



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Programa de Pós-graduação em Química

Lucas Pires Rodrigues

**EMPREGO DE DERIVADOS CELULÓSICOS ESTERIFICADOS NA
IMOBILIZAÇÃO DA FOSFOLIPASE LECITASE® ULTRA**

Uberlândia – MG
2018

LUCAS PIRES RODRIGUES

**EMPREGO DE DERIVADOS CELULÓSICOS ESTERIFICADOS NA
IMOBILIZAÇÃO DA FOSFOLIPASE LECITASE® ULTRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Maria Nascimento de Assunção.

Uberlândia – MG

2018

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

R696e
2018 Rodrigues, Lucas Pires, 1990-
Emprego de derivados celulósicos esterificados na imobilização da
fosfolipase Lecitase® Ultra / Lucas Pires Rodrigues. - 2018.
79 f. : il.

Orientadora: Rosana Maria Nascimento de Assunção.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.201>
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Fosfolipases - Teses. 3. Enzimas - Teses. 4.
Esteres - Teses. I. Assunção, Rosana Maria Nascimento de. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

CDU: 54

Maria Salete de Freitas Pinheiro – CRB6/1262



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 271/PPQUI.

DATA: 31/01/2018

DISCENTE: Lucas Pires Rodrigues

MATRÍCULA: 11522QMI009

TÍTULO DO TRABALHO: Emprego de derivados celulósicos esterificados na imobilização da fosfolipase lecitase ultra.


ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

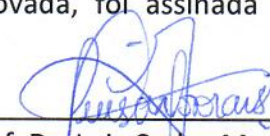
LINHA DE PESQUISA: Físicoquímica de Macromoléculas e coloides

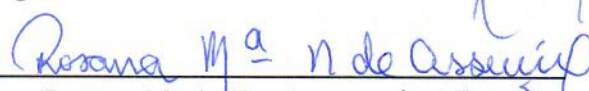
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Estudo e caracterização de matrizes e/ou blendas pliméricas oriundas de polímeros de fonte renovável e não renovável e suas aplicações

Às quatorze horas do dia trinta e um de janeiro do ano dois mil e dezoito, no(a) Auditório A do Bloco 50 no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelo Prof. Dr. Guimes Rodrigues Filho, Universidade Federal de Uberlândia, Prof. Dr. Luis Carlos Moraes, Universidade Federal do Triângulo Mineiro e Profª Dra. Rosana Maria Nascimento de Assunção, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 45 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Guimes Rodrigues Filho


Prof. Dr. Luis Carlos Moraes


Profª Dra. Rosana Maria Nascimento de Assunção

*“Nós devemos ser a mudança que desejamos
para o mundo.”*

(Gandhi)

*Aos meus pais, Rejane e Wilson, e aos
meus avós, Jeovah e Laudelina.*

*À memória do Professor Manuel G.
Hernandez-Terrones.*

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, pela oportunidade de viver, pelo sopro de vida que me impulsiona e por permitir reconhecê-lo como o sentido de tudo.

Aos meus pais, Wilson e Rejane, pela instrução que me deram, ensinamentos, apoio, respeito, amor e por sempre acreditarem em mim. Reverencio tudo que fizeram por mim e me fizeram ser o que sou.

Aos meus avós, Jeovah e Laudelina, por conseguirem me ensinar apenas com sua existência.

À minha irmã, Meni Loren, e ao meu cunhado, Neilton, pelo carinho e respeito sempre dispensados.

Aos meus pequenos, Murilo, Isabele, Sophia, Mariana e Maurício, por me ensinarem a beleza, a cor e a pureza da vida.

À toda minha família. Vocês são o abraço que Deus me dá.

Aos meus amigos Alessandro Alves, Leidinete Rodrigues, Mariana A. Henrique, Rosilaine Silva e Tereza Salvatini, por tudo que significaram para mim nestes últimos dois anos onde estive cursando este mestrado. Obrigado pelo carinho, motivação, atenção e por tanto me ensinarem. Vocês fazem parte da minha evolução.

Às professoras Dr^a. Rosana Maria Nascimento de Assunção e Dr^a. Líbia Diniz Santos, por terem abraçado o projeto deste mestrado desde a primeira vez que me apresentei a elas. Obrigado pela paciência, por todo ensinamento e pelo que tenho alcançado através de vocês.

À equipe de técnicos de laboratório do curso de Biotecnologia do *campus* Patos de minas: Carla, Luciana, Milton, Renan e Vanessa. Obrigado pelo apoio durante todo este período e pela amizade de vocês. Esse mestrado não foi abraçado só por mim, mas por vocês também.

À Luiza Hipólito, por ter sido tão solícita em colaborar com o trabalho. Grato pela grande contribuição e pelo conhecimento que temos construído juntos.

À Laís Ferreira e à Vivian Schmidt, pela convivência, amizade, paciência e apoio.

Ao grupo de Reciclagem de Polímeros, que mesmo com minha distância física, sempre se demonstraram tão solícitos e acolhedores.

Aos queridos Dalyelli de Souza, Enyara Moraes, Leandro Faustino, Luciana Almeida, Mariana A. Henrique, Mônica Rodrigues e Pedro Bertarini, pela colaboração dada a este trabalho.

À equipe de técnicos do curso de Engenharia de Alimentos, do *campus* Patos de Minas, por disponibilizarem os laboratórios e equipamentos conforme necessidade do trabalho.

À Francielle Silva, por ter sido sempre solícita em colaborar e pela parceria nesse trabalho.

Ao Instituto de Genética e Bioquímica e a toda equipe do curso de Biotecnologia do *campus* Patos de Minas, pela flexibilização do horário para realização do mestrado, pelo uso do espaço físico para desenvolvimento da pesquisa e por aqueles que colaboraram com conversas e sugestões.

À LNF Latino Americana pelo fornecimento da Lecitase[®] Ultra.

Aos órgãos de fomento à pesquisa: CAPES, CPNQ (406838/2013-5) e FAPEMIG.

A todos que de alguma forma contribuíram e torceram pela concretização deste trabalho.

Minha sincera gratidão!

RESUMO

Processos enzimáticos se destacam diante de outros processos catalíticos devido a elevada seletividade, atividade das enzimas, eficiência e condições experimentais mais brandas, como temperaturas de trabalho próximas à temperatura ambiente, e meios ácido ou básico com baixa concentração. Entretanto, as enzimas livres são bastante instáveis no meio reacional e de difícil recuperação. Diante disto, a imobilização das enzimas em suportes poliméricos pode oferecer a estabilidade necessária para a realização de vários ciclos catalíticos. Neste trabalho, matrizes celulósicas esterificadas – diacetato de celulose (DAC), triacetato de celulose (TAC) e acetato butirato de celulose (ABC) – bem como a polpa celulósica Kraft (CELP) e a celulose microcristalina (CELM) foram testadas para imobilização por adsorção física da fosfolipase comercial Lecitase® Ultra (LU). As matrizes celulósicas foram avaliadas em relação a presença dos grupos funcionais por espectroscopia na região do infravermelho, onde observa-se que o TAC apresenta maior grau de substituição devido a baixa intensidade da banda que indica a presença de hidroxilas e a elevada intensidade da banda de carbonila. Este derivado apresentou maior retenção de atividade enzimática em relação aos demais derivados. O TAC foi submetido à otimização da metodologia de imobilização por delineamento composto central rotacional (DCCR), tendo como alvo de investigação a concentração de LU na solução tampão de imobilização, pH e temperatura e a interação entre esses fatores. Foram feitas regressões múltiplas a partir dos dados experimentais obtidos na matriz do DCCR e construídas superfícies de resposta para o rendimento da imobilização e para a concentração de enzima no derivado bioativo obtido pela imobilização. Tendo como objetivo uma alta carga enzimática sobre a superfície do TAC, identificou-se como região ótima de trabalho, um pH inferior a 4,00, temperaturas superiores a 40°C e uma concentração de LU na solução tampão superior a 350 mg de proteína/g de suporte. A maior concentração de enzima sobre o TAC foi encontrada em uma concentração de LU no tampão de 370,94 mg de proteína/g de suporte, 45,2°C e pH de 1,95, obtendo, experimentalmente, um derivado bioativo de 251,41 mg de proteína/g de suporte. Esse derivado bioativo otimizado foi utilizado para degomagem de óleo de soja, permitindo a remoção das gomas e levando ao aumento da acidez devido a

hidrólise dos triglicerídeos nesta condição mostrando que tanto a enzima livre como imobilizada tem elevada atividade enzimática. Entretanto, a enzima imobilizada promove menor hidrólise o que pode estar relacionada a uma possível modulação da sua atividade, no sentido de amenizar sua ação hidrolítica sobre ácidos graxos de triglicerídeos, identificada pela análise do índice de acidez do óleo de soja bruto e degomado. Os resultados mostraram que o uso do TAC como suporte para adsorção da LU provou-se promissor, pela alta capacidade de retenção enzimática e manutenção da atividade catalítica da enzima após imobilização.

Palavras-chave: éster de celulose; fosfolipase; imobilização enzimática; Lecitase Ultra; triacetato de celulose.

ABSTRACT

Enzymatic processes stand out from other catalytic processes due to high selectivity, enzyme activity, efficiency and milder experimental conditions, such as working temperatures close to ambient temperature, and acidic or basic media with low concentration. However, the free enzymes are quite unstable in the reactional environment and difficult to recover. In view of this, immobilization of the enzymes in polymeric supports can provide a stability necessary for the accomplishment of several catalytic cycles. In this work, esterified cellulosic matrices - cellulose diacetate (CDA), cellulose triacetate (CTA) and cellulose acetate butyrate (CAB) - as well as Kraft pulp cellulose (PCEL) and microcrystalline cellulose (MCEL) were tested for immobilization by physical adsorption of the commercial phospholipase Lecitase[®] Ultra (LU). The cellulosic matrices were evaluated in relation to the presence of the functional groups by infrared spectroscopy, where it is observed that the CTA has a higher degree of substitution due to the low intensity of the band indicating the presence of hydroxyls and the high intensity of the carbonyl band. This presented higher retention of enzymatic activity in relation to the other derivatives. The CTA was subjected to optimization of the immobilization methodology by Central Rotational Composite Design (CRCD), with the objective of investigating the concentration of LU in the immobilization buffer solution, pH and temperature and the interaction between these factors. Multiple regressions were made from the experimental data obtained in the CRCD matrix and response surfaces were constructed for immobilization yield and enzyme concentration in the bioactive derivative obtained by immobilization. A high enzymatic loading on the surface of the CTA was identified as an optimal working region, a pH lower than 4.00, temperatures higher than 40°C and a concentration of LU in the buffer solution greater than 350 mg of protein/g support. The highest enzyme concentration on CTA was found at a concentration of LU in the buffer of 370.94 mg protein/g support, 45.2°C and pH of 1.95, obtaining a bioactive derivative of 251.41 mg protein/g support, experimentally. This optimized bioactive derivative was used to deguminate soybean oil, allowing the removal of the gums and leading to an increase in acidity due to the hydrolysis of the triglycerides in this condition showing that both the free and immobilized enzyme has high enzymatic activity. However, the enzyme immobilizes promotes less hydrolysis, which may be related to a possible

modulation of its activity, in order to reduce its hydrolytic action on triglyceride fatty acids, identified by the acidity index of crude and degummed soybean oil. The results showed that the use of TAC as support for adsorption of LU proved promising, due to the high capacity of enzymatic retention and maintenance of the catalytic activity of the enzyme after immobilization.

Keywords: cellulose ester; phospholipase; enzymatic immobilization; Lecitase Ultra; cellulose triacetate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação das enzimas imobilizadas segundo IUPAC (1995).	23
Figura 2 – Esquema da exposição interfacial do sítio ativo de lipases e fosfolipases A ₁	25
Figura 3 - Imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos.	26
Figura 4 - Estrutura do derivado celulósico (DAC, TAC ou ABC).	28
Figura 5 – Locais de atividade hidrolítica das fosfolipases sobre glicerofosfolípeos.	30
Figura 6 – Possibilidades de investigação da influência de três parâmetros sobre um procedimento experimental.	33
Figura 7 – Esquema da hidrólise do p-nitrofenil palmitato via hidrólise por enzima com atividade lipolítica.	39
Figura 8 - Espectro na região do infravermelho para as matrizes celulósicas.....	48
Figura 9 – Rendimento da Imobilização de Diferentes Matrizes Celulósicas	50
Figura 10 – Gel obtido após análise de derivados bioativos de matrizes celulósicas analisados em eletroforese.	51
Figura 11 - Teste de Imobilização com diferentes tampões.	53
Figura 12– Gráfico de Pareto da regressão do DCCR em função do rendimento da imobilização.....	58
Figura 13 – Superfície de resposta e curva de contorno da influência do pH e da temperatura sobre o rendimento da imobilização.....	59
Figura 14 – Superfície de resposta e curva de contorno da influência da temperatura e da concentração de LU da solução tampão sobre o rendimento da imobilização..	60
Figura 15 - Superfície de resposta e curva de contorno da influência do pH e da concentração de LU da solução tampão sobre o rendimento da imobilização.....	60
Figura 16 – Gráfico de Pareto da regressão do DCCR em função da concentração de enzima por massa de derivado bioativo	63
Figura 17 - Superfície de resposta e curva de contorno da influência do pH e da temperatura sobre a concentração de enzima na superfície do suporte.	64

Figura 18 - Superfície de resposta e curva de contorno da influência da temperatura e da concentração de LU da solução tampão sobre a concentração de enzima na superfície do suporte.	64
Figura 19 - Superfície de resposta e curva de contorno da influência do pH e da concentração de LU da solução tampão sobre a concentração de enzima na superfície do suporte.	65
Figura 20 – Gel de eletroforese realizada com enzima imobilizada em TAC em condições não-otimizadas e otimizadas.	68
Figura 21 – Índice de acidez das amostras de óleo bruto e degomado.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores utilizados no DCCR para determinação da retenção máxima de LU em TAC.	44
Tabela 2 – Proporções de Lecitase Ultra livre e imobilizada em testes de simulação de degomagem	46
Tabela 3 - Matriz do DCCR e resposta para a fosfolipase LU.....	55
Tabela 4 – Dados da regressão múltipla do DCCR em função do rendimento da imobilização.....	57
Tabela 5 – Dados da Regressão dos dados do DCCR em função da concentração de enzima no derivado bioativo.....	62
Tabela 6 – Validação do Planejamento do Composto Central	67
Tabela 7 – Índice de acidez das amostras de óleo bruto e óleo degomado.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC – Acetato Butirato de Celulose

CELM – Celulose Microcristalina

CELP – Celulose em Polpa Kraft

DAC – Diacetato de Celulose

DB – Teste Com Derivado Bioativo

DCC – Delineamento Composto Central

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

FLA1 – Fosfolipases A₁

FLA2 – Fosfolipases A₂

FLB – Fosfolipases B

FLC – Fosfolipases C

FLD – Fosfolipases D

GS – Grau de Substituição

IVTF – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

LU – Lecitase[®] Ultra

TA – Teste Sem Enzima

TAC – Triacetato de Celulose

TEMED – Tetrametiletilendiamina

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

PAGE – *Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)

pNF – p-Nitrofenol

pNFP – p-Nitrofenil Palmitato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Imobilização Enzimática	22
2.1.1 Imobilização de Lipases e Fosfolipases Via Adsorção Interfacial em Suportes Hidrofóbicos.....	24
2.1.2 Derivados celulósicos como suportes para imobilização de enzimas	27
2.2 Enzima estudada: fosfolipase	29
2.2.1 Classificação de Fosfolipases	30
2.3 Fosfolipase Comercial Lecitase® Ultra	32
2.4 Otimização de processos por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	33
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral.....	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	38
4.1 Materiais	38
4.2 Caracterização da matriz celulósica por espectrometria na região do infravermelho por transformada de Fourier - IVTF	39
4.3 Metodologias para identificação de retenção de atividade enzimática e de proteínas	39
4.3.1 Determinação de Atividade Lipolítica	39
4.3.2 Identificação de proteína via eletroforese em gel	40
4.4 Otimização de Imobilização em Suporte Celulósico Esterificado	41
4.4.1 Imobilização da Fosfolipase Lecitase Ultra	41
4.4.2 Estudo da imobilização da fosfolipase em celulose e derivados celulósicos esterificados.....	42
4.4.3 Teste de imobilização com diferentes soluções tampão.....	42
4.4.4 Otimização de parâmetros para imobilização da fosfolipase Lecitase Ultra em uma matriz celulósica esterificada por DCCR.....	43
4.5 Ação do derivado bioativo de celulose esterificada sobre óleo de soja bruto.....	45
4.5.1 Determinação do Índice de Acidez.....	45
4.5.2 Procedimento para degomagem de óleo de soja bruto	45

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Seleção da matriz celulósica com maior retenção de atividade enzimática	48
5.2 Viabilidade de uso do tampão de Britton-Robinson em processos de imobilização enzimática.....	52
5.3 Otimização do processo de imobilização da Lecitase Ultra	54
<i>5.3.1 Análise dos resultados obtidos para a resposta de rendimento de imobilização</i>	57
<i>5.3.2 Análise dos resultados obtidos para a concentração de enzima no derivado bioativo.....</i>	61
<i>5.3.3 Validação do modelo.....</i>	65
5.4 Ação do derivado bioativo sobre óleo de soja bruto.....	69
6 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

Processos enzimáticos, comparados a processos catalíticos convencionais, se destacam devido à sua elevada atividade catalítica, seletividade, eficiência e por favorecer condições reacionais mais brandas, como temperaturas de trabalho próximas à temperatura ambiente e meios ácido ou básico com baixa molaridade. Por este motivo, os biocatalisadores tem sido alvo de investigações para aplicação industrial (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

As enzimas mais utilizadas na química orgânica são as hidrolases, grupo que inclui proteases, celulasas, amilases e lipases (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Além destas, fosfolipases também são muito utilizadas industrialmente, principalmente em processos de degomagem de óleo, direcionados para indústria alimentícia, farmacêutica ou de biocombustíveis (DE MARIA et al., 2007). Estudos recentes também demonstram o uso da fosfolipase como catalisadora da reação de transesterificação (HIRATA et al., 2016a; TACIAS-PASCACIO et al., 2017).

Devido à possibilidade de inativação das enzimas por fatores químicos, físicos ou biológicos durante processos ou estocagem e na tentativa de estabilizá-las e também reutilizá-las, técnicas de imobilização são utilizadas variando-se os suportes e os meios de retenção destas proteínas.

Vários polímeros são utilizados como suporte para imobilização de enzimas, tais como agarose, sefarose, decaoctil, nanotubos de carbono (ASURI et al., 2006; PEREIRA et al., 2015). Alguns estudos indicam o uso de materiais lignocelulósicos e celulósicos com o mesmo intuito, dando também alternativa ao reaproveitamento dos resíduos agroindustriais (BRÍGIDA, 2010; KIM et al., 2015; KOSAKA et al., 2007; SUN et al., 2015).

Comumente, as principais variáveis investigadas em processos de imobilização são a concentração da enzima na solução para imobilização, temperatura e pH. Neste trabalho será investigada a imobilização por adsorção física da enzima comercial Lecitase[®] Ultra (LU), uma fosfolipase produzida pela *Novozymes*. Embora a literatura relacionada a imobilização de enzimas seja extensa, o estudo de imobilização da LU aparece em número muito pequeno de trabalhos nos quais avaliam-se diferentes suportes e diferentes métodos de imobilização, como adsorção superficial ou por ligação covalente, por exemplo (CABRERA et al., 2008; LIU et al., 2012; TACIAS-

PASCACIO et al., 2017). É importante ressaltar que não existem trabalhos que explorem o uso de derivados lignocelulósicos na imobilização por adsorção da LU.

Diante do exposto, neste trabalho cinco derivados celulósicos foram empregados nos estudos iniciais de imobilização da LU por adsorção física: celulose em polpa Kraft (CELP), celulose microcristalina (CELM), diacetato de celulose (DAC), triacetato de celulose (TAC) e acetato butirato de celulose (ABC). Neste estudo, o parâmetro avaliado para definir o derivado que teria o processo de imobilização otimizado foi o maior rendimento de imobilização e a identificação/separação da proteína enzimática por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Com o intuito de obter um derivado bioativo – definido aqui como o biocatalisador obtido pelo processo de imobilização – com alta carga enzimática, será utilizada a técnica do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que permite fazer uma análise estatística multivariada do processo imobilização. No estudo, as variáveis experimentais foram a relação de enzima por massa de suporte no tampão de imobilização, a temperatura e o pH, visando alterações nas seguintes respostas: rendimento de imobilização e concentração de enzima na superfície do derivado bioativo. Através desta técnica é possível analisar a influência de cada parâmetro de modo individual e a interação entre eles na obtenção do produto final.

Com o intuito de testar a ação da enzima imobilizada, o derivado bioativo obtido nas condições de imobilização indicadas pela otimização do processo foi utilizado em um processo de degomagem de óleo de soja bruto. A identificação da sua ação catalítica foi investigada à partir da análise do índice de acidez do óleo bruto e modificado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

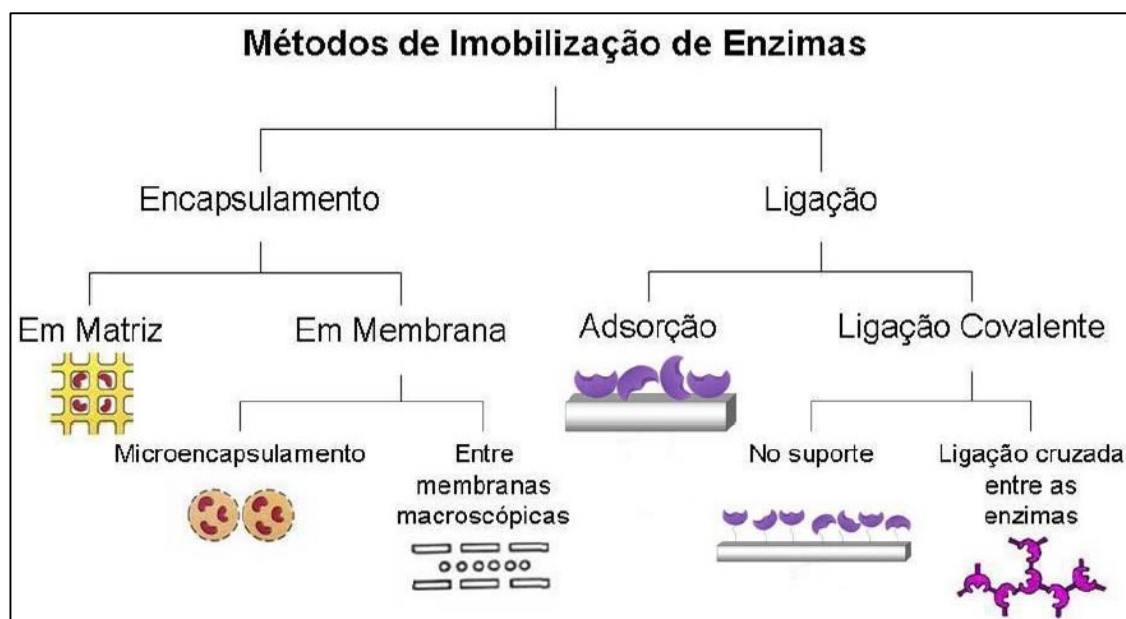
2.1 Imobilização Enzimática

As enzimas apresentam-se como catalisadores versáteis em processos de biotransformação, onde estruturas químicas sofrem modificações ou interconversões, e por apresentarem especificidade tanto de substrato, como na formação de produtos. As primeiras pesquisas envolvendo reações em meio orgânico catalisadas por enzimas datam do início do século XX, mas as pesquisas neste sentido se expandiram após a década de 80, após a compreensão de que as enzimas conservam sua estrutura catalítica ativa também em meios não-aquosos (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

De modo geral, as enzimas não são catalisadores químicos estáveis. Quando livres podem não apresentar seus valores máximos de atividade ou nem mesmo as enantiosseletividade e regioseletividade esperadas. Além disso, a catálise pode ser impossibilitada durante a reação, uma vez que as enzimas podem sofrer inativação por fatores químicos dependendo do solvente utilizado. Nesse sentido, técnicas de imobilização de enzimas se apresentam como alternativa para otimizar a estabilidade dessas, além de facilitar a sua recuperação e reutilização (DALLA-VECCHIA et al., 2004; FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

A IUPAC (1995 *apud* BRÍGIDA, 2010) define enzimas imobilizadas como “aquelas que se encontram fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço com retenção de sua capacidade catalítica, e que podem ser utilizadas repetida e continuamente”. A IUPAC (1995) classifica ainda as enzimas imobilizadas em quatro grupos, conforme Figura 1.

Figura 1 - Classificação das enzimas imobilizadas segundo IUPAC (1995).



Fonte: Brígida (2010)

A imobilização de uma enzima por encapsulamento consiste na retenção física da proteína em uma matriz polimérica. Uma vez que não há fortes interações químicas entre suporte e enzima, não há mudanças estruturais ou interações com o centro ativo. A microencapsulação também se trata de um processo de confinamento da enzima, mas neste caso a proteína é totalmente envolvida pelo sistema, com uma película do polímero isolando a enzima do meio externo. Em um biocatalisador onde há confinamento de enzima nestas condições, os substratos e produtos se difundem através dos poros da matriz polimérica. Devido ao seu tamanho, a difusão da enzima é impossibilitada. Esta via de imobilização é limitada pela velocidade da difusão de produtos e substratos e nesse caso, a concentração destes no meio reacional se torna um fator determinante (BRÍGIDA, 2010; DALLA-VECCHIA et al., 2004).

A imobilização por adsorção se dá quando a enzima se liga a algum suporte sólido por interações intermoleculares como forças de van der Waals, ligações hidrofóbicas, adsorção física, interações iônicas ou a combinação destas (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Esta técnica é muito utilizada para obtenção de biocatalisadores insolúveis (KENNEDY et al., 1988 *apud* BRÍGIDA, 2010). Esses biocatalisadores demonstram melhor desempenho em meios orgânicos e anidros, minimizando assim a dessorção das enzimas imobilizadas (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998). Diversos materiais são utilizados como suporte para imobilizar enzimas

via adsorção, como polímeros hidrofóbicos e iônicos (PEREIRA et al., 2015), matrizes celulósicas (BRÍGIDA, 2010; KIM et al., 2015; KOSAKA et al., 2007) e nanomateriais, tais como nanopartículas, nanofibras, nanotubos e matrizes nanoporosas (WANG, 2006). Pela grande possibilidade de materiais que podem ser utilizados como suporte e por se tratar de uma técnica simples e de baixo custo, a adsorção física superficial costuma ser uma das técnicas mais comuns de imobilização.

O procedimento de imobilização por ligação covalente consiste na fixação da enzima pela formação de ligações covalentes entre grupos funcionais da enzima e grupos funcionais do suporte (BRÍGIDA, 2010). Nesta técnica, os grupos ativos do suporte são inativados após imobilização, impossibilitando outras interações entre a proteína e o polímero, conferindo estabilidade à enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

Os mesmos agentes químicos que podem promover a ligação enzima-suporte, podem também promover a ligação cruzada enzima-enzima. Essas enzimas imobilizadas sem suporte podem ser agregadas com ligação direta por esses agentes químicos à partir de diferentes preparações, como enzimas dissolvidas, cristalizadas, liofilizadas ou fisicamente agregadas (BRÍGIDA, 2010).

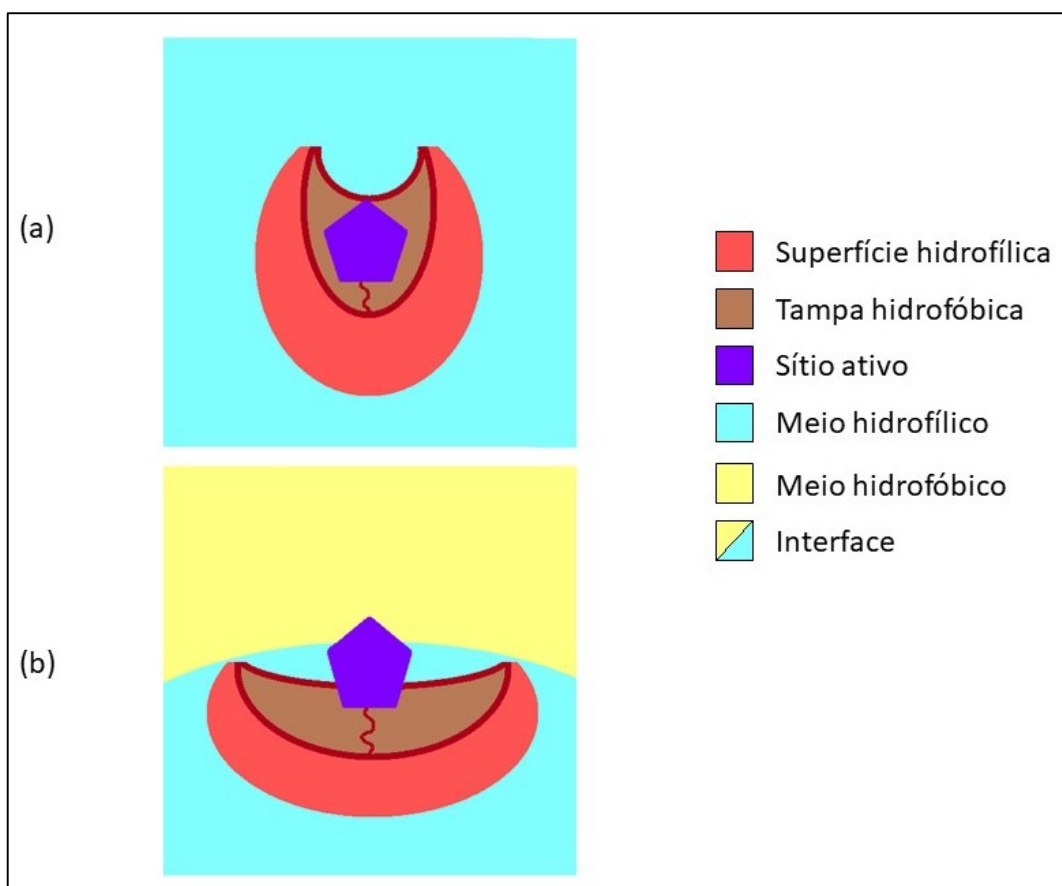
De modo geral, os protocolos de imobilização podem alterar as propriedades da enzima, como sua atividade, estabilidade, seletividade, especificidade, regiosseletividade e enantiosseletividade (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; GARCIA-GALAN et al., 2014; PEREIRA et al., 2015). Essas variações podem ser diferentes para uma mesma enzima, dependendo do suporte utilizado e do protocolo de imobilização (CABRERA et al., 2008; HIRATA et al., 2016a; PALOMO et al., 2002). Tal variedade de comportamentos resultantes das imobilizações pode ser controlada para direcionar a ação da enzima, ou seja, pode ser usada como ferramenta para modular o comportamento desta. Esta modulação das propriedades enzimáticas é chamada de “engenharia conformacional” (PALOMO et al., 2002).

2.1.1 Imobilização de Lipases e Fosfolipases Via Adsorção Interfacial em Suportes Hidrofóbicos

As fosfolipases A₁ (FLA1), como a LU, possuem comportamento semelhante às lipases pois ambas possuem exposição interfacial dos seus sítios ativos

(CABRERA et al., 2008). Essa estrutura consiste numa tampa (ou borda) que cobre o sítio ativo da enzima, praticamente hidrofóbico (Figura 2a). Quando na catálise, esta tampa se abre fazendo com que a enzima se apresente de forma aberta, deixando o sítio ativo acessível ao substrato (Figura 2b) (CASTRO et al., 2004).

Figura 2 – Esquema da exposição interfacial do sítio ativo de lipases e fosfolipases A₁



Fonte: O autor.

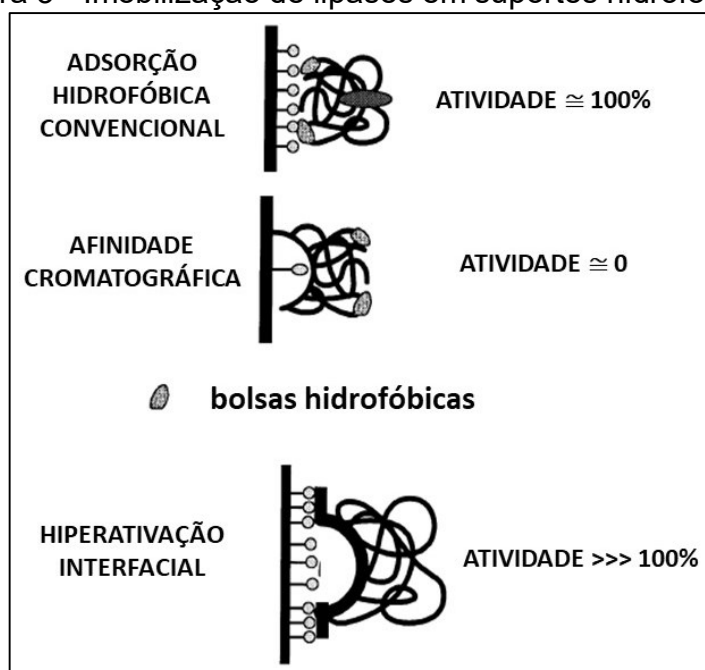
A exposição desta superfície hidrofóbica que circunda o sítio catalítico da enzima pode levar à interação desta com um suporte hidrofóbico, fazendo com que a proteína fique fortemente adsorvida. Nesta situação, a estrutura terciária da enzima é modificada e o seu sítio ativo pode permanecer disponível para promover reações catalíticas (BASTIDA et al., 1998; PALOMO et al., 2002). Ainda que o bolso hidrofóbico do seu sítio ativo seja exposto, as lipases ainda prevalecem com seu caráter hidrofílico, sendo solúveis em água. Por este motivo, é reforçada a ideia do grande caráter hidrofóbico da superfície que envolve o sítio ativo destas enzimas e do seu

papel na adsorção destas proteínas em superfícies hidrofóbicas (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

A adsorção via ativação interfacial das lipases e das FLA1 em suportes hidrofóbicos pode ser utilizada como ferramenta para a purificação, imobilização, estabilização e hiperativação das enzimas (HIRATA et al., 2016a).

A hiperativação da enzima pode ocorrer se houver uma forte interação entre o suporte hidrofóbico e a “tampa hidrofóbica” da proteína. Na Figura 3, é demonstrada esquematicamente a interação entre a enzima e o suporte. Na primeira imagem, é demonstrada uma adsorção convencional da enzima sobre um suporte hidrofóbico através de sua tampa hidrofóbica. Neste caso há uma exposição do seu sítio ativo como em uma interação interfacial e a sua atividade se torna semelhante à atividade da enzima livre. No segundo caso é exemplificado a simples interação entre um suporte e uma enzima que não ocorre devido à presença da superfície hidrofóbica da proteína. Essa interação pode ser chamada de “afinidade cromatográfica”, como analogia às colunas de cromatografia onde há interação entre uma espécie e a coluna sem haver adsorção. Na terceira situação é elucidada a hiperativação da enzima, quando há forte interação da superfície hidrofóbica da enzima com o suporte hidrofóbico. Nessa situação, o sítio ativo fica totalmente na área externa da enzima, levando a um grande aumento da atividade (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

Figura 3 - Imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos.



Fonte: Fernandez-Lafuente et al. (1998)

2.1.2 Derivados celulósicos como suportes para imobilização de enzimas

Muitos estudos têm sido direcionados no sentido de encontrar novos suportes que sejam capazes de fornecer materiais bioativos eficientes. Muitos destes materiais são derivados celulósicos produzidos a partir de polpas celulósicas comerciais e em alguns casos de resíduos agroindustriais, como forma de baratear o processo de imobilização e minimizar danos ambientais. Grande parte destes resíduos consiste de materiais lignocelulósicos – materiais constituídos principalmente por lignina, celulose e hemicelulose. O emprego da celulose e seus derivados, principalmente esterificados, se apresenta como alternativa a outros tipos de suporte de enzimas devido ao balanço do caráter hidrofílico e hidrofóbico e por possuir agrupamentos OH, favorecendo a funcionalização da sua superfície ou até mesmo a imobilização de enzimas via ligação covalente (BRÍGIDA, 2010).

Trabalhos têm sido publicados demonstrando a utilidade de materiais celulósicos e lignocelulósicos na imobilização de enzimas. Huang et al. (2011) demonstraram a imobilização da lipase de *Candida rugosa* por ligação covalente em membranas de nanofibras de celulose e constatou maior estabilidade da enzima após imobilização. Para tanto, foi necessária a modificação do material pela funcionalização da superfície, favorecendo a ligação covalente entre enzima e suporte. Já Brígida (2010) imobilizou lipases em fibras de coco natural por adsorção sem a necessidade de modificação superficial do suporte, e o derivado bioativo obtido se mostrou eficiente na transesterificação do óleo de macaúba. Outras enzimas também já foram estudadas na imobilização em suportes celulósicos, tal como Sathishkumar et al. (2014) que imobilizou lacases (EC 1.10.3.2) também em nanofibras de celulose para tratamento de efluentes. Kim et al. (2015) utilizaram nanofibras de celulose como suporte para imobilizar lipase produzida a partir da *Candida rugosa*. Lipases imobilizadas em nanocristais de celulose mostraram elevada porcentagem de proteína, tendo neste caso uma redução da atividade enzimática ao ser adsorvida. O mesmo foi observado para derivados celulósicos esterificados como o acetato de celulose, acetato propionato de celulose e o ABC que foram empregados como suportes para imobilização de enzimas por adsorção física. A enzima imobilizada exibiu maior atividade que a enzima livre quando esta foi imobilizada em acetato de celulose e

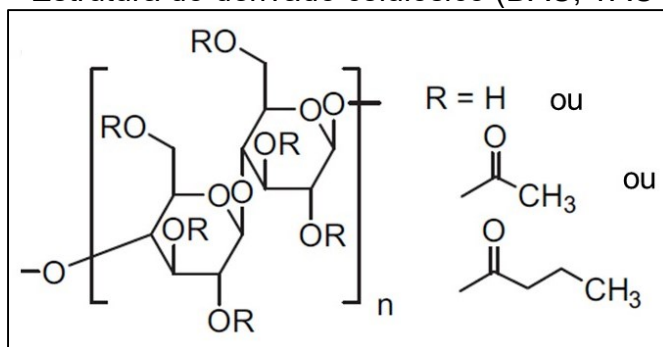
acetato propionato de celulose. O derivado bioativo gerado à partir do acetato de celulose e do ABC pode ser utilizado por três vezes mantendo elevada atividade (KOSAKA et al., 2007).

A funcionalização da celulose de modo a aumentar seu caráter hidrofóbico pode ser útil no sentido de favorecer a interação dos bolsos hidrofóbicos da lipases e FLA1 com a superfície do suporte, bem como evitar a dessorção destas enzimas do suporte em reações enzimáticas (SUN et al., 2015). Esta funcionalização pode ocorrer com a modificação da celulose no sentido de substituir hidroxilas por grupos ésteres, funções estas que possuem uma porção hidrofóbica em suas cadeias.

Em celulosas esterificadas, o caráter hidrofóbico pode aumentar de duas maneiras: pelo grau de substituição (GS) e pelo tamanho da cadeia do éster. Nesse sentido, quanto maior o GS na celulose, que pode variar de 1 a 3 (referente às hidroxilas substituíveis), maior o caráter hidrofóbico. Sugere-se também que uma maior cadeia de éster confere à celulose um maior caráter hidrofóbico se comparado a um éster de cadeia menor, uma vez que este possui uma menor porção hidrofóbica em sua estrutura.

O DAC, TAC e ABC são exemplos comuns de celulosas esterificadas. O DAC trata-se de uma celulose modificada di-substituída, enquanto o acetato de celulose tri-substituído (PULEO; PAUL, 1989 *apud* CARVALHO, 2014). O ABC possui substituições de hidroxilas por grupos acetato e butirato, com variações de GS que podem chegar a 3. Ressalta-se que o grau de substituição trata-se de um valor médio, relacionado a presença de grupos substituintes nos dímeros da celulose. No caso do DAC, por exemplo, o GS pode variar entre 1,8 e 2,5, aproximadamente. Na figura 4, a estrutura da celulose pode ser observada considerando o grau de substituição e o tipo de derivado produzido.

Figura 4 - Estrutura do derivado celulósico (DAC, TAC ou ABC).



Fonte: Suttiwijitpukdee et al. (2011)

Diante do exposto, neste trabalho, a LU será imobilizada em três matrizes celulósicas esterificadas – DAC, TAC e ABC – e também em duas matrizes celulósicas não funcionalizadas – celulose em polpa (CELP) e celulose microcristalina (CELM) – para que o aumento do caráter hidrofóbico através da esterificação fosse também avaliado.

2.2 Enzima estudada: fosfolipase

As fosfolipases constituem um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as ligações fosfodiéster dos fosfoglicerídeos e por este motivo podem ser classificadas como hidrolases (HARVEY; FERRIER, 2012). A degradação dos fosfoglicerídeos por estas enzimas pode liberar grupos como ácidos graxos livres, lisofosfolipídeos, gliceróis-fosfato, diacilgliceróis, fosfatos, ácidos fosfatídicos e aminoálcoois, dependendo da classe da fosfolipase (OLIVEIRA, 2006). Além da hidrólise de fosfolipídeos, as fosfolipases também podem apresentar atividade lipolítica, hidrolisando lipídeos neutros (KÖHLER et al., 2006).

Devido às suas atividades biológicas, as fosfolipases são amplamente estudadas. Köhler et al. (2006) mencionam o envolvimento dessas enzimas em processos como homeostase de membranas celulares, aquisição de nutrientes por organismos e geração de moléculas bioativas, bem como o papel dessas na patogênese microbiana e virulência, e a presença delas em venenos de animais. Kini e Evans (1987 *apud* OLIVEIRA, 2006) citam funções biológicas das fosfolipases tais como miotoxidade, neurotoxidade e miocardiotoxidade.

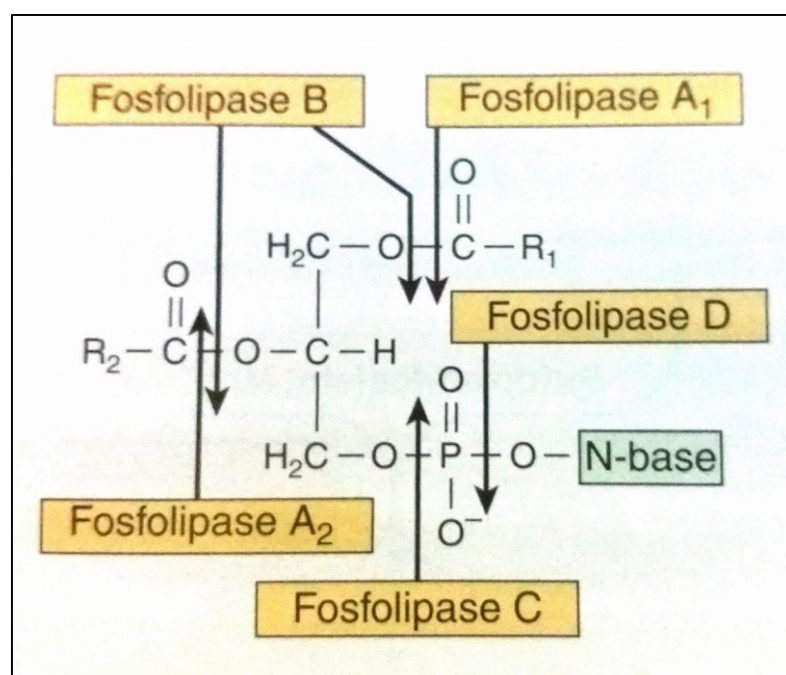
Vários trabalhos citam o uso de fosfolipases em processos de degomagem para eliminação de fosfolipídeos, como descrito por Elena et al. (2017), e de ésteres de ácidos graxos de óleos, como citado por Schmid et al. (2002). Tabtabaei e Diosady (2013) mostraram ser possível o uso de fosfolipases na desestabilização de emulsões oleosas originadas da extração aquosa de óleo a partir de farinha de mostarda amarela descascada para fins alimentícios. Na indústria de biocombustíveis, fosfolipases foram utilizadas para degomagem de óleos visando produção de biodiesel (JANG et al., 2012; LI et al., 2015) e através da atividade lipolítica da enzima,

a LU já foi empregada na produção direta de ésteres alquílicos (biodiesel) (TACIAS-PASCACIO et al., 2017).

2.2.1 Classificação de Fosfolipases

Cada fosfolipase tem a capacidade de clivar uma ligação éster em específico, embora todas elas possuam os fosfolipídeos como substratos (GHANNOUM, 2000). De modo geral, as fosfolipases são classificadas a partir do sítio de ação sobre seu substrato, originando assim, cinco grandes famílias: fosfolipases A₁ (FLA1), fosfolipases A₂ (FLA2), fosfolipases B (FLB), fosfolipases C (FLC) e fosfolipases D (FLD) (Figura 5).

Figura 5 – Locais de atividade hidrolítica das fosfolipases sobre glicerofosfolipídeos.



Fonte: MURRAY et al., 2014

As FLA1 (EC 3.1.1.32) hidrolisam as ligações de éster de ácido graxo na posição sn-1 dos fosfolipídeos, liberando ácidos graxos e moléculas de 2-acil lisofosfolipídeos. Estas enzimas são encontradas em células e tecidos de vários organismos, tais como plaquetas de rato, cérebro e testículo bovino, venenos de abelhas e em fungos (AOKI et al., 2002). As FLA1 possuem uma aplicação particular para produção de 2-acil lisofosfolipídeos que emulsionam ácidos graxos de grande

valor nutricional como o ácido eicosapentaenoico, ácido linoleico conjugado e o ácido docosa-hexaenóico (KIM; GARCIA; HILL, 2007). Os lisofosfolípídeos, resultantes da ação das FLA1, são excelentes emulsificantes, e por esse motivo são amplamente utilizados na indústria alimentícia, farmacológica e de cosméticos (SONG; RHEE, 2001). Essas fosfolipases também são utilizadas em processos de degomagem de óleos (CABRERA et al., 2008).

As FLA1 possuem comportamento semelhante às lipases. Elas reconhecem a estrutura de diferentes substratos e suas propriedades são grandemente alteradas quando imobilizadas em algum suporte. Essa característica se dá pela exposição do seu sítio ativo, que ocorre também quando na interface água-óleo, ativando a enzima (CABRERA et al., 2008).

FLA2 (EC 3.1.1.4) constituem um grande grupo de enzimas que catalisam a hidrólise das ligações éster de fosfolípídeos na posição sn-2, formando ácidos graxos livres e 1-acil lisofosfolípídeos. FLA2 possuem relevante papel na liberação de moléculas bioativas à partir de fosfolípídeos, como o ácido araquidônico e o ácido oleico (SIX; DENNIS, 2000). Essas fosfolipases são também classificadas de forma sistêmica, com base em seus nucleotídeos de origem e em sua sequência de aminoácidos. Essa classificação inclui quatorze grupos, onde alguns são também divididos em subgrupos (BALSINDE; WINSTEAD; DENNIS, 2002).

FLB (EC 3.1.1.5) se caracterizam pela capacidade de clivar ligações éster nas posições sn-1 e sn-2 dos glicerofosfolípídeos. Por este motivo, além da atividade fosfolipolítica possui também atividade de lisofosfolipase (EC 3.1.1.5) por promover a hidrólise de lisofosfolípídeos, retirando os dois grupos de ácido graxo dos seus substratos. Alguns FLB possuem também a característica de transacilases (EC 3.1.1.5), ou seja, convertem ácidos graxos e lisofosfolípídeos em fosfolípídeos. (KÖHLER et al., 2006). Huang et al. (2014) demonstraram o uso de FLB na degomagem de óleos de soja e amendoim e menciona o uso das mesmas pela indústria alimentícia e farmacêutica na produção de derivados fosfolipídicos.

FLC (EC 3.1.4.3) hidrolisam ligações de fosfolípídeos de modo a liberar diacilgliceróis e grupos como fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, dentre outros, dependendo do fosfolípídeo envolvido no processo (GHANNOUM, 2000). FLC tem sido citada de modo especial em processos de degomagem por produzir diacilgliceróis, espécies miscíveis em óleo, além de reduzir a goma fosfolipídica

resultante do processo. Desse modo, a degomagem com FLC resulta em maior rendimento de óleo refinado (ELENA et al., 2017).

FLD (EC 3.1.4.4) catalisam a hidrólise de fosfolipídeos gerando ácido fosfatídico e um aminoálcool. Uma segunda ação catalítica é registrada para FLD, onde o ácido fosfatídico é transferido para um álcool aceptor (transfosfatidilação) e ambas atividades - fosfolipolítica e de transfosfatidilação - podem concorrer em um mesmo sistema. Por meio dessas duas atividades catalíticas, FLD tem sido utilizadas na produção de fosfolipídeos raros (MAO et al., 2017).

2.3 Fosfolipase Comercial Lecitase® Ultra

As lecitases consistem numa classe de preparados comerciais de FLA1 desenvolvidos pela Novozymes. A LU, utilizada neste trabalho, foi obtida à partir da fusão de genes de dois microrganismos. Foram utilizados genes da lipase da *Thermomyces lanuginosus*, dada a estabilidade de sua enzima, e genes da fosfolipase da *Fusarium oxysporum*, devido à sua boa atividade (CABRERA et al., 2008).

A LU apresenta atividade tanto para fosfolipídeos como para triglicerídeos (SLIZYTE; RUSTAD; STORRO, 2005). Além da ação enzimática sobre triglicerídeos, a LU apresenta também características semelhantes às lipases, tal como ocorre com as FLA1 (CABRERA et al., 2008), tais como hiperativação por alguns detergentes, hiperativação quando adsorvida em suporte com baixa força iônica, reconhecimento de diversos ésteres como substratos e forte modulação quando imobilizadas (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007).

Os diferentes processos de imobilização, bem como os diferentes suportes utilizados, afetam grandemente a performance da LU, alterando sua enantiosseletividade, especificidade e regiosseletividade, sinalizando que esta enzima pode estar entre as mais sensíveis a tais estratégias de imobilização (CABRERA et al., 2008; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007, 2008).

Recentemente o uso de LU em produção de biodiesel, bem como na catálise de reações de transesterificação, tem sido reportado. Li et al. (2015) atestaram o uso de LU de modo simultâneo a lipases para produção de biodiesel a partir de óleos de baixa qualidade. Neste caso, a LU agiria no sentido de eliminar fosfolipídeos presentes no óleo. Hirata et al. (2016) provaram a eficiência catalítica da LU imobilizada em octil-

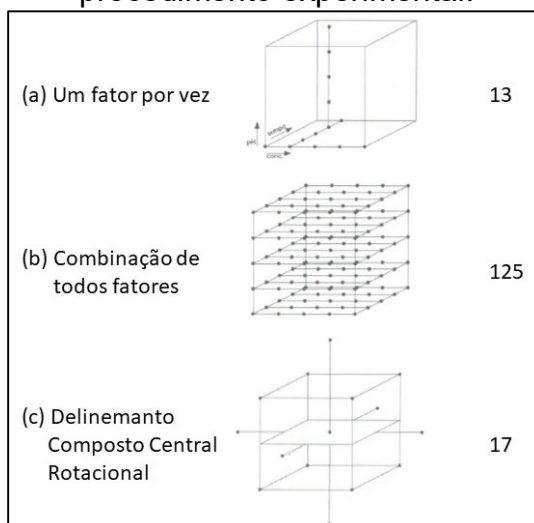
agarose na transesterificação de tributirina com etanol ou metanol e Tacias-Pascacio et al. (2017) conseguiram bons resultados na produção de biodiesel metílico a partir de óleo de cozinha usado, utilizando LU imobilizada em octadecil-metacilato e octadecil-metacrilato e t-butanol como solvente, obtendo uma taxa de conversão de até 61% e 59%, respectivamente, para estes dois suportes.

2.4 Otimização de processos por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Em processos que existem a influência de várias variáveis, o planejamento e otimização dos experimentos permite a avaliação da influência das variáveis experimentais e o efeito de interação entre elas na resposta desejada. Esta é uma ferramenta que permite fazer um estudo sistemático de uma série de sistemas experimentais sendo extremamente rica na investigação de uma série de problemas acadêmicos e na indústria. Considerando a fragilidade dos sistemas enzimáticos a proposta de imobilização seguindo um planejamento experimental afasta a aleatoriedade dos testes e dos resultados e permite encontrar a melhor condição de imobilização.

Supondo um sistema onde três variáveis (fatores) podem influenciar o processo – pH, concentração e tempo – Haaland (1989 *apud* RODRIGUES; IEMMA, 2005) aponta três possibilidades de investigação, esquematizadas na Figura 6.

Figura 6 – Possibilidades de investigação da influência de três parâmetros sobre um procedimento experimental.



Fonte: Rodrigues e Iemma (2005)

No primeiro caso (Figura 6a), duas variáveis são fixadas em um valor (nível) enquanto a terceira é variada em 5 níveis. Ao se encontrar o nível onde um melhor resultado é encontrado (nível ótimo), um segundo fator é então variado para que seu nível ótimo seja encontrado, fixado, e assim partir para a investigação do nível ótimo do terceiro parâmetro. Conforme observado na figura, seriam necessários aqui 13 experimentos para se alcançar um quadro onde os três fatores fossem otimizados. Contudo, este método de análise não aponta a interação que pode haver entre os fatores em outros níveis, o que poderia levar a um outro resultado maximizado.

Assim, se faz necessário a investigação de toda região espacial para uma análise da interação dos fatores com uma variação simultânea dos níveis. No segundo caso (Figura 6b), a combinação de todos os 5 níveis dos três fatores é realizada ($5 \times 5 \times 5$), totalizando assim 125 experimentos. O alto número de experimentos pode tornar a investigação inviável, tanto pelo tempo, quanto pela quantidade de material gasto para que todos os ensaios sejam realizados.

O planejamento fatorial de experimentos (Figura 6c) torna-se então uma alternativa de investigação, onde um menor número de experimentos é realizado, e toda a região espacial é analisada. Na década de 50, foi proposta a técnica de delineamentos compostos, onde o número de experimentos era reduzido e a combinação dos fatores de influência sobre um resultado eram consideradas para avaliar a otimização de processos (BOX; WILSON, 1951 *apud* MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2001). Nos delineamentos compostos, alguns pontos da região espacial eram realizados experimentalmente, e um deles eram repetidos para verificação de reprodutibilidade. Os delineamentos onde o ponto de repetição é o ponto central é então chamado de Planejamento do Composto Central ou ainda Delineamento do Composto Central (DCC).

Os planejamentos fatoriais de segunda ordem são os mais simples. Neles, os componentes fatoriais originais são fixados em dois níveis de avaliação para cada fator (k). Nestes, o menor valor do nível é codificado em -1 e o maior valor em +1. Nos DCC's, o valor central entre estes dois níveis é codificado em 0. Além destes, são adicionados dois pontos axiais ($\pm\alpha$) que, sendo fixados equidistantes do ponto central, caracteriza-se como Delineamento do Composto Central Rotacional (DCCR), representado na Figura 6c (CONAGIN, 1982; MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2001;

RODRIGUES; IEMMA, 2005). O valor de α é relacionado com k através da Equação 1.

$$\alpha = (2^k)^{1/4} \quad (1)$$

Em um DCCR, a quantidade de experimentos é definida como 2^k pontos fatoriais + $2 \times k$ pontos axiais + um número arbitrário de pontos centrais. Tomando o exemplo já citado anteriormente, onde temos três fatores em avaliação (pH, concentração e tempo), tem-se então, $k = 3$. Se fossem tomadas 3 repetições do ponto central, como é necessário para um planejamento fatorial completo, seriam realizados 17 experimentos (Figura 6c) (RODRIGUES; IEMMA, 2005). Esses 17 experimentos consistem em uma matriz, resultante da combinação dos níveis de cada fator de modo que abranja toda a região espacial em análise.

Todavia, para otimização de processos onde o número de fatores é relativamente alto, a realização de um planejamento fatorial completo se torna inviável. Supondo um DCCR onde 10 parâmetros possam afetar o resultado final, o número de pontos fatoriais originais (2^{10}) seriam necessários 1024 ensaios. Nestes casos, são realizados planejamentos fatoriais fracionados, um fator de redução é aplicado, diminuindo o número de ensaios. É elaborada então, uma sequência de planejamentos onde, possivelmente, se chega ao mesmo resultado se todos os experimentos de um fatorial completo fossem realizados.

A partir dos níveis codificados e das respostas dos experimentos sugeridos pela matriz do DCCR é feito uma regressão múltipla, onde considera-se a influência linear e quadrática de cada fator, bem como as interações entre eles. Com o auxílio de *softwares*, como o *Statistica* da StatSoft®, é possível fazer uma análise de variância e identificar a influência de cada fator e a existência da interação entre eles de modo que o resultado seja influenciado (FILHO, 2010). Para a obtenção da superfície de resposta que nos indica as condições otimizadas para os melhores valores de resposta, o modelo obtido pela regressão múltipla é passível de validação (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Estes planejamentos fatoriais podem ser utilizados em áreas como biologia, agronomia, medicina, química, siderurgia, dentre outras (CONAGIN, 1982; MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2001). No desenvolvimento de tecnologia envolvendo enzimas,

os delineamentos são muito utilizados, como em processos fermentativos para obtenção de um produto comercial, na análise da atividade enzimática. Santos (2014) fez uso do DCCR para avaliar a floculação e o rendimento da fermentação alcoólica, analisando a influência do pH, temperatura e agitação do processo. Avaliando a especificidade de substrato de uma seleção de leveduras, Goldbeck (2008) utilizou-se desta mesma ferramenta. O DCCR também pode ser utilizado na otimização de processos de imobilização de enzimas, como no caso deste estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho consiste na imobilização da enzima Lecitase[®] Ultra, uma fosfolipase comercial, em uma matriz celulósica esterificada, gerando um derivado bioativo (enzima+suporte) otimizado que apresente elevada carga enzimática em sua superfície e uma boa atividade catalítica.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Selecionar a matriz celulósica com melhor retenção de atividade enzimática;
- II. Estudar a viabilidade de uso do tampão de Britton-Robinson no processo de adsorção da fosfolipase LU sobre uma matriz celulósica esterificada;
- III. Otimizar o processo de imobilização enzimática da fosfolipase LU sobre uma matriz celulósica esterificada, no sentido de produzir um derivado bioativo com alta carga de proteína enzimática, através de um Delineamento do Composto Central Rotacional;
- IV. Testar a atividade enzimática do derivado bioativo otimizado na reação de degomagem de amostras de óleo de soja bruto.

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Materiais

- *Lecitase[®] Ultra*: produzida pela *Novozymes* e disponibilizada pela LNF Latino Americana. Possui apresentação líquida, cor amarela a levemente marrom, com proteína enzimática na concentração de 8% (m/m) em água e sorbitol, e atividade lipolítica declarada de 10 KLU/g;
- *Matrizes celulósicas*: Celulose em polpa Kraft cedida pela empresa Suzano (São Paulo-SP); Celulose Microcristalina PA (Synth); O DAC consiste num produto comercial produzido pela Rhodia/Solvay; O TAC foi produzido a partir da celulose em polpa Kraft no Laboratório de Reciclagem de Polímeros do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia; Acetato Butirato de Celulose PA (Sigma-Aldrich);
- *Reagentes para determinação de atividade lipolítica*: Álcool Isopropílico P.A. (Isofar); Fosfato de Sódio Bibásico Anidro P.A. (Neon); Fosfato de Sódio Monobásico Anidro P.A. (Neon); Goma Arábica (Nexira Brasil); Tetraborato de Sódio P.A. (Dinâmica); Triton X-100 (Sigma-Aldrich); 4-nitrofenil palmitato (Sigma-Aldrich);
- *Reagentes para eletroforese*: Ácido Acético Glacial P.A. (Proquímios); Ácido Clorídrico P.A. (Proquímios); Acrilamida Para Eletroforese (Vetec); Álcool Metílico P.A. (Isofar); Azul de Bromofenol (Proquímios); Azul de Comassie Brilhante Para Eletroforese (Vetec); Bisacrilamida (Ludwig); Dodecil Sulfato de Sódio 95% Puro (Neon); Glicerina P.A. Bidestilada (Proquímios); Tris Hidroximetilaminometano P.A. (Vetec); Persulfato de Amônio P.A. (Alphatec); Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich); 2-Mercaptoetanol PS (Vetec);
- *Reagentes para imobilização*: Ácido Acético Glacial P.A. (Proquímios); Ácido Bórico P.A. (Dinâmica); Ácido Fosfórico P.A. (Proquímios); Fosfato de Sódio Bibásico Anidro P.A. (Neon); Fosfato de Sódio Monobásico Anidro P.A. (Neon); Hidróxido de Sódio P.A. (Isofar);

- *Reagentes para determinação do índice de acidez:* Álcool Etílico 96% P.A. (Proquímios); Éter Etílico P.A. (Isofar); Fenolftaleína Pura (Proquímios); Hidróxido de Sódio P.A. (Isofar).

4.2 Caracterização da matriz celulósica por espectrometria na região do infravermelho por transformada de Fourier - IVTF

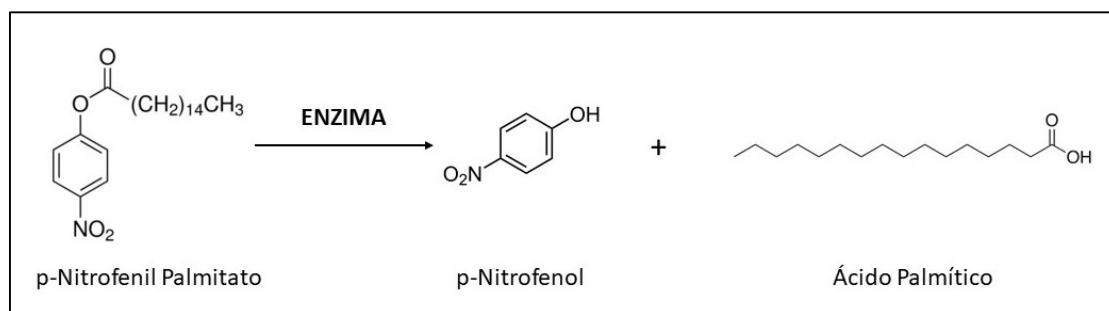
Os espectros na região do infravermelho para avaliação dos grupos funcionais dos suportes foram obtidos em um equipamento Jasco FT/RI 4200. Foram preparadas pastilhas das amostras com Brometo de Potássio (KBr) em uma proporção de 1:100 (m/m) e os ensaios foram realizados com resolução de 2 cm^{-1} em uma faixa espectral de 4000 a 250 cm^{-1} .

4.3 Metodologias para identificação de retenção de atividade enzimática e de proteínas

4.3.1 Determinação de Atividade Lipolítica

A metodologia para determinação da atividade lipolítica baseia-se na hidrólise do p-nitrofenil palmitato (pNFP) em p-nitrofenol (pNF) e ácido palmítico (Figura 7). A quantificação da atividade se dá pela identificação do pNF por espectrofotometria. O método utilizado foi uma adaptação da proposta de Pencreac'h e Baratti (1996) para mensurar a atividade de uma lipase.

Figura 7 – Esquema da hidrólise do p-nitrofenil palmitato via hidrólise por enzima com atividade lipolítica.



Fonte: O autor

Duas soluções foram previamente preparadas:

- Solução A: 0,1 g de goma arábica em pó e 0,05 mL de Triton X-100 são adicionados em 18 mL de solução tampão de fosfato de sódio 25 mM a pH 7,0 e submetidos a agitação em temperatura ambiente por 24 minutos.
- Solução B: 0,006 g de pNFP foi adicionado em 2 mL de isopropanol e submetido a agitação por 7 minutos em temperatura ambiente.

Após agitações, a solução B foi adicionada à solução A e submetidas a agitação por 7 minutos, formando o meio reacional.

Para a reação, 0,1 mL da solução enzimática foram adicionadas a 0,9 mL do meio reacional. Estas misturas foram incubadas em banho maria por 10 minutos à 50°C. Após este tempo, as amostras foram retiradas e submetidas a uma segunda incubação em banho maria à 92°C por 2 minutos e depois colocadas em banho de gelo com adição de 1,0 mL de solução saturada de tetraborato de sódio, com leitura imediata em espectrofotômetro. A absorbância foi medida em 410 nm.

O branco da reação foi feito com água em substituição a solução com enzima adicionada ao meio reacional. Dependendo da necessidade (casos com absorbância maior que 1,000), as soluções enzimáticas foram diluídas em solução tampão de fosfato de sódio 25 mM à pH 7 para que as leituras no espectrofotômetro fossem realizadas.

A unidade de atividade da enzima (U/mL) é equivalente à liberação de 1 μ mol de pNF por minuto por 1 mL de enzima.

4.3.2 Identificação de proteína via eletroforese em gel

A separação e identificação de proteínas é possível através da eletroforese em gel de poliacrilamida – *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) – onde o Dodecil Sulfato de Sódio – *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) – é adicionado às amostras como agente desnaturante das moléculas. Assim, esta técnica é comumente conhecida como SDS-PAGE.

A SDS-PAGE foi realizada de acordo com a metodologia descrita anteriormente por Laemmli (1970), adaptada por Hirata et al. (2016) com outras modificações. A partir de uma solução de poliacrilamida (29:1) o gel desnaturante foi feito com empilhamento a 5% e separação a 15% através do sistema vertical de eletroforese

(Loccus Biotecnologia) associado a uma fonte de eletroforese (LPS-300 – Loccus - Biotecnologia) onde uma tensão de 80 V e 50 mA foram aplicados por aproximadamente 2 horas. Para uma análise semi-quantitativa das proteínas foi preparado um tampão de ruptura que consiste numa solução aquosa com SDS a 2%, β -mercaptoetanol a 10% e glicerol a 10%, que tem por intuito dessolver a proteína adsorvida ao suporte, bem como desnaturá-la. Para análise dos derivados bioativos, 100 mg de cada amostra foi suspensa em 1 mL de tampão de ruptura e submetida a banho maria em água fervente por 8 minutos. Para análise da LU, 10 μ L da solução enzimática comercial foi suspensa em 1 mL de tampão de ruptura e submetida a banho maria em água fervente também por 8 minutos. Uma alíquota de cada uma dessas suspensões foi utilizada para o experimento. Após cada corrida, os géis foram corados com corante azul de coomassie.

4.4 Otimização de Imobilização em Suporte Celulósico Esterificado

4.4.1 Imobilização da Fosfolipase Lecitase[®] Ultra

A imobilização da fosfolipase LU foi realizada conforme descrito por Pereira et al. (2015) para a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos, com adaptações. Foi adicionado 0,5 g do suporte celulósico a 10 mL de uma solução de LU tamponada. O suporte com a solução tampão e enzima foram submetidos a uma agitação de 200 rpm em agitador shaker por 1 hora, sob temperatura controlada. Ao ser retirado da agitação, a mistura foi filtrada à vácuo e o derivado bioativo gerado foi lavado com 10 mL de solução tampão de fosfato de sódio 100 mM a pH 7,0 e armazenado a 4 °C.

As atividades lipolíticas do sobrenadante após o processo de imobilização e da solução tamponada com LU foram analisadas conforme metodologia descrita no item 4.3.1. O rendimento da imobilização, dada em porcentagem, é calculada conforme Equação 2:

$$\text{Rendimento da Imobilização} = \frac{a_f - a_s}{a_f} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

a_f = atividade fornecida (atividade da solução tampão com a LU);

a_s = atividade do sobrenadante após processo de imobilização.

Através do rendimento da imobilização, relacionando-o com a concentração de LU na solução tampão ([Tampão]), é possível deduzir a concentração de proteína enzimática sobre a superfície do derivado bioativo que foi gerado ([Bioativo]) pela Equação 3:

$$[\text{Bioativo}] = \frac{[\text{Tampão}] \times \text{Rendimento da Imobilização}}{100} \quad (3)$$

4.4.2 Estudo da imobilização da fosfolipase em celulose e derivados celulósicos esterificados

Visando identificar a capacidade de retenção de atividade enzimática de diferentes matrizes celulósicas, a imobilização foi realizada conforme descrito no item 4.4.1, a uma temperatura de 4 °C, com uma relação de 201,60 mg de proteína/g de suporte. A solução com LU tamponada foi preparada com solução tampão de fosfato de sódio 25 mM a pH 7,00. As matrizes celulósicas utilizadas como suporte para a enzima nesse estudo foram: celulose em polpa (CELP), celulose microcristalina (CELM), DAC, TAC e ABC.

As matrizes celulósicas foram analisadas em IVTF antes do processo de imobilização, conforme descrito no item 4.2. Os rendimentos de imobilização de cada processo foram analisados conforme descrito no item 4.3.1 e item 4.4.1. Os derivados bioativos gerados foram analisados em eletroforese conforme descrito no item 4.3.2.

4.4.3 Teste de imobilização com diferentes soluções tampão

Para viabilizar uma investigação de maior intervalo de pH no processo de imobilização, o tampão universal de Britton-Robinson (BR) foi testado como solução para diluição da LU. Esse tampão abrange um intervalo de pH entre 1,90 e 12,01 e

consiste numa solução aquosa contendo ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico. A variação de pH se dá pela titulação do tampão com solução de hidróxido de sódio (FERNÁNDEZ; MARTIN, 1977). Para o teste foi preparado um tampão de concentração 0,040 M. Além do tampão BR, dois tampões de fosfato de sódio com diferentes concentrações – 0,010 M e 0,025 M – foram testados à nível de comparação com o tampão universal. As três soluções utilizadas foram ajustadas em pH 7,00 com uma relação de 201,60 mg de proteína/g de suporte e o processo desenvolveu-se a 4°C. O suporte utilizado foi o que obteve melhor desempenho nos processos de imobilização descritos no item 4.4.2. Os testes foram realizados conforme metodologia descrita no item 4.4.1.

4.4.4 Otimização de parâmetros para imobilização da fosfolipase Lecitase® Ultra em uma matriz celulósica esterificada por DCCR

A partir do estudo descrito no item 4.4.2, foi escolhido o suporte celulósico com maior retenção de atividade enzimática para que um estudo com a otimização da metodologia de imobilização fosse realizado. A otimização dos parâmetros de imobilização enzimática foi realizada através dos cálculos do rendimento da imobilização (item 4.4.1), com o intuito de produzir um derivado bioativo com alto teor de enzima imobilizada e observar o comportamento do suporte na retenção de atividade enzimática com a variação dos parâmetros sugeridos. A solução tampão utilizada para diluição da LU foi a indicada pelo estudo descrito no item 4.4.3. Três parâmetros foram investigados para identificar a influência de cada um deles sobre o processo de imobilização: a relação de quantidade de enzima por grama de suporte presente no processo, a temperatura em que o processo ocorre e o pH do mesmo, relacionados com a matriz do DCCR como X_1 , X_2 e X_3 , respectivamente.

Com intuito de identificar as possíveis interações entre as variáveis analisadas foi realizado DCCR com dois níveis originais, tendo-se 8 experimentos fatoriais, 6 experimentos axiais e 3 réplicas no ponto central totalizando 17 experimentos. A relação de “enzima / suporte” variou de 32,05 à 370,94 mg de proteína/g de suporte, a temperatura variou de 4,8°C à 45,2°C e o pH variou de 1,95 à 12,04. Foi utilizado o alfa de rotacionalidade igual a 1,68, calculado conforme Equação 1, e as equações de codificação para a relação de proteína por massa de suporte da solução tampão para

imobilização ([Tampão]), temperatura (T) e pH (pH) são mostradas, respectivamente, nas Equações 4, 5 e 6.

$$X_1 = \frac{([Tampão]-201,6)}{100,8} \quad (4)$$

$$X_2 = \frac{(T-25)}{12} \quad (5)$$

$$X_3 = \frac{(pH-7)}{3} \quad (6)$$

A Tabela 1 mostra a matriz do Delineamento Composto Central Rotacional com os valores codificados e originais das variáveis de estudo. Para evitar tendenciosidade os ensaios foram realizados de forma aleatória.

Tabela 1 - Valores utilizados no DCCR para determinação da retenção máxima de LU em TAC.

Níveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Relação de proteína por massa de suporte (mg de proteína/g de suporte)	32,05	100,80	201,60	302,40	370,94
Temperatura (°C)	4,8	13,0	25,0	37,0	45,18
pH	1,95	4,00	7,00	10,00	12,04

Fonte: O autor.

Estes parâmetros, bem como os intervalos de valores estipulados, foram considerados baseados em testes de imobilização de lipases e fosfolipases da literatura. Para a imobilização da LU em agarose, Cabrera et al. (2008) realizou testes utilizando 20 mg de proteína/g de suporte, enquanto Alves et al. (2015) utilizou a relação 120 mg de proteína/g de suporte ao imobilizar a mesma enzima em esferas de estireno-divinilbenzeno. Tendo fixado a concentração da enzima em suas metodologias de imobilização, Cabrera et al. (2008) realizaram seus testes variando

a temperatura em 4°C ou 25°C. Na imobilização da LU em resinas, Liu et al. (2012) utilizaram um intervalo de pH de 6,0 à 8,0 em solução tampão de fosfato de sódio. Considerando estes estudos, os testes do planejamento foram realizados em meios diluídos à concentrados - possivelmente saturados - em relação à enzima, em intervalo de pH que contemple meios ácidos à básicos e temperaturas que já foram utilizadas em protocolos de imobilização ou superiores a estas. As maiores temperaturas contempladas neste estudo não se encontram em faixas de desnaturação da enzima, uma vez que estudos demonstram a ótima atividade desta em temperaturas ainda superiores, tal como demonstrou Jiang et al. (2015) ao utilizar a LU a 55 °C para a degomagem de óleos brutos.

4.5 Ação do derivado bioativo de celulose esterificada sobre óleo de soja bruto

4.5.1 Determinação do Índice de Acidez

A análise de acidez do óleo foi realizada conforme descrito por Lutz (2008). Pesou-se 2 g de cada amostra em frasco erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se 25 de solução éter etílico – etanol (2:1). Adicionou-se duas gotas do indicador fenolftaleína e titulou-se a solução com hidróxido de sódio 0,01 M até o aparecimento da coloração rósea. O índice de acidez, dado em mg de KOH/g, é calculado pela Equação 7:

$$\text{Índice de Acidez} = \frac{V.f.66,1}{P} \quad (7)$$

Onde: V = quantidade em mL de solução de hidróxido de sódio 0,01 M gasto na titulação;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio;

P = massa da amostra em gramas.

4.5.2 Procedimento para degomagem de óleo de soja bruto

O processo de degomagem de óleo consiste na eliminação da fosfolipídeos através da hidrólise destas moléculas, ocasionando o aumento da densidade destas e a consequente precipitação em forma de goma (VIEIRA et al., 2009). Visando

identificar a atividade enzimática da enzima imobilizada em derivado celulósico esterificado, foi realizado um teste de degomagem em amostras de óleo de soja bruto e analisado o índice de acidez destas amostras, conforme descrito no item 4.5.1.

As amostras de óleo de soja bruto foram submetidas à ação do derivado bioativo conforme metodologia descrita por Jiang et al. (2015), com adaptações, quando estes realizaram degomagem de óleo via enzimática em diferentes óleos brutos.

Uma amostra de 150 g de óleo de soja bruto foi aquecida a 55°C em banho-maria sob agitação mecânica a 500 rpm. Adicionou-se à amostra uma alíquota de LU livre (Testes LU) ou uma quantidade de derivado bioativo (Testes DB), conforme testes indicados na Tabela 2. Um ensaio de degomagem apenas com água, sem enzima, também foi realizado e denominado como Teste TA. Estes testes foram realizados de modo que uma mesma quantidade de LU livre e imobilizada fossem testadas e comparadas. Na Tabela 2 é sinalizada a quantidade de proteína enzimática que foi utilizada em cada teste, e o quanto isso corresponde em LU livre e em derivado bioativo. Os cálculos de quantidade de derivado bioativo basearam-se na concentração teórica de proteína sobre o TAC, imobilizadas nas condições onde uma concentração máxima de proteína por massa de suporte é alcançada.

Tabela 2 – Proporções de Lecitase® Ultra livre e imobilizada em testes de simulação de degomagem

Proteína Enzimática (mg)	Lecitase® Ultra Livre (mL)	Derivado Bioativo (g)
61,85	0,61 (Teste LU1)	0,25 (Teste DB1)
123,70	1,22 (Teste LU2)	0,50 (Teste DB2)
247,41	2,45 (Teste LU3)	1,00 (Teste DB3)

Fonte: O autor.

Juntamente à enzima, livre ou imobilizada, foi adicionado ao óleo aquecido 3% em massa de água destilada (4,5 mL) e realizou-se uma agitação 2 000 rpm durante 2 minutos para promover a mistura da enzima, água e óleo. A agitação foi então amenizada para 500 rpm e mantida nessas condições por 3 horas ainda sob temperatura de 55°C. Após este período, a mistura foi submetida a banho-maria de

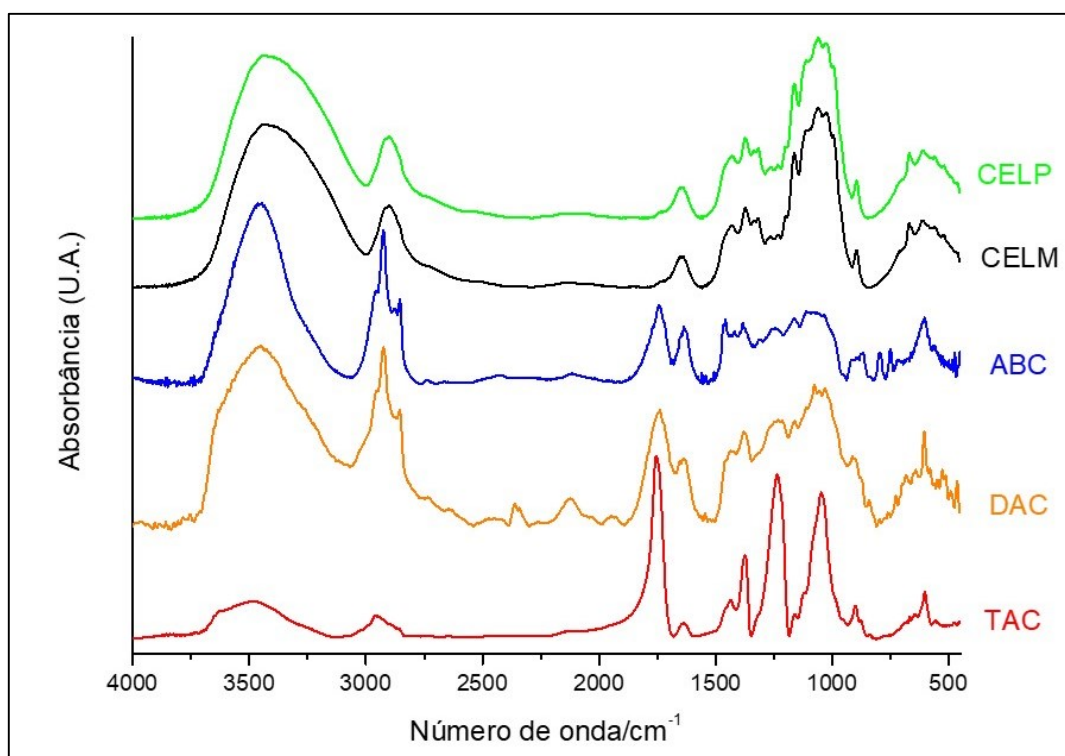
95°C e agitada a 500 rpm por 10 minutos para inativação da enzima. A mistura foi submetida a centrifugação a 10 000 rpm durante 10 min para separação da goma resultante do processo. O sobrenadante foi coletado e submetido a secagem por rota evaporação a 80°C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção da matriz celulósica com maior retenção de atividade enzimática

Os polímeros utilizados neste trabalho – CELM, CELP, DAC, TAC e ABC – apresentam diferenças quanto ao grau de substituição da celulose, uma vez que as amostras DAC, TAC e ABC são celuloses esterificadas enquanto a CELM e CELP possuem a estrutura química original da celulose, com variações da massa molar entre elas. O DAC e o TAC possuem o mesmo tipo de substituição (grupo acetila) sendo diferentes apenas pelo grau de substituição, o DAC é um derivado di-substituído enquanto o TAC é tri-substituído. Esta diferença muda significativamente as propriedades químicas dos derivados sendo o TAC mais hidrofóbico que o DAC. Por último foi testado o ABC, pois este derivado apresenta substituição química por dois tipos de grupos (acetila e butirila), com um elevado grau de substituição. Os principais grupos funcionais presentes nos polímeros avaliados podem ser identificados nos espectros na região do infravermelho apresentados na Figura 8.

Figura 8 - Espectro na região do infravermelho para as matrizes celulósicas.

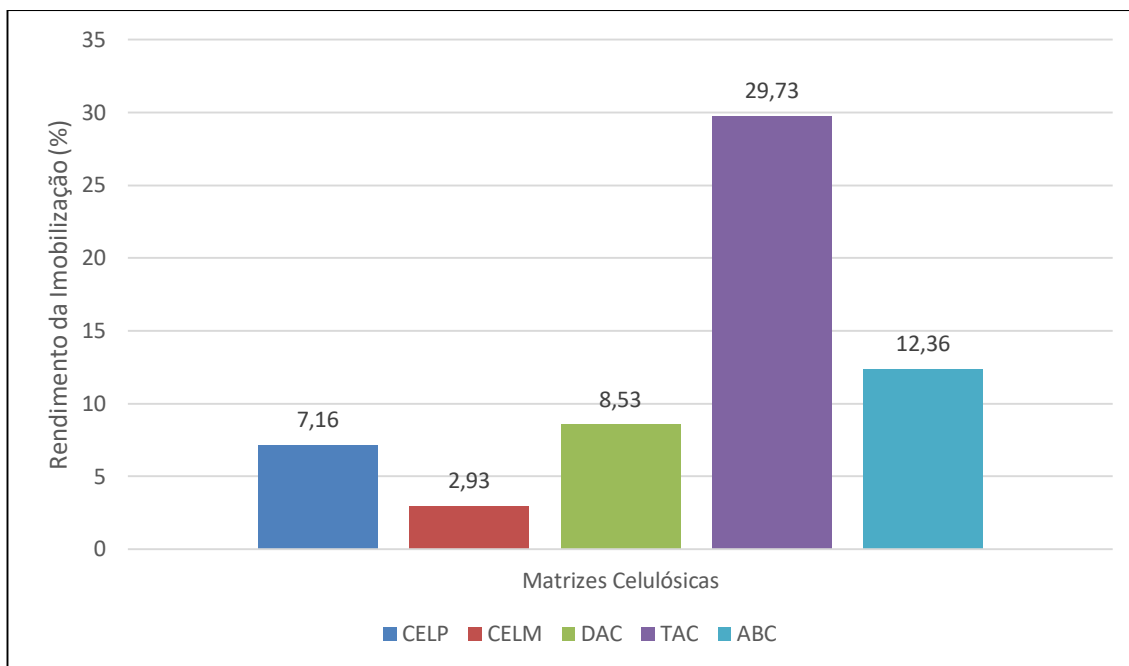


Fonte: O autor.

Os principais grupos funcionais da celulose podem ser observados nos espectros para a celulose microcristalina e da celulose da polpa Kraft. Na região entre 3700 a 3000 cm^{-1} , observa-se a presença de uma banda larga e intensa atribuída ao estiramento da ligação O-H. Em aproximadamente 2930 cm^{-1} observa-se uma banda de baixa intensidade atribuída ao estiramento da ligação C-H. E em cerca de 1645 cm^{-1} , uma banda atribuída a deformação angular das moléculas de água adsorvida na estrutura do polímero. Na região de identidade do espectro principal atenção deve ser dada as bandas em 1165 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação C1-O-C5 do anel glicosídico e 895 cm^{-1} atribuída a ligação C1-O-C4 da ligação glicosídica β (1,4). Para os derivados de celulose esterificados, observa-se o aparecimento de uma banda de média a grande intensidade em 1750 cm^{-1} , atribuído ao estiramento da ligação C=O do grupo éster e em 1250 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação C-O do grupo éster. Estas duas bandas são observadas nos espectros das amostras acetiladas, com maior ou menor intensidade. É possível observar que a menor contribuição para a presença da banda associada a água adsorvida, em 1645 cm^{-1} pode ser observado para o derivado celulósico triacetilado, fato coerente uma vez que se espera que o TAC seja mais hidrofóbico. A razão entre a absorbância da banda de carbonila e a banda de hidroxila oferece uma noção do grau de substituição e da hidrofobicidade da matriz polimérica (SILVA et al., 2017). Para as demais amostras acetiladas existe maior quantidade de água adsorvida o que dificulta avaliação do polímero quanto ao grau de substituição por essa técnica. Apesar destas dificuldades é possível inferir que o TAC é o derivado mais hidrofóbico dentre os analisados, ficando na mesma proporção os DAC e o ABC.

O rendimento de imobilização foi avaliado através da medida da atividade enzimática da enzima imobilizada e o cálculo do rendimento, apresentado graficamente na Figura 9.

Figura 9 – Rendimento da Imobilização de Diferentes Matrizes Celulósicas



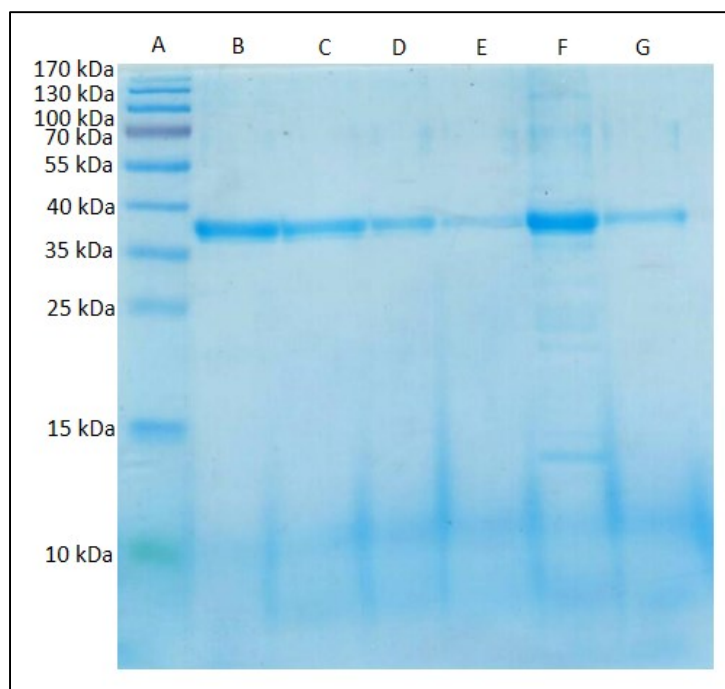
Fonte: o autor.

Conforme esperado para uma fosfolipase A₁, que possuem maior afinidade por superfícies hidrofóbicas, o TAC e o ABC apresentaram os maiores rendimentos de imobilização: 29,73% e 12,36%, respectivamente. Fica evidente aqui a relevância do GS de uma matriz celulósica no processo de imobilização da fosfolipase LU, uma vez que a substituição da hidroxila está ligada ao maior grau hidrofóbico do material.

Comparando o rendimento da imobilização entre DAC e ABC, nota-se que a presença de uma maior cadeia de éster elevou a retenção enzimática, uma vez que esta cadeia aumenta o caráter hidrofóbico do suporte. Todavia, a presença do grupo butirato não fez com o rendimento da imobilização para o ABC supera-se o rendimento encontrado para o TAC. Podemos associar isso a algumas possíveis situações. A primeira delas ao menor grau de substituição do ABC em relação ao TAC. Em segundo lugar, é possível que o grupo butirato no ABC esteja pouco presente no material se comparado a presença de grupos acetatos no mesmo, o que não forneceria ao material um grau hidrofóbico semelhante ao TAC. Uma terceira possibilidade está relacionada ao impedimento estereoquímico que um grande grupo de éster na superfície do material pode provocar no processo de adsorção da proteína enzimática.

Para identificar a proteína adsorvida nos suportes, foi realizada a eletroforese das amostras testadas, tal como descrito no item 4.3.2. A imagem do gel obtido com a análise pode ser observada na Figura 10.

Figura 10 – Gel obtido após análise de derivados bioativos de matrizes celulósicas analisados em eletroforese.



- A: Marcador molecular;
 B: Lecitase® Ultra;
 C: Enzima imobilizada em polpa de celulose;
 D: Enzima imobilizada em celulose microcristalina;
 E: Enzima imobilizada em DAC;
 F: Enzima imobilizada em TAC;
 G: Enzima imobilizada em ABC.

Fonte: o autor.

Conforme marcador molecular utilizado (bandas A), o peso molecular da LU foi sinalizado como um valor entre 35 kDa e 40 kDa, próximo ao valor indicado por Mishra et al. (2009) quando este determinou o peso molecular da LU como 35 kDa. A LU livre foi utilizada no teste para melhor referenciar a enzima imobilizada, como pode ser visto nas outras bandas.

É importante ressaltar que esta técnica foi utilizada em caráter semi-quantitativo para identificação da proteína enzimática imobilizada. Como descrito no item 4.3.2, as amostras são inseridas em uma solução de ruptura e aquecidas para que as moléculas de proteína sejam desorvidas dos suportes e desnaturadas. Ainda que

todas as amostras sejam submetidas ao mesmo processo de dessorção e desnaturação, pode ocorrer que algum suporte dessorva proteínas em menor grau quando comparado a outro. Este diferente grau de dessorção de proteína das amostras está associado à interação entre as enzimas e o suporte. Como exemplo, pode-se comparar o sinal analítico da CELP e do ABC. Neste caso, o sinal analítico é menor, ainda que a retenção enzimática tenha sido maior. Isso ocorre pois, como o ABC possui um grau hidrofóbico maior comparado à CELP, há menor dessorção de enzimas no processo de desnaturação. Por este motivo, observando a imagem do gel obtido e a proteína retida nos quatro suportes com menor rendimento de imobilização, percebe-se uma maior dessorção de proteína desnaturada pelos suportes não esterificados (polpa de celulose e celulose microcristalina). Ainda que o DAC e o ABC tenham demonstrado um sinal analítico menor se comparado a polpa de celulose e celulose microcristalina, é possível perceber que o ABC possui um sinal analítico maior que o DAC, o que está em conformidade ao que foi demonstrado na análise de rendimento da imobilização na Figura 9, utilizando método espectrofotométrico.

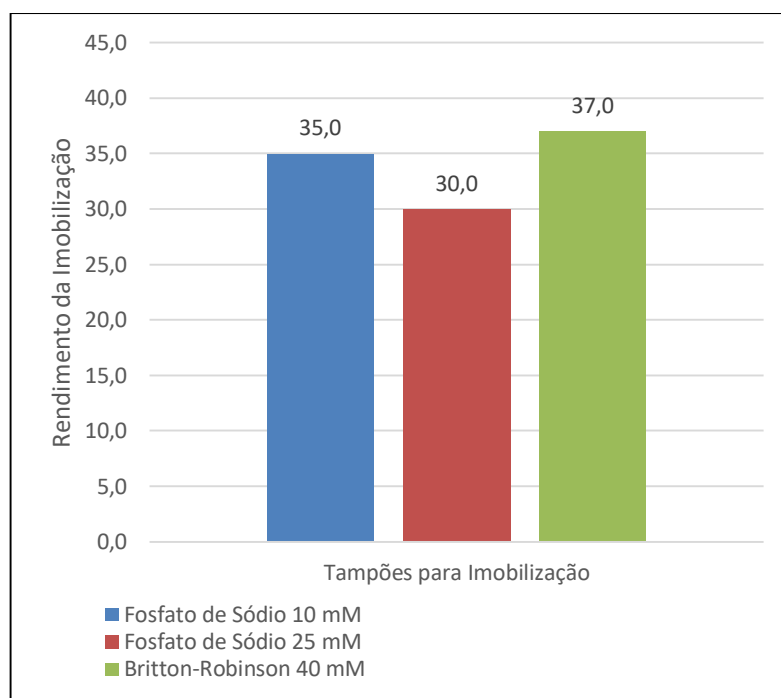
De qualquer maneira, a eletroforese em gel reforça a maior retenção de proteína enzimática pelo TAC, que foi em média três vezes maior em relação aos demais suportes, observado na Figura 9. Portanto, essa matriz celulósica foi selecionada dentre as outras quatro para que seu processo de imobilização fosse otimizado.

5.2 Viabilidade de uso do tampão de Britton-Robinson em processos de imobilização enzimática

Uma vez que os testes com as diferentes matrizes celulósicas sinalizaram a maior retenção de fosfolipase pelo TAC, prosseguiu-se com a otimização do processo de imobilização para este suporte. Para que uma maior faixa de pH fosse investigada na otimização deste processo, um teste com o tampão BR foi realizado para que a viabilidade do uso deste na imobilização enzimática.

Assim, o teste foi realizado com os tampões fosfato de sódio nas concentrações de 10 mM e 25 mM e com o tampão de Britton-Robinson. O rendimento da imobilização seguindo as metodologias descritas no item 4.3.1 e item 4.4.1, são expostos na Figura 11.

Figura 11 - Teste de Imobilização com diferentes tampões.



Fonte: o autor.

O tampão fosfato de sódio 10 mM apresentou maior retenção de atividade enzimática quando comparado ao tampão fosfato de sódio 25 mM. Este comportamento é esperado na imobilização de lipases e, consequentemente, na imobilização de fosfolipases A₁, pois ao contrário de demais proteínas, estas enzimas são melhores adsorvidas em suportes hidrofóbicos quando inseridas em meio com menor força iônica. Isso ocorre devido a um possível equilíbrio existente na solução entre a estrutura aberta e a estrutura fechada da enzima. Baixas forças iônicas deslocariam este equilíbrio para a forma aberta da enzima, evidenciando a sua bolsa hidrofóbica e, consequentemente, aumentando a taxa de adsorção da proteína enzimática (BASTIDA et al., 1998).

O tampão BR demonstrou um rendimento de imobilização ligeiramente maior ao tampão fosfato de sódio 25 mM e semelhante ao tampão fosfato de sódio 10 mM. Isso sinaliza a viabilidade de uso do tampão BR, uma vez que ele possui comportamento semelhante ao tampão fosfato de sódio quando utilizado nesta concentração.

5.3 Otimização do processo de imobilização da Lecitase® Ultra

Considerando os valores do DCCR indicados na Tabela 1, obteve-se uma matriz com os seguintes valores de rendimento de imobilização e concentração de proteína no derivado bioativo, expressos na Tabela 3 (página 55). Observa-se que a unidade de concentração de enzima no derivado bioativo é “mg de proteína/g de suporte”, de modo semelhante à concentração de LU na solução tampão de imobilização, onde relaciona-se a quantidade de enzima (proteína) por massa de suporte. Porém, para o derivado bioativo essa relação diz-se sobre a quantidade de enzima adsorvida sobre a superfície do suporte por unidade de massa deste.

O rendimento da imobilização variou entre 23,11% e 67,25% nos ensaios 14 e 3, respectivamente, enquanto a concentração de enzima no derivado bioativo gerado variou de 16,71 a 172,15 mg de proteína/g de suporte nos testes 9 e 7, respectivamente. A amplitude entre os resultados menores e maiores tanto para o rendimento da imobilização quanto para a concentração de proteína no derivado bioativo sinalizam que a retenção da enzima pelo TAC é sensível à temperatura, ao pH do meio e à relação de proteína por massa de suporte. Todavia, cada parâmetro possui uma relevância diferente dependendo do que está sendo avaliado: rendimento da imobilização ou concentração de proteína no derivado bioativo. Os resultados obtidos nos pontos centrais para o rendimento foram 38,07%, 38,04% e 31,49% e para a concentração do derivado bioativo foram 76,75, 76,68 e 63,48 mg de proteína/g de suporte para os ensaios 15, 16 e 17, respectivamente, indicam uma boa reprodutibilidade da matriz do DCCR.

É possível fazer uma análise prévia da interferência de cada parâmetro, individualmente, sobre o rendimento da imobilização e na concentração do derivado bioativo. Para avaliar o comportamento dessas respostas diante da concentração de LU na solução tampão de imobilização, por exemplo, observa-se os testes onde pH e temperatura mantiveram-se os mesmos. Nestes casos, avaliando individualmente a concentração de LU no tampão, os maiores valores de rendimento de imobilização foram obtidos para os menos valores desta concentração, como nos duetos 1 e 5; 2 e

Tabela 3 - Matriz do DCCR e resposta para a fosfolipase LU.

Ensaio	Concentração de LU no tampão [Tampão] (mg de proteína/g de suporte)	Temperatura (°C)	pH	Rendimento da Imobilização (%)	Concentração de LU no TAC [Bioativo] (mg de proteína/g de suporte)
1	100,80 (-1)	13 (-1)	4,00 (-1)	45,90	46,26
2	100,80 (-1)	13 (+1)	10,00 (+1)	32,46	32,72
3	100,80 (-1)	37 (+1)	4,00 (-1)	67,25	67,79
4	100,80 (-1)	37 (+1)	10,00 (+1)	37,52	37,82
5	302,40 (+1)	13 (-1)	4,00 (-1)	39,44	119,26
6	302,40 (+1)	13 (-1)	10,00 (+1)	27,07	81,87
7	302,40 (+1)	37 (+1)	4,00 (-1)	56,93	172,15
8	302,40 (+1)	37 (+1)	10,00 (+1)	31,48	95,19
9	32,05 (-α)	25 (0)	7,00 (0)	52,13	16,71
10	370,94 (+α)	25 (0)	7,00 (0)	42,32	156,98
11	201,60 (0)	4,8 (-α)	7,00 (0)	27,42	55,27
12	201,60 (0)	45,18 (+α)	7,00 (0)	48,35	97,47
13	201,60 (0)	25 (0)	1,95 (-α)	49,54	99,87
14	201,60 (0)	25 (0)	12,04 (+α)	23,11	46,60
15	201,60 (0)	25 (0)	7,00 (0)	38,07	76,75
16	201,60 (0)	25 (0)	7,00 (0)	38,04	76,68
17	201,60 (0)	25 (0)	7,00 (0)	31,49	63,48

Fonte: o autor.

6; 3 e 7; 4 e 8; e 9 e 10. Porém, a concentração de enzima no derivado bioativo, considerando estes duetos, foi sempre maior onde a concentração de LU no tampão também foi maior. No dueto, por exemplo, 9 e 10 foi utilizado a menor e a maior concentração de LU no tampão: 32,05 e 370,94 mg de proteína/g de suporte, respectivamente. Aqui, o rendimento da imobilização aumentou com o decréscimo da concentração da solução tampão: foi de 42,32% (teste 10) para 52,13% (teste 9). Já a concentração de enzima no derivado bioativo aumentou com o aumento da concentração da solução tampão, indo de 16,71 mg de enzima/g de suporte no teste 9 para 156,98 mg de enzima/g de suporte no teste 10.

Nos testes onde utilizou-se os mesmos valores para os parâmetros de concentração de LU na solução tampão de imobilização e de pH, conclui-se que temperaturas maiores favorecem a retenção de atividade enzimática, ou seja, o rendimento da imobilização e a concentração de proteína nos derivados bioativos são maiores nestes casos, como pode ser observado nos duetos 1 e 3; 2 e 4; 5 e 7; 6 e 8; e 11 e 12. Nos testes 1 e 3, onde houve um aumento de cerca de 46% nos resultados quando a temperatura subiu de 13°C (teste 1) para 37°C (teste 3). Comparando estes dois ensaios, o rendimento da imobilização foi de 45,90% para 67,25% e a concentração de enzima no derivado bioativo foi de 46,26 para 67,79 mg de proteína/g de suporte com o aumento da temperatura.

Nos ensaios onde o parâmetro variante foi o pH, fixando-se a concentração de LU na solução tampão e a temperatura, os valores do rendimento da imobilização e da concentração de enzima no derivado bioativo aumentaram, em todos os casos, à medida que a pH variou negativamente, ou seja, tendendo a pH's mais ácidos. Este quadro é repetido nos duetos 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8; e 13 e 14. Nos ensaios 7 e 8, por exemplo, onde a concentração de LU no tampão fixou-se em 302,40 mg de proteína/g de suporte e a temperatura em 37°C, enquanto o pH foi 4,00 para o teste 7 e 10,00 para o teste 8, os rendimentos de imobilização foram 56,93% e 31,48% e a concentração de enzima no derivado foi 172,15 e 95,19 mg de proteína/g de suporte em tais testes, respectivamente. Nesta amplitude de pH, houve um aumento de cerca de 80% dos valores de rendimento e de concentração do derivado com a diminuição do pH do ensaio 8 para o ensaio 7.

Com os resultados experimentais demonstrados na Tabela 3, analisou-se por meio de regressões múltiplas e superfícies de resposta a influência simultânea de

todos os fatores estudados sobre os resultados do rendimento da imobilização e na concentração de enzima no derivado bioativo. Em ambas regressões se avaliou os valores p encontrados pelo teste *t-Student* com um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$). Através delas, foi possível identificar os pontos ótimos para produzir um derivado bioativo com alta carga de enzima bem como discutir a influência dos parâmetros tanto na retenção de atividade enzimática como na obtenção do derivado.

5.3.1 Análise dos resultados obtidos para a resposta de rendimento de imobilização

Promovendo a regressão múltipla dos resultados presentes na Tabela 3 em função do rendimento da imobilização, obteve-se os seguintes coeficientes e suas análises de significância (Tabela 4):

Tabela 4 – Dados da regressão múltipla do DCCR em função do rendimento da imobilização.

Fatores	Coefficientes de Regressão	Erro Padrão	t(7)	p-valor
Média	35,7679	1,62	22,0331	0,0000
[Tampão] (X_1) (L)	-3,2735	1,52	-4,2940	0,0036
[Tampão] (X_1) (Q)	4,3485	1,68	5,1825	0,0013
Temperatura (X_2) (L)	6,1151	1,52	8,0214	0,0001
Temperatura (X_2) (Q)	1,0457	1,68	1,2463	0,2527
pH (X_3) (L)	-9,1845	1,52	-12,0476	0,0000
pH (X_3) (Q)	0,4960	1,68	0,5911	0,5730
[Tampão] x T (X_1 x X_2)	-0,5658	1,99	-0,5681	0,5877
[Tampão] x pH (X_1 x X_3)	0,6700	1,99	0,6727	0,5227
T x pH (X_2 x X_3)	-3,6725	1,99	-3,6870	0,0078
$R^2=0,975$				

Obs.: Os termos L representam os termos lineares e Q os termos quadráticos.

Fonte: o autor.

O coeficiente de determinação apontou uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo, indicando que 98% da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta.

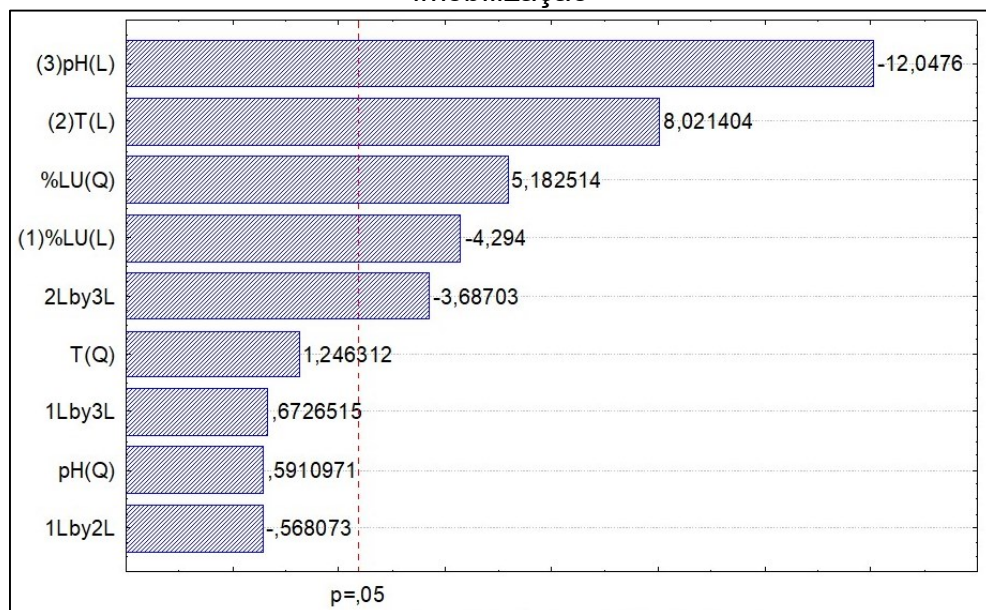
Considerando nível de significância de 95%, conclui-se que os termos temperatura quadrática, pH quadrático, a interação da concentração de LU *versus* temperatura e a interação da concentração de LU *versus* pH não são significativos. Assim, obteve-se a Equação 8 com os parâmetros significativos.

$$\begin{aligned} \text{Rendimento da Imobilização} = 35,7679 - 3,2735X_1 + 4,3485X_1^2 + \\ 6,1151X_2 - 9,1845X_3 - 3,6725X_2X_3 \end{aligned} \quad (8)$$

Na Equação 8, os termos X_1 , X_2 e X_3 relacionam-se com a concentração de LU na solução tampão de imobilização, temperatura e pH, pelas Equações 4, 5 e 6.

Podemos confirmar pelo gráfico de Pareto, apresentado na Figura 12, os parâmetros significativos e o efeito de cada fator sobre o rendimento da imobilização.

Figura 12– Gráfico de Pareto da regressão do DCCR em função do rendimento da imobilização



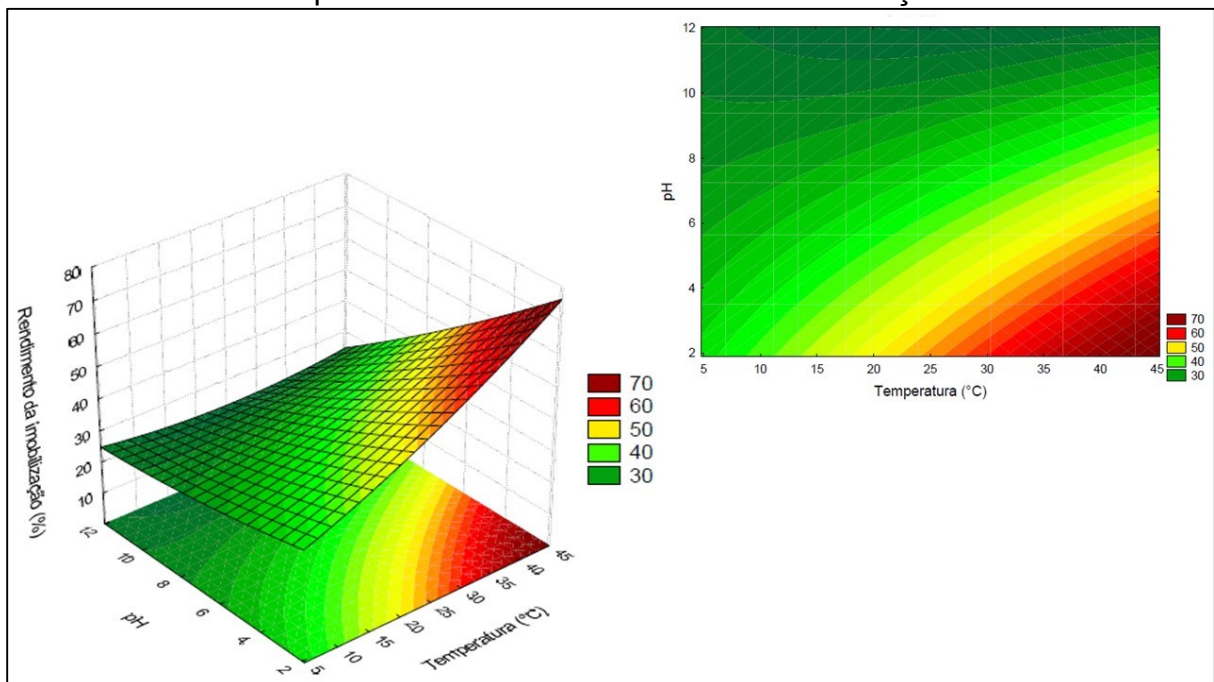
Fonte: o autor.

A Figura 12 indica que o pH linear é o fator que possui maior efeito sobre o rendimento da imobilização, seguido pela temperatura linear. Estes fatores

sobrepõem em relevância de influência a concentração de LU na solução tampão de imobilização, seja o fator linear ou quadrático desta.

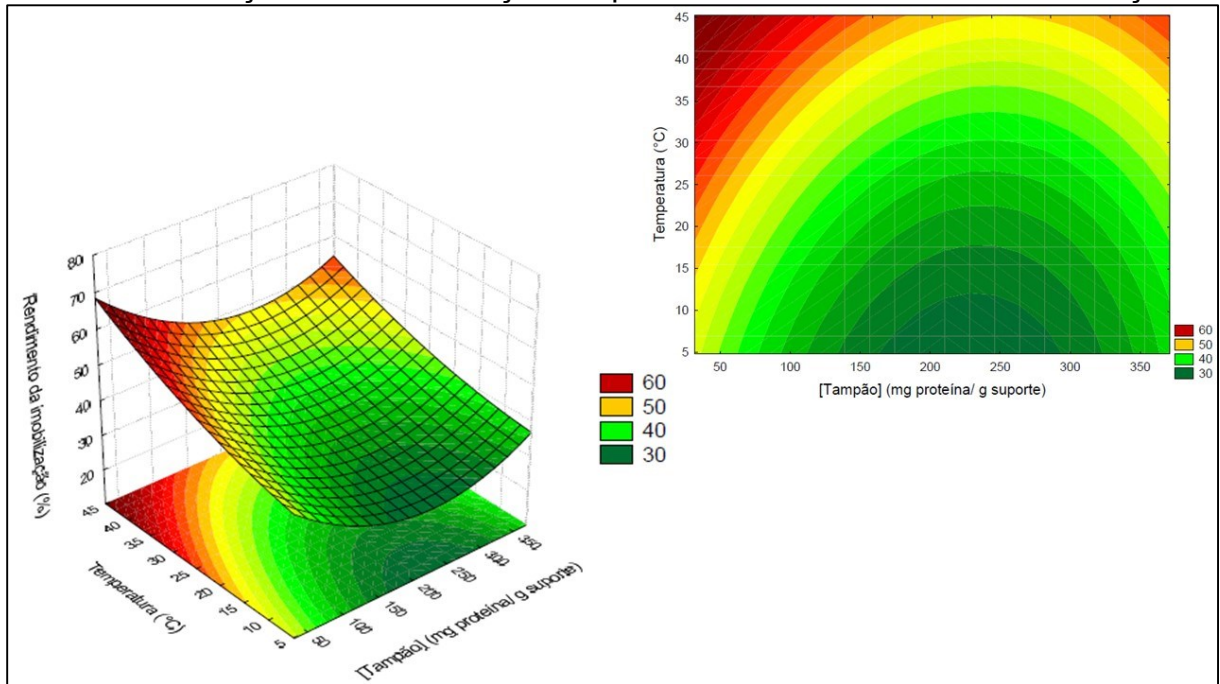
Para que fossem observadas as regiões onde os maiores valores de rendimento da imobilização fossem alcançados, foram construídas superfícies de resposta a partir do modelo obtido (Figuras 13, 14 e 15), analisando o rendimento em função de duas variáveis e fixando a outra variável no ponto central.

Figura 13 – Superfície de resposta e curva de contorno da influência do pH e da temperatura sobre o rendimento da imobilização.



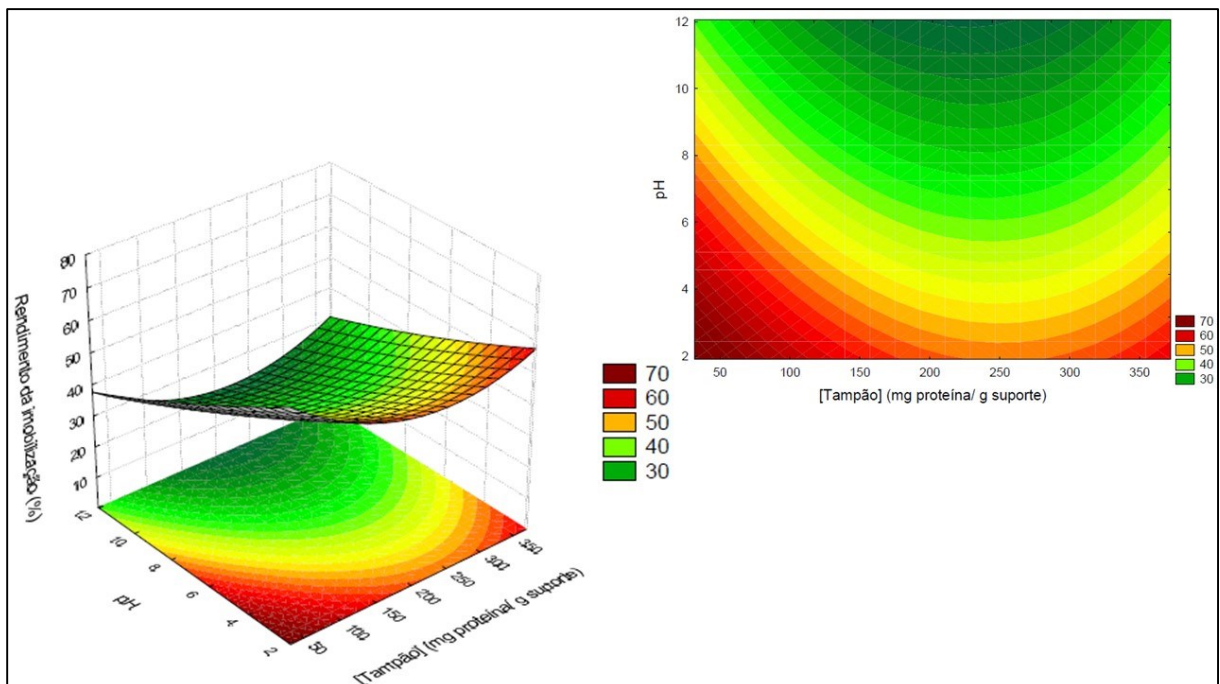
Fonte: o autor.

Figura 14 – Superfície de resposta e curva de contorno da influência da temperatura e da concentração de LU da solução tampão sobre o rendimento da imobilização.



Fonte: o autor.

Figura 15 - Superfície de resposta e curva de contorno da influência do pH e da concentração de LU da solução tampão sobre o rendimento da imobilização.



Fonte: o autor.

A Figura 13 indica que valores maiores de rendimentos de imobilização são obtidos em maiores faixas de temperatura e menores valores de pH. A Figura 14 confirma a faixa de valores maiores para a temperatura, onde os rendimentos altos são obtidos em temperaturas superiores a 40°C.

Os valores de pH mais ácidos são confirmados também pela Figura 15, onde os valores ótimos se concentram em um pH inferior a 4,00. Esse intervalo de pH assinalando os maiores rendimentos de imobilização coloca em evidência a relevância das hidroxilas e carbonilas presentes na superfície da celulose esterificada, considerando a capacidade destas de serem protonadas. Faixas ácidas de pH como região ótima para imobilização, evidenciam que há uma maior tendência de adsorção da fosfolipase LU sobre a superfície do suporte quando este está saturado de prótons, nas condições experimentais realizadas. Este é o fator com maior relevância no rendimento da imobilização da fosfolipase sobre o TAC, conforme pode ser concluído pelo gráfico de Pareto (Figura 12).

Valores inferiores a 50 mg de proteína/g de suporte na concentração do tampão de imobilização apontam os maiores rendimentos. Todavia, ótimos rendimentos também são encontrados quando a solução tampão apresenta uma concentração mais saturada (concentrações superiores a 350 mg de proteína/g de suporte), conforme demonstrado pelas regiões avermelhas das Figuras 14 e 15.

5.3.2 Análise dos resultados obtidos para a concentração de enzima no derivado bioativo

Promovendo a regressão múltipla dos resultados presentes na Tabela 3 em função da concentração da enzima no derivado bioativo, obteve-se os seguintes coeficientes e suas análises de significância (Tabela 5):

Tabela 5 – Dados da Regressão dos dados do DCCR em função da concentração de enzima no derivado bioativo.

Fatores	Coefficientes de Regressão	Erro Padrão	t(7)	p-valor
Média	72,1468	4,27	16,9072	0,0000
[Tampão] (X_1) (L)	38,0599	4,01	18,9927	0,0000
[Tampão] (X_1) (Q)	5,6790	4,41	2,5748	0,0367
Temperatura (X_2) (L)	11,9940	4,01	5,9852	0,0005
Temperatura (X_2) (Q)	1,9749	4,41	0,8954	0,4003
pH (X_3) (L)	-18,1203	4,01	-9,0424	0,0000
pH (X_3) (Q)	0,8666	4,41	0,3929	0,7061
[Tampão] x T (X_1 x X_2)	4,9468	5,24	1,8893	0,1008
[Tampão] x Ph (X_1 x X_3)	-8,8536	5,24	-3,3815	0,0117
T x pH (X_2 x X_3)	-6,9997	5,24	-2,6734	0,0318
$R^2=0,986$				

Obs.: Os termos L representam os termos lineares e Q os termos quadráticos.

Fonte: o autor

O coeficiente de determinação indicou uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo, indicando que 99% da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela Equação empírica proposta.

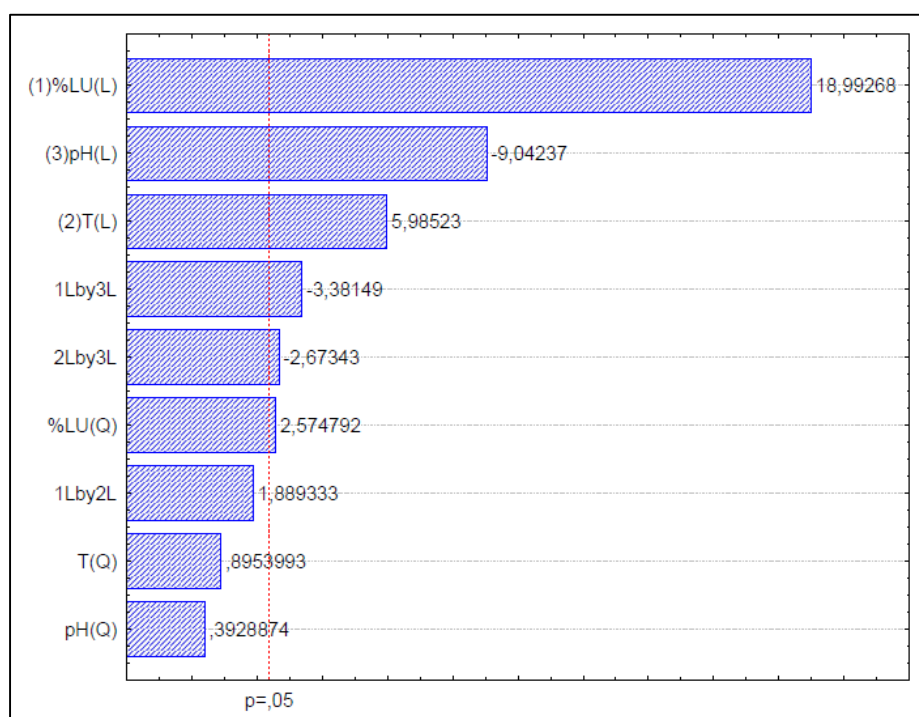
Considerando nível de significância de 95%, conclui-se que os termos temperatura quadrática, pH quadrático e interação da concentração de LU *versus* temperatura não são significativos. Através da regressão múltipla obteve-se a Equação 9 com os parâmetros significativos.

$$\begin{aligned} \text{Concentração de Enzima no Derivado Bioativo} = & 72,1468 + 38,0599X_1 \quad (9) \\ & + 5,6790X_1^2 + 11,9940X_2 - 18,1203X_3 - 8,8536X_1X_3 - 6,9997X_2X_3 \end{aligned}$$

Aqui, os termos X_1 , X_2 e X_3 relacionam-se com a concentração de LU na solução tampão de imobilização, temperatura e pH, pelas Equações 4, 5 e 6.

Em relação aos parâmetros significativos, pode-se observar na Figura 16 (gráfico de Pareto), que o fator de maior efeito na concentração de proteína no suporte foi a relação de mg proteína/g de suporte na forma linear, seguido pelo pH na forma linear.

Figura 16 – Gráfico de Pareto da regressão do DCCR em função da concentração de enzima por massa de derivado bioativo

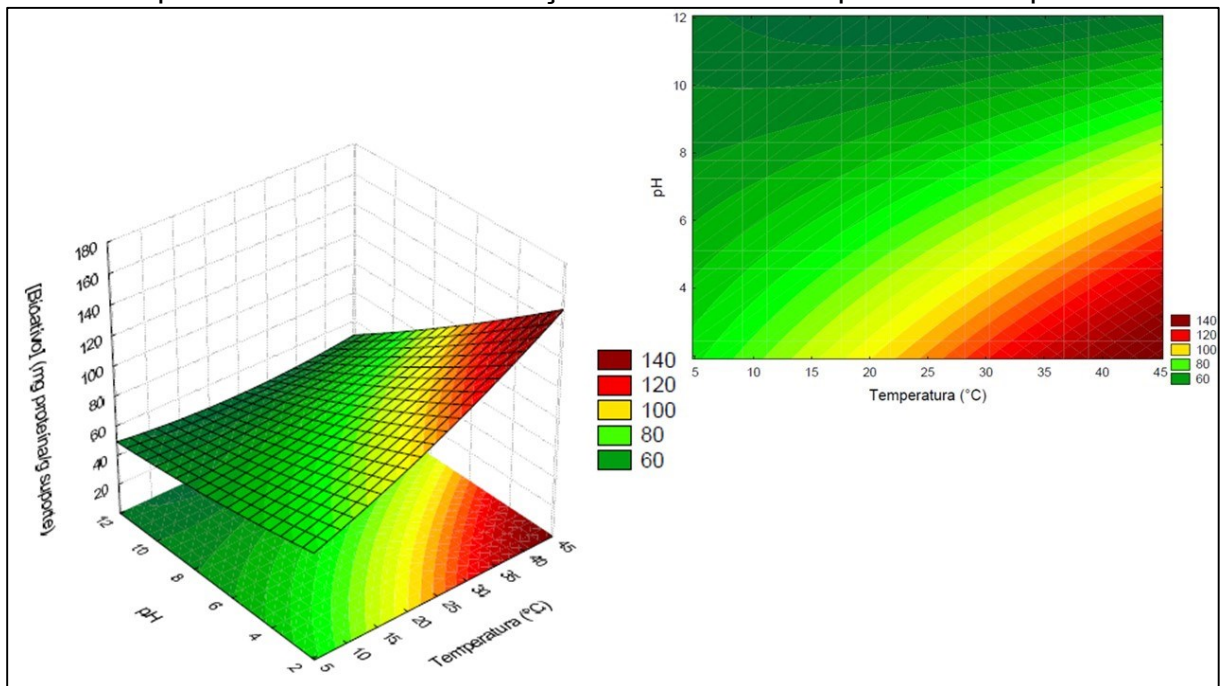


Fonte: O autor.

O gráfico de Pareto indica que ao se considerar uma maior carga enzimática sobre a superfície do suporte como objetivo da imobilização, a concentração linear de LU na solução tamponada torna-se o fator com maior influência sobre o resultado, sobrepondo o peso dos fatores relacionados à temperatura e pH e também à concentração quadrática de LU no tampão. Em segundo lugar, o fator com maior influência é o pH linear, sinalizando mais uma vez a relevância dos grupos funcionais do suporte no processo de imobilização.

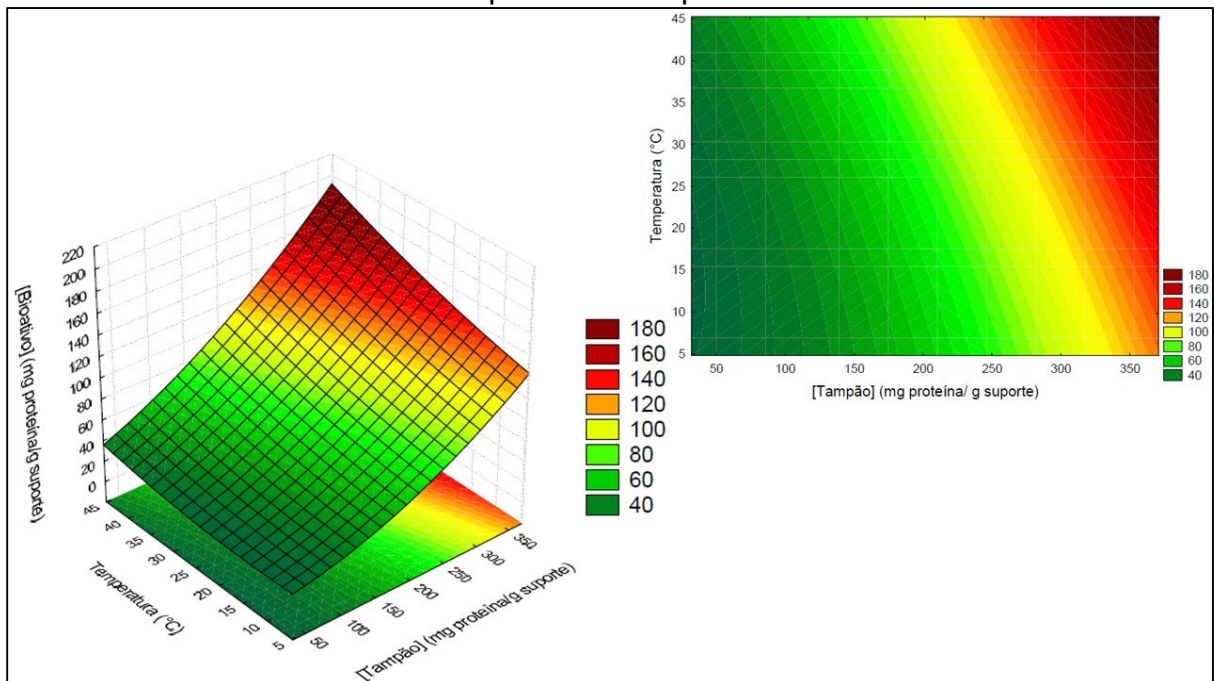
Nas Figuras 17, 18 e 19 estão representas as superfícies de resposta e as curvas de contorno relacionando os fatores e os valores do DCCR.

Figura 17 - Superfície de resposta e curva de contorno da influência do pH e da temperatura sobre a concentração de enzima na superfície do suporte.



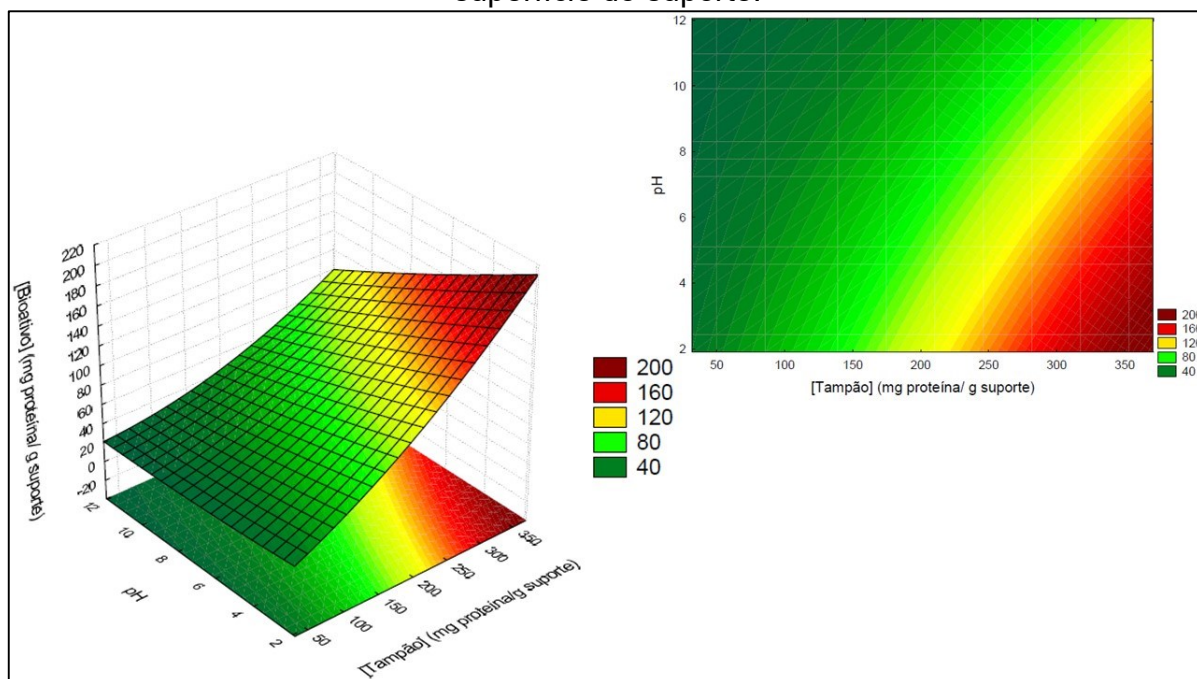
Fonte: o autor.

Figura 18 - Superfície de resposta e curva de contorno da influência da temperatura e da concentração de LU da solução tampão sobre a concentração de enzima na superfície do suporte.



Fonte: o autor.

Figura 19 - Superfície de resposta e curva de contorno da influência do pH e da concentração de LU da solução tampão sobre a concentração de enzima na superfície do suporte.



Fonte: o autor.

Conforme indicado pelas superfícies de resposta, as maiores concentrações de enzima no suporte são obtidas em: temperaturas superiores a 35°C, pH inferiores a 4,00 e concentração de LU na solução tampão maiores que 300 mg de proteína/g de suporte. As faixas de pH e temperatura são semelhantes à regressão de dados em função do rendimento de imobilização. Porém, ao contrário do que ocorre com o rendimento, a concentração de LU na solução tampão apresenta uma única tendência de influência para a carga enzimática no suporte: esta aumenta à medida que a concentração de LU no tampão também varia positivamente, nas condições estudadas.

5.3.3 Validação do modelo

Ao derivar as Equações 8 e 9, e utilizando as equações 4, 5 e 6, obtém-se os valores máximos de rendimento da imobilização e da concentração de enzima no derivado bioativo indicando a concentração de LU na solução tampão de imobilização ([Tampão]), a temperatura e o pH no qual são obtidas essas respostas otimizadas. Os valores teóricos resultantes desse modelo cuja resposta é o rendimento da imobilização foram:

- [Tampão] = 32,00 mg de proteína/g de suporte;
- Temperatura = 45,2°C;
- pH = 1,95;
- Rendimento da Imobilização (teórico) = 97,61%.

Considerando a concentração de enzima no derivado bioativo como a resposta da regressão, os valores otimizados foram obtidos com as variáveis iguais a:

- [Tampão] = 370,94 mg de proteína/g de suporte;
- Temperatura = 45,2°C;
- pH = 1,95;
- [Bioativo] = 247,36 mg de proteína/g de suporte.

Os valores de temperatura e pH onde o rendimento da imobilização e a concentração de enzima no suporte são máximos, foram os mesmos. O mesmo não ocorreu para a concentração de LU na solução tampão, que envolveu os valores extremos do DCCR: próximo ao mínimo para o rendimento e igual ao valor máximo para a concentração de enzima no derivado bioativo.

O valor otimizado de concentração de enzima no derivado bioativo (247,36 mg de proteína/g de suporte), partindo de uma solução tampão cuja concentração seja 370,94 mg de proteína/g de suporte indica um rendimento de imobilização de 66,79%, valor semelhante ao maior rendimento encontrado nos ensaios do DCCR: 67,25% para o ensaio 3 (Tabela 3), onde a concentração de LU no tampão foi 100,8 mg de proteína/g de suporte. Utilizando a mesma enzima (LU) e um suporte altamente hidrofóbico (octil-agarose), Fernandez-Lorente et al. (2007) alcançou um rendimento de 80% com tampão de imobilização fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0, a 25°C. Porém, este valor foi alcançado em 5 horas de imobilização.

Uma imobilização cujo rendimento seja de 97,61% e a relação de enzima por massa de suporte no processo seja 32,00 mg de proteína/g de suporte, produz um derivado bioativo com concentração de enzima correspondente a 31,23 mg de proteína/g de suporte. Concentração quase oito vezes menor que a concentração máxima que pode ser obtida e, conseqüentemente, com uma funcionalidade inferior. Considerando ainda que pode haver perdas de enzima no processo de lavagem do derivado após o processo de imobilização, a concentração de enzima no derivado e sua funcionalidade podem ser ainda menores. Por outro lado, o ponto máximo da concentração do derivado abrange uma região ótima de trabalho do rendimento da

imobilização, como é demonstrado na Figuras 14 e na Figura 15. Deste modo, a validação do modelo foi feita para a regressão que indica os valores máximos de enzima na superfície do suporte, conforme objetivo primário.

Para a validação, a metodologia de imobilização (item 4.4.1) foi realizada considerando uma relação de enzima de 370,94 mg de proteína/g de suporte, 45,2°C e pH a 1,95, onde a concentração de enzima no derivado seja máxima. Obteve-se os seguintes resultados experimentais (Tabela 6):

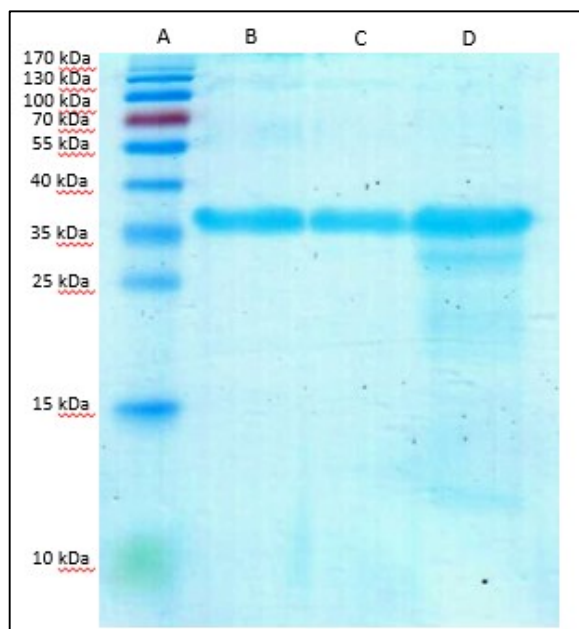
Tabela 6 – Validação do Planejamento do Composto Central

[LU]	Temp.	pH	Atividade (U/mL)
370,94	45,2	1,95	264,92
370,94	45,2	1,95	248,53
370,94	45,2	1,95	240,78
			[bioativo] = 251,41 mg de proteína/g de suporte s = 12,32

Fonte: o autor.

Além de se mostrarem reprodutíveis, a média dos resultados corresponderam a um valor 1,68% maior que o valor máximo teórico, sinalizando a validade do modelo alcançado. A concentração de enzima por massa de suporte no derivado bioativo obtido experimentalmente com os valores otimizados foi cerca de 15 vezes maior comparado à menor concentração do derivado bioativo obtido experimentalmente na matriz do DCCR, referente ao ensaio 9, onde a concentração obtida foi 16,71 mg de proteína/g de suporte. Comparado ao derivado bioativo obtido no teste com as demais matrizes celulósicas, onde obteve-se uma concentração 59,94 mg de proteína/g de suporte com a imobilização do LU em TAC nas condições descritas no item 4.4.2, houve um aumento de cerca de 419% na concentração com as condições otimizadas. Na Figura 20, é apresentado gel resultante da análise por eletroforese do derivado bioativo obtido com o teste descrito no item 4.4.2 para o TAC, e do derivado bioativo produzido nas condições otimizadas.

Figura 20 – Gel de eletroforese realizada com enzima imobilizada em TAC em condições não-otimizadas e otimizadas.



A: Marcador molecular;
 B: Lecitase[®] Ultra;
 C: Enzima imobilizada em TAC com processo não otimizado;
 D: Enzima imobilizada em TAC com processo otimizado;

Fonte: o autor.

Comparando a banda da LU (localizada entre 35 kDa e 40 kDa) da coluna D – associada à proteína imobilizada no TAC através do processo otimizado – observa-se um sinal analítico superior ao da coluna C, referente ao derivado bioativo de TAC obtido na seleção de matrizes celulósicas (item 5.1), onde o rendimento da imobilização foi 29,63% a partir de um tampão de imobilização com concentração de LU de 201,60 mg de proteína/g de suporte.

Além da banda de LU, aparecem na coluna D outras bandas adjacentes. Estas bandas referem-se a outras proteínas de diferentes massas moleculares presentes no preparado comercial da LU. Devido ao alto potencial de retenção enzimática do TAC nas condições otimizadas, estas outras proteínas também são adsorvidas. Mishra et al. (2009) promoveram a separação das proteínas através de filtragem em membranas, selecionando-as por peso molecular. Ao analisar as alíquotas que foram separadas, atribuíram a atividade enzimática do preparado comercial à proteína de massa molecular 35 kDa, evidentes aqui nas bandas das colunas B e C, e na maior banda da coluna D.

5.4 Ação do derivado bioativo sobre óleo de soja bruto

A ação catalítica da fosfolipase LU imobilizada no TAC em sua condição otimizada foi avaliada através da análise do índice de acidez do óleo bruto e das amostras após o processo de degomagem. O aparecimento das gomas pode ser observado a olho nu durante o processamento, tanto para as amostras degomadas com enzima como para as amostras degomadas apenas com água, sendo necessária a separação destas por centrifugação para análise do óleo. Todas as amostras tratadas apresentam menor turbidez visualmente. A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos após o processo de degomagem.

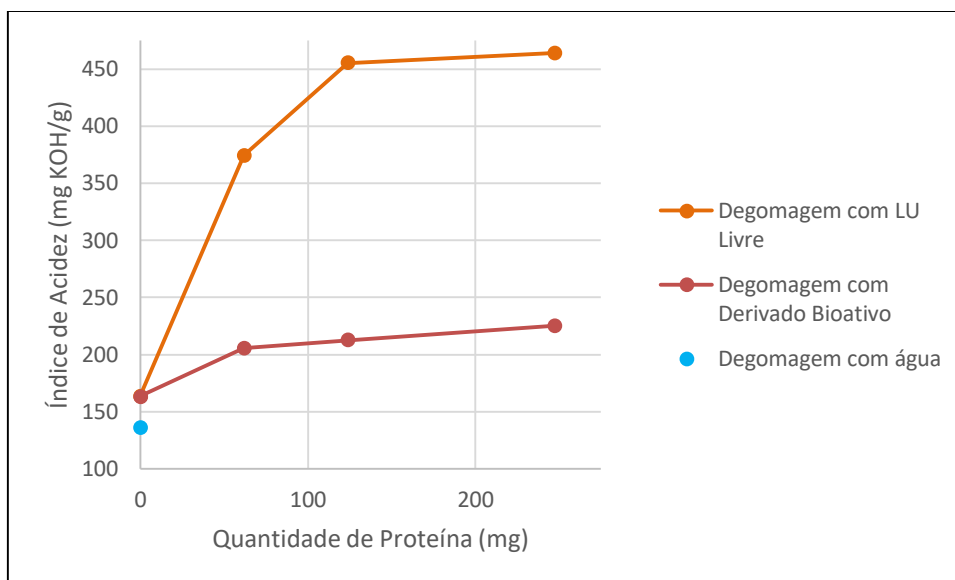
Tabela 7 – Índice de acidez das amostras de óleo bruto e óleo degomado.

Ensaio	Quantidade de Proteína	Índice de Acidez
Óleo Bruto	---	163,66
TA	---	135,89
LU1	61,85	374,23
DB1		205,56
LU2	123,70	455,25
DB2		212,70
LU3	247,41	463,91
DB3		225,29

Fonte: o autor.

A amostra de óleo bruto apresenta um índice de acidez de 163,66 mg de KOH g⁻¹. Quando o óleo é degomado apenas com a água, o índice de acidez cai 17%, evidenciando a capacidade da água de remover ácidos graxos do óleo. Comparado à acidez do óleo bruto, o tratamento enzimático aumenta a acidez de 25,6% a 37,7% para a enzima imobilizada e 128,6% a 183,4% para a enzima livre. As diferenças podem ser observadas na Figura 21.

Figura 21 – Índice de acidez das amostras de óleo bruto e degomado.



Fonte: o autor.

Observa-se o aumento do índice de acidez para as amostras tratadas com a enzima imobilizada e a enzima livre. O aumento da acidez mostra nitidamente a atividade enzimática hidrolítica da LU. Este aspecto é esperado uma vez que a LU é uma fosfolipase A_1 que além de catalisar a produção de lisofosfolípidios que são removidos com a água durante o processo de degomagem em sua fase final, é capaz de hidrolisar os ácidos graxos ligados no glicerol dos triglicerídeos, levando ao aumento da acidez do óleo após degomagem (JIANG et al., 2015b). Pode-se observar na Tabela 7 e na Figura 21, que os resultados com a enzima livre são superiores. Este aspecto pode indicar a modulação da atividade catalítica da enzima imobilizada no TAC no sentido de diminuir a atividade hidrolítica que promove a liberação de ácidos graxos se comparada a mesma atividade da enzima livre. No caso das degomagens, é possível que a atividade fosfolipolítica da enzima em sua forma imobilizada tenha sido favorecida se compararmos com a LU livre. Este resultado é importante pois o aumento do teor de ácidos graxos livres diminui a qualidade do óleo para a produção de biodiesel ou para a indústria alimentícia, por exemplo.

A maior acidez em óleos nos processos utilizando enzimas com atividade lipolítica são comuns. Utilizando fosfolipases A_1 em processos de degomagem, AN et al. (2016) reportaram a hidrólise de fosfolípidos gerando aumentando o teor de ácidos graxos livres no óleo. Assim, processos de degomagem utilizando a LU livre ou imobilizada, pode provocar o mesmo efeito sobre o óleo de soja ao provocar a

hidrólise dos fosfolipídeos, liberando ácidos graxos sobre óleo e depositando o lisofosfolipídeo na goma resultante.

Os resultados apresentados, embora não permitam mensurar diretamente a eliminação de fósforo nos processos de degomagem, permitem que façamos uma avaliação da atividade hidrolítica da enzima. Sendo um aspecto importante no estudo de imobilização a verificação da atividade da enzima após sua adsorção no suporte, os resultados evidenciam que a enzima imobilizada mantém a atividade, possivelmente com mudanças relacionadas a atuação do sítio ativo, tendo em vista a modulação da sua atividade.

6 CONCLUSÃO

A LU foi imobilizada em 5 matrizes celulósicas – CELP, CELM, DAC, TAC e ABC – nas seguintes condições experimentais: temperatura de 4°C, pH 7,00 e uma relação de 201,60 mg de proteína/g de suporte na solução tampão. Tendo cinco diferentes matrizes celulósicas, sendo três delas esterificadas, submetidas a um processo de imobilização de LU sob as mesmas condições experimentais, foram avaliados os rendimentos da imobilização para cada matriz. Os derivados celulósicos esterificados apresentaram maior retenção de atividade enzimática, em termos de atividade lipolítica, por possuírem maior caráter hidrofóbico diante das matrizes não esterificadas. Dentre elas, o TAC, que possui maior porcentagem de grupos acetila, aspecto confirmado por IVTF, apresentou maior rendimento de imobilização (29,73%), o que foi confirmado pelo teste de eletroforese onde a banda de proteínas relacionada a esse suporte foi maior. O teste de eletroforese também sinalizou uma maior interação da enzima com o suporte no DAC e ABC em relação à CELP e à CELM, uma vez que nos suportes esterificados a dessorção da enzima do derivado bioativo foi menor.

Em teste de imobilização com o tampão BR 40 mM, confirmou-se a sua eficiência em imobilização de enzimas nos suportes celulósicos, tanto quanto os tampões fosfatos nas concentrações de 10 mM e 25 mM. Este teste possibilitou a otimização da metodologia de imobilização de LU em TAC com uma faixa ampla de pH.

Um DCCR que investigasse a influência da concentração de enzima na solução tampão de imobilização, o pH e a temperatura sobre a retenção enzimática foi realizado, através de uma matriz de 17 experimentos. Analisou-se por meio regressões múltiplas e superfícies de resposta, a influência destes três fatores, bem como a interação deles, sobre o rendimento da imobilização e sobre a concentração de enzima na superfície do derivado bioativo.

O rendimento da imobilização demonstrou receber a influência dos fatores da concentração linear e quadrática da enzima no tampão, temperatura linear, pH linear e a interação entre pH e temperatura. Identificou-se o pH linear como o fator de maior influência sobre a resposta, seguidos pela temperatura linear e concentração quadrática de enzima no tampão. As superfícies de resposta indicaram como região

ótima de trabalho faixas de pH inferiores a 4,00, temperaturas superiores a 40°C e concentrações da solução tampão inferiores 50 mg de proteína/g de suporte e superiores a 350 mg de proteína/g de suporte.

A concentração de enzima no derivado bioativo teve como fatores de influência a concentração linear e quadrática da enzima no tampão, temperatura linear, pH linear e as interações entre concentração de LU no tampão *versus* pH e temperatura *versus* pH. Dentre estes, o fator de maior influência sobre a resposta é a concentração linear de LU na solução tampão, seguidos pelo pH e temperatura lineares. As regiões ótimas de trabalho para obtenção de uma alta carga enzimática no derivado bioativo foram análogas às regiões do rendimento de imobilização para pH e temperatura: superiores a 4,00 e 35°C, respectivamente. Altas concentrações de enzima no derivado bioativo são obtidos em soluções tampão com concentração de LU superiores a 300 mg de proteína/g de suporte. Realizando a derivada da equação resultante da regressão múltipla do DCCR em termos da concentração de enzima no derivado bioativo, encontrou-se os valores de 370,94 mg de proteína/g de suporte, 45,2°C e pH de 1,95 como aqueles que resultariam na concentração máxima de enzima no suporte. Na validação do método nessas condições, obteve-se um derivado bioativo cuja concentração foi 251,41 mg de proteína/g de suporte, 419% maior que o derivado bioativo obtido para o TAC no teste prévio com as demais matrizes celulósicas.

Uma amostra de óleo de soja bruto foi submetida a procedimentos de degomagem com a enzima livre e com o derivado bioativo. O índice de acidez indicou uma possível modulação da atividade enzimática após imobilização, no sentido de reduzir a ação hidrolítica da enzima sobre os triglicerídeos.

Assim, o uso de derivados celulósicos esterificados, de modo especial o TAC, demonstra ser promissor para a imobilização via adsorção física da fosfolipase comercial LU para a modificação do óleo soja bruto. O DCCR demonstrou ser uma ferramenta útil para otimização do processo de imobilização.

Além da boa capacidade de retenção enzimática, o TAC utilizado como suporte nas condições estudadas pode conferir à enzima, possivelmente, características que sejam interessantes para indústrias de processamento de óleo.

REFERÊNCIAS

- ALVES, J. S. et al. Use of Lecitase-Ultra immobilized on styrene-divinylbenzene beads as catalyst of esterification reactions: Effects of ultrasounds. **Catalysis Today**, v. 255, p. 27–32, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.11.036>
- AN, Q. et al. Improving phospholipase activity of PLA 1 by protein engineering and its effects on oil degumming. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, p. 1–9, 2016. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201600110>
- AOKI, J. et al. Structure and function of phosphatidylserine-specific phospholipase A1. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1582, n. 1–3, p. 26–32, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(02\)00134-8](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(02)00134-8)
- ASURI, P. et al. Directed assembly of carbon nanotubes at liquid-liquid interfaces: nanoscale conveyors for interfacial biocatalysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 1046–1047, 2006. <https://doi.org/10.1021/ja0573965>
- BALSINDE, J.; WINSTEAD, M. V; DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Letters**, v. 531, n. 1, p. 2–6, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03413-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03413-0)
- BASTIDA, A. et al. 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. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980605\)58:5<486::AID-BIT4>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980605)58:5<486::AID-BIT4>3.0.CO;2-9)
- BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. B13, p. 1–45, 1951.
- BRÍGIDA, A. I. S. **Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de Coco Verde Como Suporte Para Aplicações Industriais**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.
- CABRERA, Z. et al. Asymmetric hydrolysis of dimethyl 3-phenylglutarate catalyzed by Lecitase Ultra®. Effect of the immobilization protocol on its catalytic properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 7, p. 531–536, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.07.001>
- CARVALHO, V. DE A. **Caracterização Do Diacetato De Celulose Modificado Como Um Material Alternativo Para Dispositivo De Liberação**. Universidade Federal de Uberlândia, 2014.
- CASTRO, H. F. DE et al. Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação.

- Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146–156, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000100025>
- CONAGIN, A. Delineamentos “Compostos Centrais Ortogonais, Rotacionais e Divisíveis em Blocos”. **Revista Científica do Instituto Agronômico, Campinas**, v. 41, n. 5, p. 49–56, 1982. <https://doi.org/10.1590/S0006-87051982000100005>
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. DA G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000400017>
- DE MARIA, L. et al. Phospholipases and their industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 290–300, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0775-x>
- ELENA, C. et al. B. cereus phospholipase C engineering for efficient degumming of vegetable oil. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 67–72, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.011>
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1–2, p. 185–197, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(98\)00042-5](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00042-5)
- FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Effect of the immobilization protocol in the activity, stability, and enantioselectivity of Lecitase Ultra. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 47, n. 3–4, p. 99–104, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.04.008>
- FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Lecitase[®] ultra as regioselective biocatalyst in the hydrolysis of fully protected carbohydrates. Strong modulation by using different immobilization protocols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 3–4, p. 110–117, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.11.017>
- FERNÁNDEZ, C. M.; MARTIN, V. C. Preparation D’un Tampon Universel de Force Ionique 0,3 M. **Talanta**, v. 24, p. 747–748, 1977. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(77\)80204-X](https://doi.org/10.1016/0039-9140(77)80204-X)
- FILHO, H. J. B. DE L. **Tratamento dos Resíduos de Gesso da Construção e da Demolição-RCD para a Produção de Gesso Beta Reciclado**. Universidade Federal de Pernambuco, 2010.
- GARCIA-GALAN, C. et al. Evaluation of styrene-divinylbenzene beads as a support to immobilize lipases. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 7629–7645, 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules19067629>
- GHANNOUM, M. A. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal

- Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 122–143, 2000. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.1.122-143.2000>
- GOLDBECK, R. **Triagem, produção e avaliação da atividade da enzima lipase a partir de leveduras silvestres**. Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- HAALAND, P. D. **Experimental Design in Biotechnology**. New York: INC., 1989.
- HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 5ª ed. Artmed, 2012.
- HIRATA, D. B. et al. Evaluation of different immobilized lipases in transesterification reactions using tributyrin: Advantages of the heterofunctional octyl agarose beads. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 117–123, 2016a. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.08.008>
- HUANG, S. et al. Characteristics and vegetable oils degumming of recombinant phospholipase B. **Chemical Engineering Journal**, v. 237, p. 23–28, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.09.109>
- HUANG, X. J. et al. Immobilization of Candida rugosa lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 70, n. 3–4, p. 95–100, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.02.010>
- IUPAC. Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, p. 597–600, 1995.
- JANG, M. G. et al. Biodiesel production from crude canola oil by two-step enzymatic processes. **Renewable Energy**, v. 42, p. 99–104, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.09.009>
- JIANG, X. et al. Application of phospholipase A1 and phospholipase C in the degumming process of different kinds of crude oils. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 3, p. 432–437, 2015a. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.011>
- JIANG, X. et al. Optimization of the degumming process for camellia oil by the use of phospholipase C in pilot-scale system. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3634–3644, 2015b. <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs13197-014-1418-3>
- KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A.; MELO, E. H. M. The immobilization of enzymes and cells. **Chimicaoggi**, p. 21–29, 1988.
- KIM, H. J. et al. Biocompatible cellulose nanocrystals as supports to immobilize lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 170–178, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.09.007>
- KIM, I. H.; GARCIA, H. S.; HILL, C. G. Phospholipase A1-catalyzed synthesis of phospholipids enriched in n - 3 polyunsaturated fatty acid residues. **Enzyme and**

Microbial Technology, v. 40, n. 5, p. 1130–1135, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmitec.2006.08.018>

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Structure-function relationships of phospholipases: the anticoagulant region of phospholipases A2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 30, p. 14402–14407, 1987.

KÖHLER, G. A. et al. Phospholipase A2 and Phospholipase B activities in fungi. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 11, p. 1391–1399, 2006. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.09.011>

KOSAKA, P. M. et al. Catalytic activity of lipase immobilized onto ultrathin films of cellulose esters. **Langmuir**, v. 23, n. 24, p. 12167–12173, 2007. <https://doi.org/10.1021/la701913q>

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

LI, Y.; DU, W.; LIU, D. Efficient biodiesel production from phospholipids-containing oil: Synchronous catalysis with phospholipase and lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p. 45–49, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.11.001>

LIU, N. et al. Immobilisation of lecithase® ultra for production of diacylglycerols by glycerolysis of soybean oil. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 301–307, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.145>

LUTZ, I. A. Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos. **Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos**, p. 589–625, 2008.

MAO, X. et al. Identification of a novel phospholipase D with high transphosphatidylase activity and its application in synthesis of phosphatidylserine and DHA-phosphatidylserine. **Journal of Biotechnology**, v. 249, p. 51–58, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.029>

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 23, n. 6, p. 1537–1546, 2001.

MISHRA, M. K. et al. Lipase activity of Lecitase® Ultra: characterization and applications in enantioselective reactions. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 20, n. 24, p. 2854–2860, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2009.11.012>

MURRAY, R. K. et al. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. AMGH Editora Ltda., 2014.

OLIVEIRA, T. C. DE. **Mudanças conformacionais envolvidas na ativação interfacial de fosfolipases A2 – uma análise computacional**. Universidade Federal

do Rio Grande do Sul, 2006.

PALOMO, J. M. et al. Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: Hydrolytic resolution of mandelic acid esters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 775–783, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00169-2)

PENCREAC'H, G.; BARATTI, J. C. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 417–422, 1996. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00120-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00120-4)

PEREIRA, M. G. et al. Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 4, p. 561–570, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.027>

PULEO, A. C.; PAUL, D. R. The effect of degree of acetylation on gas sorption and transport behavior in cellulose acetate. **Journal of Membrane Science**, v. 47, n. 3, p. 301–332, 1989. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)83083-5](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)83083-5)

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas: Casa do Pão, 2005.

SANTOS, L. D. **Fermentação Alcoólica Empregando Leveduras Floculantes em Sistema de Reatores Torre**. Universidade Federal de Uberlândia, 2014.

SATHISHKUMAR, P. et al. Laccase immobilization on cellulose nanofiber: The catalytic efficiency and recyclic application for simulated dye effluent treatment. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 111–120, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.12.008>

SCHMID, A. et al. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 359–366, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00336-1](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00336-1)

SILVA, F. et al. Preparation and Characterization of Cellulose Triacetate as Support for Lecitase Ultra Immobilization. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1930, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22111930>

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: Classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 1–2, p. 1–19, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00105-0)

- SLIZYTE, R.; RUSTAD, T.; STORRO, I. Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products: Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3680–3692, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.04.007>
- SONG, J. K.; RHEE, J. S. Enhancement of stability and activity of phospholipase A1 in organic solvents by directed evolution. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1547, n. 2, p. 370–378, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00204-7)
- SUN, X. et al. Immobilized trypsin on hydrophobic cellulose decorated nanoparticles shows good stability and reusability for protein digestion. **Analytical Biochemistry**, v. 477, p. 21–27, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.02.009>
- SUTTIWIJITPUKDEE, N. et al. Intermolecular interactions and crystallization behaviors of biodegradable polymer blends between poly (3-hydroxybutyrate) and cellulose acetate butyrate studied by DSC, FT-IR, and WAXD. **Polymer**, v. 52, n. 2, p. 461–471, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.11.021>
- TABTABAEI, S.; DIOSADY, L. L. Aqueous and enzymatic extraction processes for the production of food-grade proteins and industrial oil from dehulled yellow mustard flour. **Food Research International**, v. 52, n. 2, p. 547–556, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.005>
- TACIAS-PASCACIO, V. G. et al. Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. **Fuel**, v. 200, p. 1–10, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.03.054>
- VIEIRA, A. C. et al. Degomagem de óleo de girassol para produção de biodiesel. **VIII Cobgresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, p. 2–5, 2009.
- WANG, P. Nanoscale biocatalyst systems. **Current Opinion in Biotechnology**, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.10.009>