômero *R* foi 85,2% e a seletividade de 125,2. Para o derivado AMG a maior seletividade do isômero *S* ocorreu em pH 9,0 e em pH neutro produziu 90,7% do isômero *R* com uma seletividade maior de 200. Diferente do observado com a lipase de *C. rugosa* imobilizada em DEAE e carboximetil, estes derivados imobilizados da lipase de *G. candidum* apresentaram enantiosseletividades contrárias quando comparados entre eles. O derivado DEAE hidrolisou o isômero *R* mais rápido em pH 5,0 e 7,0 apresentando maior enantiosseletividade no pH neutro, produzindo 33,3% deste isômero. Este derivado apresentou uma razão enantiomérica de 21,2 hidrolisando mais rápido o isômero *S* em pH 9,0. Em pH ácido e neutro, o derivado

carboximetil realizou mais rápida a hidrólise do isômero *S* apresentando maior razão enantiomérica (maior que 200) em pH 5,0, em pH alcalino o isômero *R* foi hidrolisado mais rápido com uma razão enantiomérica de 12,8 produzindo 12,4% deste isômero.

Tabela 4.14 – Hidrólise enantiosseletiva do (R,S) – éster etílico ácido mandélico catalisada pelos derivados imobilizados da lipase de *G. candidum*.

Derivado	pH	Rendimento (%)	Atividade (U/g _{suporte})	ee ^a (%)	E ^b	Enantiômero
CNBr	5,0	47,8	1,31	> 99,0	> 200	<i>S</i>
	7,0	46,9		85,2	125,2	<i>R</i>
	9,0	47,3		84,9	122,2	<i>S</i>
AMG	5,0	40,7	1,28	64,9	46,9	<i>S</i>
	7,0	44,1		90,7	> 200	<i>R</i>
	9,0	47,2		> 99,0	> 200	<i>S</i>
DEAE	5,0	45,9	1,26	18,9	14,7	<i>R</i>
	7,0	46,3		33,3	19,9	<i>R</i>
	9,0	50,9		35,9	21,2	<i>S</i>
Carboximetil	5,0	43,6	1,23	> 99,0	> 200	<i>S</i>
	7,0	50,8		69,2	1,8	<i>S</i>
	9,0	48,4		12,4	12,8	<i>R</i>

^a ee: Excesso enantiomérico

^b E: Razão enantiomérica (especificidade)

Observa-se que para o derivado CNBr e carboximetil em pH 5,0 e o derivado AMG em pH 9,0 o excesso enantiomérico foi maior que 99,0%, isso indica que para estes derivados, nestas condições de pH, pode-se obter um produto com grau de pureza elevada.

Os resultados obtidos a partir da hidrólise enantiosseletiva do (R,S) – éster etílico de ácido mandélico aplicando os derivados das lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* sugerem que suas propriedades podem ser moduladas por imobilização e pelas condições experimentais (por exemplo, diferentes pHs do meio reacional). Assim, as diferentes técnicas de imobilização podem alterar as propriedades catalíticas da mesma lipase, determinando diferentes razões enantioméricas (especificidades) e preferência estereoquímica.

Esta modulação das propriedades de uma lipase é chamada de "engenharia conformacional". Este mecanismo de alterar as propriedades por meio de imobilização controlada e condições experimentais pode ser geralmente aplicado para enzimas que sofrem mudanças consideráveis na sua conformação durante a catálise (PALOMO *et al.*, 2002b).

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Lipases de microrganismos diferentes, de forma geral, apresentarem o mesmo mecanismo catalítico, porém resultados particulares para cada espécie de lipase. Este trabalho consistiu na caracterização e imobilização das lipase de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* produzidas em meio contendo melaço de soja e, a aplicação dos derivados imobilizados na hidrólise do óleo de sardinha para produção de ácidos graxos poli-insaturados Omega-3, e na hidrólise enantiosseletiva do (R,S) – éster etílico de ácido mandélico. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Após a purificação, a lipase de *C. rugosa* apresentou atividade específica de 87,82 U/mg, 17,6 vezes maior que a atividade específica apresentada antes da purificação. A lipase de *G. candidum* teve um aumento na atividade de 23,7 vezes, quando comparada com a atividade antes de purificar, apresentando uma atividade específica de 144,27 U/mg.
- As lipases produzidas em melaço de soja por *C. rugosa* e *G. candidum* apresentaram massa molecular de aproximadamente 59,7 kDa e 38,3 kDa, respectivamente. Os parâmetros cinéticos calculados para lipase de *C. rugosa* foram K_m de 200,53 μM e $V_{\text{máx}}$ de 0,044 $\mu\text{mol/min}$; para a lipase de *G. candidum* foram K_m de 443,99 μM e $V_{\text{máx}}$ de 0,382 $\mu\text{mol/min}$.
- A partir da análise proteômica por espectrometria de massa, confirma-se que as lipases são provenientes dos microrganismos esperados (*Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*).
- À 30 °C as lipases de ambos microrganismos apresentaram maior estabilidade quando comparadas com as outras temperaturas estudadas, porém, à esta temperatura, a lipase de *G. candidum* apresentou maior estabilidade, com tempo de meia vida de 24,67 horas, e a lipase de *C. rugosa* apresentou tempo de meia vida de 11,61 horas.
- As lipases de ambos microrganismos foram menos instáveis à temperatura de 60 °C e, ao contrário do observado à 30 °C, a lipase de *C. rugosa* apresentou maior estabilidade, com tempo de meia vida de 0,47 hora, quando comparada com a lipase de *G. candidum* que apresentou tempo de meia vida de 0,41 hora. Em 40 e 50 °C as

lipases de ambos microrganismos apresentaram-se estáveis durante as primeiras 3 horas de experimento.

- A lipase de *C. rugosa* sofreu hiperativação em pHs ácidos e neutro, se mostrou estável sem perda significativa de atividade em pH 8,0 e 9,0 e, em pH 10,0 sofreu inativação de aproximadamente 90%. A lipase de *G. candidum* hiperativou em pH 5,0 e 6,0, manteve sua atividade residual sem inativação significativa em pH 4,0 e 7,0, inativou aproximadamente 20% em pH 3,0, 8,0 e 9,0, e perdeu aproximadamente 60% da sua atividade residual em pH 10.
- Nos testes realizados para avaliar o efeito do reagente EDTA, do detergente Triton X-100 e dos íons metálicos, a lipase de *C. rugosa* sofreu inibição apenas quando em solução de CuSO_4 e Triton X-100 nas concentrações de 0,2 e 1,0%. Para a lipase de *G. candidum*, o efeito inibidor foi observado quando em solução de CuSO_4 e Triton X-100 1,0%.
- As lipases de ambos microrganismos apresentaram predominância de cargas negativas na sua superfície estrutural, o que justifica sua maior afinidade por suportes aniônicos durante a imobilização.
- A aminação química foi um método eficiente para modificação estrutural destas lipases, para agregar cargas positivas na sua superfície estrutural a fim de realizar a imobilização iônica em suportes catiônicos.
- A lipase de *G. candidum* imobilizada em suportes iônicos teve sua estabilidade térmica e em pHs alcalinos melhorada. A estabilidade térmica da lipase de *C. rugosa* foi melhorada quando imobilizada em todos os suportes estudados, já sua estabilidade em relação ao pH foi melhorada quando imobilizada em suportes aniônicos.
- Quando imobilizada nos suportes estudados, as lipases de *C. rugosa* e *G. candidum* se tornam mais estáveis em meio contendo os solventes orgânicos metanol, propanol e ciclohexano, quando comparadas à estas lipases na forma solúvel.
- Quando aplicadas na forma solúvel, a lipase de ambos microrganismos produziram aproximadamente a mesma quantidade de ácidos polinsaturados (PUFA) Omega-3.
- A lipase de *C. rugosa* imobilizada por ligação iônica em suporte DEAE, MANAE, carboximetil e sulfopropil, e por ligação covalente multipontual em suporte AMG foram mais eficientes na produção de PUFA. O mesmo aconteceu para a lipase de *G. candidum* imobilizada por adsorção em suporte octil e por ligação iônica em suporte DEAE, MANAE, carboximetil e sulfopropil.

- Quando aplicados na hidrólise enantiosseletiva do (*R,S*) – ácido mandélico etil éster, a lipase de *C. rugosa* imobilizada por ligação covalente multipontual apresentou maior seletividade pelo isômero *S* em pH 5 e 7, já em pH 9 a maior seletividade foi pelo isômero *R*, o contrário aconteceu para esta lipase imobilizada por ligação iônica.
- A lipase de *G. candidum* quando imobilizada por ligação covalente unipontual em suporte CNBr e multipontual em suporte AMG, apresentou maior seletividade pelo isômero *S* em pH ácido e alcalino, e em pH neutro sua seletividade foi maior para isômero *R*.
- A lipase de *G. candidum* imobilizada por ligação iônica apresentou comportamento oposto quando comparada entre os suportes catiônico e aniônico. Quando imobilizada em suporte aniônico DEAE, a lipase de *G. candidum* foi mais seletiva pelo isômero *R* em pH 5 e 7, e em pH 9 sua seletividade foi maior pelo isômero *S*. O contrário acontece quando imobilizada no suporte catiônico carboximetil.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a produção ácidos graxos polinsaturados (PUFA) Omega-3 em outras condições de pH e temperatura;
- Realizar os testes de enantiosseletividade com os pHs ótimos de cada derivado, variando-se a temperatura da reação;
- Avaliar o comportamento enantiosseletivo dos derivados imobilizados para outros enantiômeros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIAN, O.; GRAZÚ, V.; HERMOSO, J.; GONZÁLEZ, R.; GARCÍA, J. L.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; *et al.* Stabilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis of the protein surface to increase multipoint covalent attachment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1249 – 1251, 2004.

ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U. T.; BEDNARSKI, W. Synthesis of ascorbyl oleate by immobilized *Candida antarctica* lipases. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3177 – 3180, 2005.

ALFAYA, A.; KUBOTA, L. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 835 – 841, 2002.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTYO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor sp.* for production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, 2002.

AMOAH, J.; HO S.; HAMA S.; YOSHIDA A.; NAKANISHI A.; HASUNUMA T.; OGINO C.; KONDO A. Converting oils high in phospholipids to biodiesel using immobilized *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalysts expressing *Fusarium heterosporum* lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, n. A, p. 10 – 15, 2016.

BARON, A. M. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. 2008. p. 138. Tese – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BATISDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISÁN J. M. A single step purification, immobilization and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486 – 493, 1998.

BCC RESEARCH. **Global markets for enzymes in industrial application**. 2014. Disponível em: <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030h.html>. Acessado em 04/11/2016.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. **YEAST, Chichester**, v. 14, p. 1069 – 1087, 1998.

BETANCOR, L.; LOPEZ-GALLEGU, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Prevention of interfacial inactivation of enzymes by coating the enzyme surface with dextran-aldehyde. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 201–207, 2004.

BLANCO, R. M.; GUISÁN, J. M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydrite reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 360 – 366, 1989.

BOLIVAR, J. M.; MATEO, C.; GRAZU, V.; CARRASCOSA, A. V.; PESSELA, B. C.; GUISÁN, J. M. Heterofunctional supports for the one-step purification, immobilization and stabilization of large multimeric enzymes: amino-glyoxyl versus amino-epoxy supports. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 10, p. 1692 – 1698, 2010.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Ed. Interciência. Rio de Janeiro, 2008.

BOTTINO, N. R.; VANDENBU, G. A.; REISER, R. Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis. **Lipids**, v. 2, p. 489 – 493, 1967.

BOUTROU, R.; GUÉGEN, M. Interest in *Geotrichum candidum* for cheese technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 1 – 20, 2005.

BRABCOVÁ, J.; DEMIANOVÁ, Z.; VONDEÁSEK, J.; JÁGR, M.; ZAREVÚCKA, M.; PALOMO, J. M. Highly selective purification on three lipases from *Geotrichum candidum* 4013 and their characterization and biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 62 – 72, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BUCHHOLZ, K. **Characterization of Immobilized Biocatalysts**. Weinheim: VCH, 1979.

BURKERT, J.F de M. **Otimização das condições de produção da lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552**. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, SP. Brasil, 2003.

BUSTAMANTE, M.A.; VIRTO, M.; ARAMBURU, M.; BARRON, L. J. R.; PÉREZELORTONDO, F. J.; ALBISU, M.; RENOBALLES, M. Lambrennet paste in ovine cheese (Idiazabal) manufacture. Proteolysis and relationship between analytical and sensory parameters, **International Dairy Journal**, v. 13, p. 547 – 557, 2003.

CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R.; GAMA, M.. **Engenharia enzimática**, 1ª ed., Lisboa: Lidel, 2003.

CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUISÁN, J. M. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1, p. 171 – 176, 2009.

CAI, Y.; WANG, L.; LIAO, X.; DING, Y.; SUN, J.; Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBC WU-3. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 7, p. 786 – 790, 2009.

CARDENAS, F.; CASTRO, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 28, p. 145 – 154, 2001.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146 – 156, 2004.

CHEN, C. C.; GU, Y. Enhancing the sensitivity and stability of HRP/PANI/Pt electrode by implanted bovine serum albumin. **Biosensors and Bioelectronics**, v.23, n.6, p.765 – 770, 2008.

CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T.; MORI, T. **Em: Immobilized Enzymes - Research and Development**. Chibata, I. Wiley: New York, p.1, 1978.

CIPOLATTI, E. P.; MORENO-PÉREZ, S.; SOUZA, L. T. A.; VALÉRIO, A.; GUISÁN J. M.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D.; PESSELA, B. C. Synthesis and modification of polyurethane for immobilization of *Thermomyces lanuginosus* (TLL) lipase for ethanolysis of fish oil in solvent free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 163 – 169, 2015.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC**, v. 4, p. 1 – 14, 2012.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. de. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, Porto Alegre, Brasil, 1999.

CUNHA A. G. **Produção e imobilização de lipases microbianas em suportes com diferentes graus de hidrofobicidade**. Dissertação de mestrado submetida ao Instituto de Química da UFRJ, 2007.

DE CATERINA, R. n-3 fatty acids in cardiovascular disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, p. 2439 – 2450, 2011.

DIB, J. C.; DUBE, M.; KELLY, C.; RINALDI, M. G.; PATTERSON, J. E. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a typing system for *Candida rugosa*: comparison of karyotype and restriction fragment length polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1494 – 1496, 1996.

FABER, K. **Biotransformation in organic chemistry: A textbook**. 3rd ed, Springer Productions – Gesellschaft, Berlin, cap. 1 – 3, 1997.

FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa**. Dissertação de Mestrado. UNIT – Universidade Tiradentes. Aracaju, SE – Brasil, 2009.

FENG, W.; SUN, X.; JI, P. Activation mechanism of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilized on carbon nanotubes. **Soft Matter**, v. 8, p. 7143 – 7150, 2012.

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M. Técnicas de imobilização de enzimas. **Revista Processos Químicos**, v. 1, p. 53 – 58, 2010.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics Lipids**, v. 93, p. 185 – 197, 1998.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; CABRERA, Z.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 5, p. 565 – 569, 2007.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; GODOY, C. A.; MENDES, A. A.; LOPEZ-GALLEGU, F.; GRAZU, V.; DE LAS RIVAS, B.; *et al.* Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2553 – 2561, 2008.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; BETANCOR, L.; CARRASCOSA, A. V.; PALOMO, J. M.; GUISAN, J. M. Modulation of the selectivity of immobilized lipases by chemical and physical modifications: release of omega-3 fatty acids from fish oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 1, p. 97 – 102, 2011.

GALVIS, M.; BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of solidphase chemical modification on the features of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 460 – 466, 2012.

GANDRA, K. M.; BIANCHI, M. D.; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2008.

GHALY, A.E.; DAVE, D.; BROOKS, M.S.; BUDGE, S. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, p. 54 – 76, 2010.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y. 1-butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 35, n. 4, p. 355 – 363, 2004.

GHANEM, A.; ABOU; ENEIN, H. Y. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 3331 – 3351, 2004.

GIRELLI, A. M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in oil-line high performance liquid chromatography: A review. **Journal of Chromatography B**, v. 819, n. 1, p. 3 -16, 2005.

GOMES, F. M.; PAULA, A. V.; SILVA, G. S. S.; CASTRO, H. F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, v. 29(4), p. 710 – 718, 2006.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; HILDA, A. Strategies to Characterize Fungal Lipases for Applications in Medicine and Dairy Industry. **BioMed Research International**, p. 1 – 10, 2013.

GROENEWALD, M.; BOEKHOUT, T.; NEUVEGLISE, C.; GAILLARDIN, C.; DIJCK, P.W.M.; WYSS, M. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. **Critical Review Microbiology**, v. 6, p. 1 – 20, 2013.

GULDHE, A.; SINGH, P.; KUMARI, S.; RAWAT, I.; PERMAUL, K.; BUX, F. Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized *Aspergillus niger* whole cell lipase biocatalyst. **Renewable Energy**, v. 85, p. 1002 – 1010, 2016.

HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. **Acta Biotechnology**, v. 11, p. 159 – 167, 1991.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006.

HAYALOGLU, A. A.; KIRBAG, S. Microbial quality and presence of moulds in Klufu cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 376 – 380, 2007.

HENLEY, J. P.; SADANA, A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 50 – 59, 1985.

HOARE, D. G.; OLSON, A.; KOSHLAND JR, D. E. The reaction of hydroxamic acids with water-soluble carbodiimides. A Lossen rearrangement. **Journal of the American Chemical Society**, v. 90, p. 1638 – 1643, 1968.

HORIKAWA, S.; OGAWARA, H. A simple and rapid procedure for removal of Triton X-100 from protein solution. **Analytical Biochemistry**, v. 97, p. 116 – 119, 1979.

HU, Y.; TANG, S.; JIANG L.; ZOU, B.; YANG, J.; HUANG, H. Immobilization of *Burkholderia cepacia* Lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2291 – 2299, 2012.

JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DJISKSTRA, B.W.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbial. Rev.** v.15, p. 29 – 63, 1994.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Tibtech**, v.16, p. 396 – 403, 1998.

JAEGER, K.E; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390 – 397, 2002.

JANG, K. H.; SONG, K. B.; KIM, J. S.; KIM, C. H.; CHUNG, B. H.; RHEE, S. K. Production of levan using recombinant levansucrase immobilized on hydroxyapatite. **Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 1, p. 89 – 93, 2000.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase--a critical review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 253 – 64, 2008.

JESUS, M.F.C.P.; BRANCO, R.N.; SANT'ANA JR., G.L.; FREIRE, D.M.G.; SILVA JR., J.G. *Penicillium restrictum* lipases: a comparative study and characterization of enzymes with different degrees of purity. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, 1999.

JIN, Z.; LIANG, S.; ZHANG, X.; HAN, S.; REN, C.; LIN, Y.; ZHENG, S. Synthesis of fructose laurate esters catalyzed by a CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cell biocatalyst in a non-aqueous system. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 2, p. 365 – 374, 2013.

KAHVECI, D.; XU, X. Repeated hydrolysis process is effective for enrichment of Omega-3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1552 – 1558, 2011.

KANWAR, L.; GOGOI, B. K.; GOSWAMI, P. Production of a Pseudomonas lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. **Bioresource Technology**, v.84, p. 207–211, 2002.

KAZLAUSKAS, R. J.; WEISSFLOCH, A. N. E.; RAPPAPORT, A. T.; CUCCIA, L. A. J. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 2656 – 2665, 1991.

KEBABCI, O.; CIHANGIR, N. Comparison of three *Yarrowia lipolytica* strains for lipase production: NBRC 1658, IFO 1195, and a local strain. **Turkish Journal of Biology**, v. 36, p. 15 – 24, 2012.

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. N. Immobilization of enzymes on transition metal-activated supports. **Methods in Enzymology**. V. 135, p. 117, 1987.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A. Principles of immobilization of enzymes. In: WISEMAN, A. Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd ed., New York, p. 147 – 201, 1986.

KIM, M. I.; HAM, H. O.; OH, S. D.; PARK, H. G.; CHANG, H. N.; CHOI, S. H. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized silica nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n. 1 – 4, p. 62 – 68, 2006.

KUMAR, S.; KIKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S. S.; GUPTA, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS – 3. **Protein Expression and Purification**, v. 41, p. 38 – 44, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.

LEE, K.; FOGLIA, T.A.; CHANG, K. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 79, p. 191 – 195, 2002.

LEE, G. A.; KIMB, J.; LEE, J. H. Development of magnetically separable polyaniline nanofibers for enzyme immobilization and recovery. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 466 – 472, 2008.

- LI, C.Y.; CHENG, C.Y.; CHEN, T.L. Production of *Acinetobacter radioresintens* lipase using Tween 80 as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p. 258 – 263, 2001.
- LIM, S.; LEE, K. Y.; LEE, Y. B.; SONG, K. B. Immobilization of levan fructotransferase for the production of di-fructose anhydride from levan. **Biotechnology Letter**, v. 23, p. 1335 – 1339, 2001.
- LIU, Z.; CHI, Z.; JING LI, L. W. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, 445 – 451, 2008.
- LÓPEZ-GALLEGU, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; *et al.* Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 1 – 10, 2005.
- LOURENÇO, T. C.; CASSIANO, N. M., CASS, Q. B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2155 – 2164, 2010.
- LOZANO, P.; DIEGO, T.; LARNICOL, M.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of racemic-phenylethanol in liquids and ionic liquids/supercritical carbon dioxide systems. **Biotechnology Letters**, v.28, p. 1559 – 1565, 2006.
- MALDONADO, R. R.; BURKERT, J. F. M.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Evaluation of lipase production by *Geotrichum candidum* in shaken flasks and bench-scale stirres bioreactor using different impellers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 147 – 151, 2012.
- MARCELINO, M.; BEUVIER, E.; GRAPPIN, R.; GUÉGUEN, M.; BENSON, D. R. Diversity of *Geotrichum candidum* strains isolated from traditional cheesemaking fabrications in France. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4752 – 4759, 2001.

MARGOLIN, A. L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. **Enzyme and Microbial Technology**, v.7, p. 113 – 119, 1996.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biosurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos, **Química Nova**, v. 31, p. 1942 – 1947, 2008.

MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 739 – 45, 2000.

MATEO, C.; ABIAN, O.; ERNEDO, M. B.; *et al.* Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 456 – 462, 2005.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451 – 1463, 2007.

MATYASH, L. F.; OGLOBLINA, O. G.; STEPANOV, V. M. Modification of carboxyl groups in pepsin. **European Journal of Biochemistry**, v. 35, p. 540 – 545, 1973.

MATSUMOTO, R. P. **Técnicas de imobilização e estabilização de lipases obtidas a partir de diferentes fontes microbianas**. Trabalho de conclusão de curso submetida à Faculdade de Engenharia Química da UNIFAL, 2014.

MATSUOKA, H.; MIURA, A.; HORI, K. Symbiotic effects of a lipase-secreting bacterium, *Burkholderia arboris* SL1B1, and a glycerol-assimilating yeast, *Candida cylindracea* SL1B2, on triacylglycerol degradation, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107(4), p. 401 – 408, 2009.

MEDVED'OVÁ, A.; LIPTÁKOVÁ, D.; HUDEC OVÁ, A.; VALÍK, L. Quantification of the growth competition of lactic acid bacteria: a case of co-culture with *Geotrichum candidum* and *Staphylococcus aureus*. **Acta Chimica Slovaca**, v. 1, p. 192 – 207, 2008.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. DE; RODRIGUES, D. D. S.; *et al.* Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1055 – 66, 2011.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 245 – 251, 2013.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Covalent attachment of lipases on glyoxyl-agarose beads: Application in fruit flavor and biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 78 – 85, 2014.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Microbial lipase: Production, properties and biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32 (2), p. 213 – 234, 2011.

MESSING, R. A. Immobilized Enzymes for Industrial Reactors. **Academic Press**, New York 1975.

MLADENOSKA, I.; DIMITROVSKI, A. – Lipase production by *Geotrichum candidum* – M2. **Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia**, v. 20, p. 39 – 43, 2001.

MOHAMAD, N.; BUANG, N. A.; MAHAT, N. A.; JAMALIS, J.; *et al.* Simple adsorption of *Candida rugosa* lipase onto multi-walled carbon nanotubes for sustainable production of the flavor ester geranyl propionate. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 32, p. 99 – 108, 2015.

MORAIS JÚNIOR, W. G.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J.; CARDOSO, V. L.; KAMIMURA, E. S.; PESSELA, B. C. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification**, v. 123, p. 26 – 34, 2016.

MORE, J.J.; WATSON, G.A. **The Levenberg-Marquardt algorithm: implementation and theory. Lecture Notes in Mathematics**. Springer Verlag, Berlin, v. 630, p. 105 – 116, 1977.

MOZAFFARIAN D. Fish, mercury, selenium and cardiovascular risk: current evidence and unanswered questions. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, p. 1894 – 1916, 2009.

NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. **Bioconjugate Chemistry**, v. 6, p. 123 – 130, 1995.

NASIPURI, D. **Stereochemistry of Organic Compounds**; John Wiley & Sons, New York, 1991.

NEILANDS, J. B.; STUMPF, P. K. **Outlines of Enzyme Chemistry**. New York: John Wiley & Sons Inc., p. 95 – 109, 1955.

NG, C. H.; YANG, K. Lipase in biphasic alginate beads as a biocatalyst for esterification of butyric acid and butanol in aqueous media. **Enzyme and Microbial Technology**, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 82, p. 173 – 179, 2016.

OKADA, T.; MORRISSEY, M.T. Production of n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate from sardine oil by lipase-catalyzed hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1411 – 1419, 2007.

OLIVEIRA, D. T. M. **Lipase extracelular de fungo filamentoso: Isolamento e caracterização parciais**. Dissertação de Mestrado, UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG – Brasil, 2000.

OLIVEIRA, R. M. **Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes**

temperaturas. Tese de Doutorado, UFV – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG – Brasil, 2006.

PALOMO, J. M. **Control y modulación de La selectividad de diferentes derivados de lipasas en reacciones de química orgânica en médios macro-acuosos.** Tese de Doutorado, UAM – Universidad Autónoma de Madrid, Madrid – Espanha, 2003.

PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Interfacial adsorption of lipase on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 20, n. 19 – 20, p. 279 – 286, 2002a.

PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. **Enzymes and Microbial Technology**. v. 31, p. 775 – 783, 2002b.

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447 – 454, 2005.

PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; SEGURA, R. L.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Purification, immobilization, hyperactivation, and stabilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Immobilization of Enzymes and Cells**. v. 22, p. 143 – 152, 2006.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v.77, p.149 – 162, 1999.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Plant lipases from latex: properties and industrial applications. **Química Nova**, v. 29, nº 1. São Paulo, 2006.

PASTORE, G.M.; COSTA, V.S.R.; KOBLITZ, M.G.B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p. 135 – 140, Campinas, 2003.

PENCREAC'H, J.; BARATTI, J.C. Comparison of hydrolytic activity in water and heptane for thirty-two commercial lipase preparations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 473 – 479, 2001.

PEREIRA, M. G.; FACCHINI, F. D. A.; POLIZELI, A. M.; VICI, A. C.; JORGE, J. A.; PESSELA, B. C.; FÉRNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; POLIZELI, M. L. T. M. Stabilization of lipase of *Hypocrea pseudokoningii* by multipoint covalent immobilization after chemical modification and application of the biocatalyst in oil hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v, 121, p. 82 – 89, 2015.

PERFETTI, R. B.; ANDERSON, C. D.; HALL, P. L. The chemical modification of papain with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide. **Biochemistry**, v. 15, p. 1735 – 1743, 1976.

PESSELA, B. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; FUENTE, M.; VIÁN, A.; GARCÍA, J. L.; CARRASCOSA, A. V.; GUISÁN, J. M. Reversible immobilization of a thermophilic β – galactosidase via ionic adsorption on PEI – coated Sepabeads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 369 – 374, 2003.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; COLOMBO, A. L.; KIBBLER, C.; NG, K. P.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A. *Candida Rugosa*, an Emerging Fungal Pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from de Artemis Disk Antifungal Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3578 – 3582, 2006.

PINHEIRO, T. L. F. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como micro-organismo.** Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada, Departamento de Ciências Agrárias, Erechim, RS – Brasil, 2006.

PRIETO, L. M. **Imobilização e estabilização de β -galactosidase em suportes convencionais e nanoestruturas e sua aplicação na hidrólise da lactose e na síntese de galacto-oligossacarídeos.** Tese de doutorado submetida à Escola de Química e Alimentos da UFRG, 2015.

QUILLES JR, J. C. **Imobilização de lipases por adsorção e ligação covalente em derivados de agarose e quitosana e a aplicação em biocatálise.** Dissertação de Mestrado, UNESP – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP – Brasil, 2015.

QUINN, D. M.; SHIRAI, K.; JACKSON, R. L.; HARMONY, J. A. K. Lipoprotein lipase catalyzed hydrolysis of water-soluble p-nitrophenyl esters. Inhibition by apoprotein C-II. **Biochemistry**, v. 21, p. 6872 – 6879, 1982.

RAHMAN, M. B. A.; MD-TAJUDIN, S.; HUSSEIN, M. Z.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification. **Applied Clay Science**, v. 29, p. 111 – 116, 2005.

RAMOS, M. D.; GÓMEZ, G. I. G.; GONZÁLEZ, N. S. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on bentonite modified with benzyltriethylammonium chloride. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 79 – 83, 2014.

RAMOS, E. Z.; MIOTTI JR, R. H.; CASTRO, P. F.; TARDIOLI, P. W.; MENDES, A. A.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; HIRATA, D. B. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization on the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 43 – 51, 2015.

RATHORE, S.; DESAI, P. M.; LIEW, C. V.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Review – Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 208 – 213, 2012.

RICHETTI, A. **Esterificação de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente.** Dissertação de Mestrado. UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia Química, Rio de Janeiro, RJ – Brasil, 2009.

RIEDIGER, N. D.; OTHMAN, R. A.; SUH, M.; MOGHADASIAN, M. H. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, p. 668 – 679, 2009.

RIGO, E.; NINOW, J. L.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, J. V.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 1132 – 1137, 2010.

RODRIGUES, R. C.; GODOY, C. A.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A. Z.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: critical role of chemical amination. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 963 – 968, 2009.

ROSA, D. R.; CAMAROTA, C. M.; FREIRE, D. M. G. Production and utilization of a new solid enzymatic preparation produced by *Penicillium restrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease. **Environmental Engineering Science**, v. 23(5), p. 814 – 23, 2006.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N.; BELTRÁN, S.; JAIME, I.; DE DIEGO, S. M.; SANZ, M. T.; CARBALLIDO, J. R. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 1–12, 2010.

RUEDA N.; SANTOS, J. C. S.; ORTIZ, C.; TORRES, R.; BARBOSA, O.; RODRIGUES, R. C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Chemical modification in the design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities. **The Chemical Records**, v. 16, p. 1436 – 1455, 2016.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil Mill effluent based médium using statistical experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 66 – 73, 2011.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, p. 513 – 521, 1958.

SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 339 – 247, 2003.

SCHAECHTER, M. **Desk Encyclopedia of Microbiology**, 2 ed., San Diego: Academic Press, p. 1276, 2009.

SECUNDO, F.; MIEHÉ-BRENDLÉ, J.; CHELARU, C.; FERRANDI, E. E.; DUMITRIU, E. Effective immobilization of *Candida antarctica* lipase B in organic-modified clays: Application for the epoxidation of terpenes. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, p. 350 – 361, 2008.

SHAHIDI, F. **Omega-3 oils: Sources, applications, and health effects**. In C. Barrow & F. Shahidi (Eds.), *Marine nutraceuticals and functional foods*, pp. 23 – 61, 2008.

SHANG, C.; LI, W.; ZHANG, R. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on ZnO nanowires/macroporous sílica composites for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. **Material Research Bulletin**, v. 68, p. 336 – 342, 2015.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purificatrion, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627 – 662 , 2001.

SHEVCHENKO, A.; JENSEN, O. N.; PODTELEJNIKOV, A. V.; SAGLIOCCO, F.; WILM, M.; VORM, O.; MORTENSEN, P.; SHEVCHENKO, A.; BOUCHERIE, H.; MANN, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93(25), p. 14440 – 14445, 1996.

SILVA JÚNIOR, I. J.; VEREDAS, V.; SANTOS, M. A. G.; SANTANA C.C. Cromatografia em leito móvel simulado na produção de substâncias enantiomericamente puras ou enriquecidas em larga escala. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1027 – 1037, 2006.

SILVA, R.; SOUZA, R.; SANTANA, J.; TAMBOURGI, E. Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 642 – 648, 2008.

SIQUEIRA, A. C. R. **Bioprocessos fermentativos, purificação, caracterização e estabilização de peptidase secretada pelo fungo *Aspergillus terreus***. Dissertação de Mestrado, USP – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP – Brasil, 2013.

SIVARAMARKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A. Purification and characterization of solvent tolerant lipase from *Bacillus* sp. for methyl Ester production from algal oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121 (5), p. 517 – 522, 2016.

SOARES, C.M.F. **Otimização por Planejamento Experimental da Imobilização de Lipase em Sílica de Porosidade Controlada na Presença de Estabilizantes**. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas, SP. Brasil, 2000.

SOLER, L.; ILLANES, A.; WILSON, L. Immobilization of *Alcaligenes* sp. lipase as catalyst for the transesterification of vegetable oils to produce biodiesel. **Catalysis Today**, v. 259, p. 177 – 182, 2015.

SOULTANI, S.; ENGASSER, J.M.; GHOU, M. Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 725 – 731, 2001.

SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solidstate ermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis, **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2607 – 2612, 2009.

TAI, Y.; ZHANG, K. Enzyme-assisted synthesis of plant oil-based polymers. **Bio-based Plant Oil Polymers and Composites**, p. 127 – 148, 2016.

TAMILARASAN, K.; KUMAR, M. D. Purification and characterization of solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* MTCC 7542. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 309 – 313, 2012.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida sp.* and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 459 – 465, 2003.

TAN, T.; CHEN, B.; YE, H. Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl palmitate by lipase immobilized on fabric membranes in the batch reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, p. 41 – 45, 2006.

TERRASAN, C. R. F. **Xilanases, β -xilosidases de *Penicillium janczewskii*: purificação, caracterização e aplicação no branqueamento da polpa celulósica e para ração animal.** Tese de Doutorado, UNESP – Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, SP – Brasil, 2011.

TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: Crystals or carriers? **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 326 – 335, 1999.

TOMMASO, G.; MORAES, B. S.; MACEDO, G. C.; SILVA, G. S.; KAMIMURA, E. S. Production of lipase from *Candida rugosa* using cheese whey through experimental design and surface response methodology. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1473 – 1481, 2010.

TORRES, R.; ORTIZ, C.; PESSELA, B. C.; PALOMO, J. M.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M. FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 167 – 171, 2006.

TSAI, S. W.; HUANG, C. M. Enantioselective synthesis of (S)-suprofen ester prodrugs by lipase in cyclohexane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 8 – 9, p. 682 – 688, 1999.

TURATI, D. F. M. **Purificação, imobilização e caracterização bioquímica de lipase produzida por *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 em cultivo submerso.** Dissertação de mestrado submetida ao Instituto de Biociências da UNESP, 2015.

UNGCHAROENWIWAT, P.; H-KITTIKUN, A. Purification and characterization of lipase from *Burkholderia* sp. EQ3 isolated from wastewater from a canned fish factory and its application for the synthesis of wax esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 96 – 104, 2015.

VANNICE, G.; RASMUSSEN, H. Position of the academy of nutrition and dietetics: dietary fatty acids for healthy adults. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 114, p. 136 – 153, 2014.

VARGAS, G. D. L. P.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; BENETI, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LUCCIO, M. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 1, p. 47 – 54, 2007.

VERGER, R. Enzyme kinetics of lipolysis. **Methods in Enzymology**, v. 64, p. 340 – 392, 1980.

VICHENEWSKI, W.; Em: **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; 6.ed.; Editora da UNICAMP: Campinas, p. 59, 1995.

VIEIRA, G. A. B.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; MELO, V. M. M.; GONZALO, G.; GOTOR-FERNANDEZ, V.; GOTOS, V. Chemoenzymatic synthesis of optically active Mugetanol isomers: use of lipases and oxidoreductases in fragrance chemistry, **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20(2), p. 214 – 219, 2009.

VOCUS, PRWEB. **Global Industrial Enzymes Market to reach US\$3.74 billion by 2015, according to a new report by Global Industry Analysts, Inc. 2011.** Disponível em: http://www.prweb.com/releases/industrial_enzymes/proteases_carbohydrases/prweb8121185.htm. Acessado em: 03/11/2016.

VULFSON, E. N.; WOOLLEY, P.; PETERSEN, S. B. **Lipases: their Structure, Biochemistry and Application**. Cambridge University Press, United Kingdom, p. 271 – 288, 1994.

WESTPHAL, C.; KONKEL, A.; SCHUNCK, W. H. CYP-eicosanoids – a new link between omega-3 fatty acids and cardiac disease? **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 96, n. 1 – 4, p. 99 – 108, 2011.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**, 7 ed., p. 581, 2010.

WOLSKI, E.; MENUSI, E.; REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, J.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium sp.* In solid state and submerged fermentation: A comparative study, **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1557 – 1560, 2008.

YADAV, G. D.; JAGHAV, S. R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 86, n. 1 – 3, p. 215 – 222, 2005.

YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chemical Engineering Journal**, v. 134, p. 262 – 267, 2007.

YAN, Y.; ZHANG, X.; CHEN, D. Enhanced catalysis of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 immobilized on macroporous resin and its application in enrichment of polyunsaturated fatty acids. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 179 – 187, 2013.

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2095 – 2103, 2005.

YANG, J.; GUO, D.; YAN, Y. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 91 – 96, 2007.

YASHODHARA, B. M.; UMAKANTH, S.; PAPPACHAN, J. M.; BHAT, S. K.; KAMATH, R.; CHOO, B. H. Omega-3 fatty acids: A comprehensive review of their role in health and disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 85, p. 84 – 90, 2009.

YE, P.; XU, Z. K.; WANG, Z. G.; WU, J.; DENG, H. T.; SETA, P. Comparison of hydrolytic activities in aqueous and organic media for lipases immobilized on poly (acrylonitrile-*co*-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membrane. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 32, p. 115 – 121, 2005.

YE, P.; XU, Z. K.; WU, J.; INOCENT, C.; SETA, P. Entrusting poly (acrylonitrile-*co*-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membranes with biomimetic surfaces for lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, n. 1 – 2, p. 30 – 37, 2006.

ZENG, H.; LIAO, K.; DENG, X.; JIANG, H.; ZHANG, F. Characterization of the lipase immobilized on Mg–Al hydrotalcite for biodiesel. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 791 – 798, 2009.

APÊNDICE A

DOSAGEM DE PROTEÍNA

A dosagem de proteína foi realizada pelo Método de Bradford (1976), utilizando-se o Reagente de Bradford.

Reagente de Bradford: adicionou-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95% e 100 mL ácido fosfórico 85%. Avolumou-se a solução em 1 L com água deionizada. Filtrou-se a solução em filtro quantitativo (Whatman nº 1). Armazenou-se o filtrado em frasco âmbar na geladeira.

Para a dosagem de proteína fazia-se a diluiu-se as amostras para que a absorbância situasse na faixa de 0,0 a 1,0. As soluções padrão foram preparadas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 com adição de NaCl 150 mM. Uma solução mãe de albumina bovina BSA no tampão salino para que, a partir dela, fossem feita as diluições a serem analisadas. Foi adicionado 1 mL do reagente de Bradford em tubos de ensaio contendo 0,1 mL de cada solução de BSA em diferentes concentrações. Ao final efetuou a medida da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro, utilizando cubetas de acrílico. Para o branco utilizou-se água ao invés da solução de BSA.

A leitura da absorbância foi convertida em concentração de proteína pela curva de calibração realizada anteriormente pelo mesmo procedimento, com medidas de absorbância em relação a concentrações de BSA na faixa de 0 a 100 mg/L, que resultou em uma equação linear.

Os dados utilizados para determinação da curva padrão, bem como o gráfico e a equação da curva padrão obtida são apresentados na Tabela A.1 e na Figura A.1.

Tabela A.1 – Dados obtidos para a curva padrão pelo Método de Bradford

Curva Padrão	
Absorbância (λ)	Concentração BSA (mg/L)
0,0258	10,0
0,0398	20,0
0,0519	30,0
0,0559	40,0
0,0690	50,0
0,0810	60,0
0,0821	70,0
0,0972	80,0
0,1096	100,0

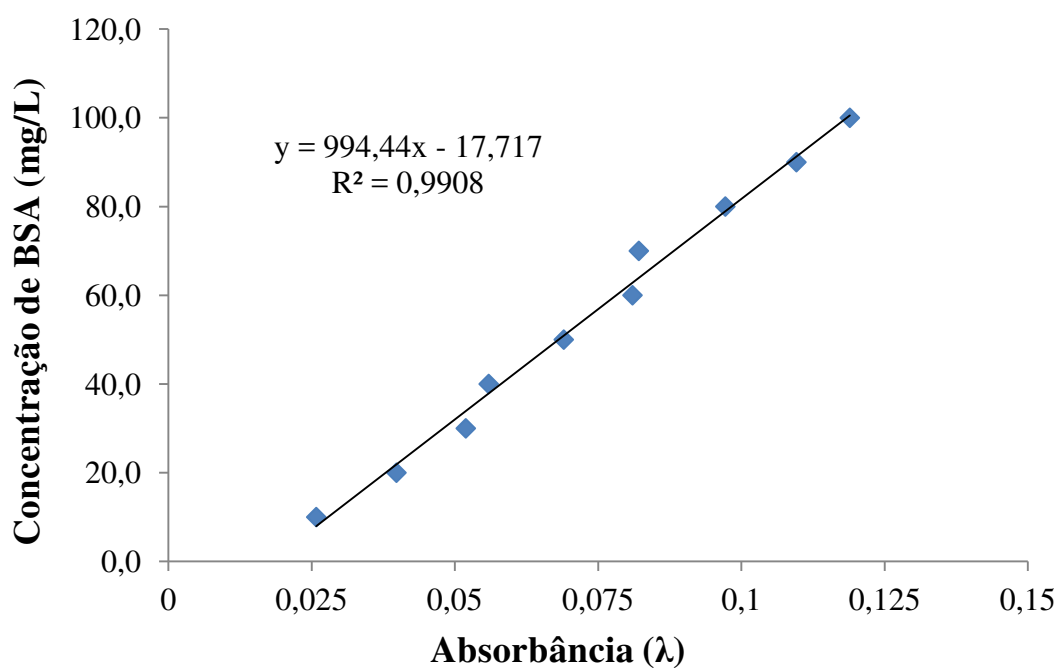


Figura A.1 – Curva padrão obtida para a dosagem de proteínas pelo Método de Bradford

APÊNDICE B

CONCENTRAÇÕES DE EPA E DHA

Para avaliar a concentração de EPA e DHA, foram amostradas 20 μL de cada solução padrão para serem analisadas em HPLC de fase reversa acoplado à um detector UV em fluxo de 1,0 mL/min. As áreas de integração foram perfeitamente proporcionais às concentrações de PUFA (Figura B.1). As curvas cromatográficas resultantes das análises em HPLC foram comparadas com as curvas de calibração correspondentes e, assim, as taxas de hidrólise de cada um dos ácidos graxos e a razão EPA/DHA puderam ser calculadas (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2011).

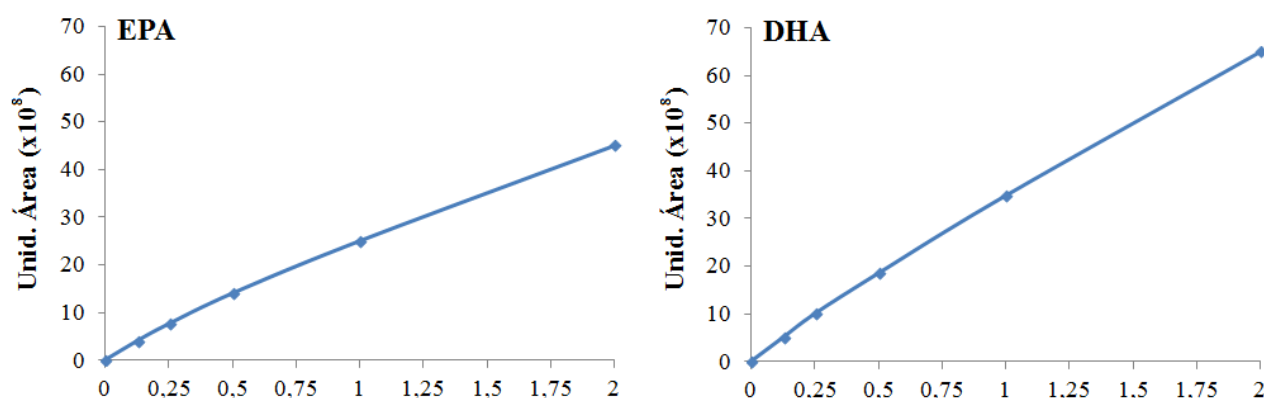


Figura B.1 – Respostas do detector UV para EPA e DHA em diferentes concentrações.