

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

CLAUDIA ZUBIOLLO

São Cristóvão - SE

Fevereiro/2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**IMOBILIZAÇÃO POR ENCAPSULAÇÃO DE LIPASE DE  
*Aspergillus niger* EM MATRIZ SOL-GEL OBTIDA A PARTIR DE  
FARINHA DE SEMENTES DE ABÓBORA**

CLAUDIA ZUBIOLO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos como requisito parcial à obtenção  
do título de MESTRE EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Luciana Cristina Lins de Aquino

Agência financiadora: CAPES

São Cristóvão - SE  
Fevereiro-2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Z93i Zubiolo, Claudia  
Imobilização por encapsulação de lipase de *Aspergillus niger*  
em matriz sol-gel obtida a partir de farinha de sementes de  
abóbora / Claudia Zubiolo ; orientadora Luciana Cristina Lins de  
Aquino. – São Cristóvão, 2013.  
92 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)  
– Universidade Federal de Sergipe, 2013.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Resíduos agroindustriais. 3.  
Lipase. 4. *Aspergillus niger*. 5. Sol-gel. I. Aquino, Luciana Cristina  
Lins de, orient. II. Título.

CDU 664.641.2

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

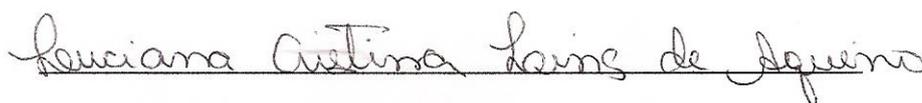
PARECER FINAL DO JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IMOBILIZAÇÃO POR ENCAPSULAÇÃO DE LIPASE DE *Aspergillus niger* EM MATRIZ SOL-GEL OBTIDA A PARTIR DE FARINHA DE SEMENTES DE ABÓBORA**

Autor (a): Claudia Zubiolo

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Luciana Cristina Lins de Aquino

Banca examinadora:



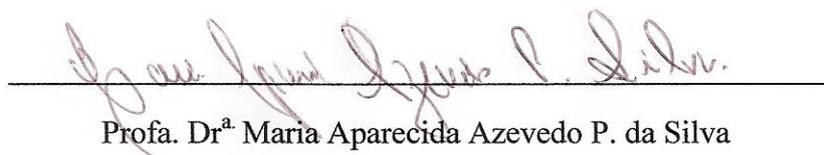
Prof. Dr<sup>a</sup> Luciana Cristina Lins de Aquino

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFS



Prof. Dr<sup>a</sup> Clejde Mara Faria Soares

Universidade Tiradentes/UNIT - Instituto de Tecnologia e Pesquisa/ITP



Prof. Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Azevedo P. da Silva

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFS

## **VITAE DO CANDIDATO**

Claudia Zubiolo Perioto, nascida em 21/09/75, natural de Maringá- PR. Casada com Fabiano Romero Perioto. Filha de José Aparecido Zubiolo e Maria de Lourdes de Souza Zubiolo.

Formada em Farmácia Industrial pela Universidade Estadual de Maringá (UEM) em 1998. Foi bolsista do CNPq, em 1995, no Departamento de Bioquímica Básica da Universidade Estadual de Maringá e realizou seu trabalho de conclusão de curso em 1998 no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) em Campinas no Departamento de química de alimentos.

Atuou como bolsista, em projeto da EMBRAPA, no ano de 2000, no Departamento de Microbiologia (ITAL), com pesquisa de ocratoxina em cafezais no Estado de São Paulo.

Em 2011, iniciou o curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos em nível de Mestrado na Universidade Federal de Sergipe.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, Criador de todas as coisas por ter me fortalecido durante minha caminhada para que eu pudesse alcançar mais esta conquista. Senhor, obrigada pelo fim de mais essa etapa.

Aos meus pais e irmãos que mesmo não demonstrando, sei que torceram e ficaram muito felizes com minha conquista.

Ao meu querido esposo Fabiano, pelo incentivo, dedicação e por ter paciência para me ouvir.

Aos meus queridos filhos Beatriz, Bruno, Mateus e Gabriel, pois mesmo não compreendendo minha ausência, me enlouquecendo às vezes, souberam esperar com paciência.

À professora Luciana, pela paciência na orientação, confiança e incentivo, não medindo esforços para que o trabalho pudesse ser concretizado.

A todos os professores do curso de pós-graduação, que dedicaram seu tempo e sabedoria que contribuíram para nosso amadurecimento durante o curso.

À professora Cleide, pelo auxílio e apoio na execução do trabalho.

Aos professores Mário e Zélia do departamento de Física, bem como seus técnicos de laboratório por nos auxiliarem na realização de alguns experimentos.

A todos os meus colegas de turma, do curso de mestrado, pelos momentos que passamos juntos, um ajudando o outro como uma família.

As minhas amigas: Márcia, Elis e Terezinha, por estarem sempre prontas a me ajudar.

Aos meus colegas: Samuel, Nayara, Mateus, Celestina, Isabela, Murilo, Rebeca, Ranyere, Marluce, por me ajudarem durante a realização dos experimentos.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Finalmente, a todos que fizeram parte desta longa jornada, principalmente aqueles os quais não me recordo no momento, os meus mais sinceros agradecimentos.

## RESUMO

O uso de lipases como biocatalisadores de reações típicas da indústria química vêm crescendo a cada dia. Estas enzimas têm a capacidade de atuar sobre ligações ésteres presentes em acilgliceróis e podem ser produzidas por fermentação, através do aproveitamento de resíduos agroindustriais. No entanto, as enzimas na forma livre não podem ser reutilizadas, o que do ponto vista econômico, torna desvantajosa a sua aplicação. Uma das estratégias utilizadas para aplicações industriais é a imobilização de enzimas, sendo vantajosa por tornar o processo contínuo e poder separar facilmente o produto e o biocatalisador. Entre os métodos de imobilização disponíveis o encapsulamento de enzimas em matrizes hidrofóbicas obtidas pela técnica sol-gel, é um método bastante utilizado, por manter a estabilização da molécula, não haver interação física e química entre o suporte e a enzima e manter a estabilidade térmica. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar o processo de imobilização por encapsulação, em matrizes hidrofóbicas obtidas a partir da técnica sol-gel, da lipase de *A. niger*, obtida por fermentação de farinha de sementes de abóbora. Experimentos foram realizados para a caracterização bioquímica, morfológica e físico-química das enzimas livre e imobilizada. A lipase imobilizada apresentou rendimento de imobilização de (71,4%). A enzima livre apresentou maior atividade hidrolítica em pH 4,0 e temperatura de 37°C e a imobilizada em pH 3,0 e temperatura de 45°C. A lipase tanto livre quanto imobilizada apresentou maior estabilidade em pH 6,0, entretanto a lipase imobilizada apresentou maior estabilidade térmica à 45°C, sendo o tempo de meia-vida de 13,6h (45°C) e de 7,0h para a lipase livre à 37°C durante 240 min de incubação. O maior valor de  $K_m$  da enzima imobilizada (57,05 mM) em relação à enzima livre (45,38 mM) indicou uma menor afinidade da enzima para com o substrato devido ao processo de imobilização. A estabilidade operacional da lipase imobilizada foi mantida com 50% de sua atividade, após seis ciclos de reutilização. Nas análises morfológicas e físico-químicas, foi possível verificar maior porosidade na estrutura do biocatalisador imobilizado e de acordo com o diâmetro de poros observou-se que o suporte e o biocatalisador imobilizado são caracterizados como materiais sólidos mesoporosos. O processo de imobilização conferiu maior resistência térmica à lipase imobilizada em relação à livre, observada pela acentuada perda de massa que ocorreu com a lipase livre, perdendo praticamente toda sua massa (99%) em análise térmica por termogravimetria.

**Palavras-Chave:** resíduo agroindustrial, lipase, imobilização, sol-gel.

## ABSTRACT

The use of lipases as biocatalysts for chemical reactions typical of the industry is growing every day. These enzymes are capable of acting on ester bonds present in acylglycerols and may be produced by fermentation, through the use of agro-industrial waste. However, enzymes in free form cannot be reused which economical view point, make its application with high financial investment. One of the strategies used for industrial applications is the immobilization of enzymes using various methods, highlighting the sol-gel technique for the preparation of biocatalysts, to be quite promising. Therefore, the aim of this study was the immobilization process for encapsulation of lipase of *A. niger*, this enzyme, obtained by fermentation of flour, pumpkin seeds, immobilized in hydrophobic matrices obtained from the sol-gel technique, perform biochemical, morphological and physico-chemical free and immobilized lipase. The immobilized lipase had a yield of immobilization (71.4%). The free enzyme showed higher hydrolytic activity at pH 4.0 and temperature of 37°C and immobilized at pH 3.0 and temperature of 45°C. Lipase both free and immobilized showed greater stability at pH 6.0, however, the immobilized lipase showed higher thermal stability at 45°C, and the half-life of 13.6 h (45°C) and 7.0 h for the free lipase 37°C for 240 min of incubation. The highest value of  $K_m$  of the immobilized enzyme (57.05 mM) compared to the free enzyme (45.38 mM) indicating a lower affinity of enzyme towards the substrate due to immobilization process. The operational stability of the immobilized lipase was maintained with 50% of its activity after six cycles of reuse. In the morphological and physicochemical was possible to verify the structure of higher porosity biocatalyst immobilized and according to the pore diameter was observed that the support and the immobilized biocatalyst are characterized as mesoporous solids. The process of immobilization conferred greater resistance to thermal lipase immobilized on the free, observed by the sharp mass loss that occurred with the free lipase, losing almost all its mass (99%) in thermal analysis by thermogravimetry.

Keywords: agro industrial residue, lipase immobilization, sol-gel.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	i
RESUMO .....	ii
ABSTRACT .....	iii
SUMÁRIO .....	iv
ÍNDICE DE TABELAS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
CAPÍTULO I.....	4
RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
1-INTRODUÇÃO .....	7
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	9
2.1 - Lipases Microbianas .....	9
2.2 - Propriedades catalíticas das lipases fúngicas .....	11
2.3 - Métodos de imobilização de lipases .....	14
2.3.1 - Adsorção .....	15
2.3.2 - Ligação covalente no suporte ou ligação Cruzada.....	16
2.3.3 - Encapsulação.....	16
2.4 - Suportes para imobilização de enzimas .....	17
2.5 - Imobilização em matriz hidrofóbica sol-gel .....	19
2.6 - Cinética enzimática .....	20
3 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3.1 – Enzima.....	22
3.2 - Reagentes Químicos.....	22
3.3 - Metodologia .....	22
3.3.1- Imobilização de lipase por encapsulação em matriz sol-gel .....	22
3.3.2 - Determinação da Atividade Hidrolítica .....	23
3.3.3 - Rendimento de imobilização (%).....	24
3.4 - Propriedades catalíticas da lipase na forma livre e imobilizada .....	24

3.4.1- Efeito de pH das lipases na forma livre e imobilizada.....	24
3.4.2 - Efeito de temperatura das lipases na forma livre e imobilizada .....	25
3.4.3 - Estabilidade hidrolítica da lipase livre e imobilizada em diferentes pHs .....	25
3.4.4 - Estabilidade hidrolítica da lipase livre e imobilizada em diferentes temperaturas	25
3.4.5 - Determinação dos parâmetros cinéticos para lipase livre e imobilizada .....	26
3.4.6 - Estabilidade operacional da lipase imobilizada .....	26
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
4.1 - Rendimento de imobilização da lipase encapsulada.....	26
4.2 - Efeito de pH sobre a atividade da lipase livre e imobilizada.....	27
4.3 - Efeito de temperatura sobre a atividade da lipase livre e imobilizada.....	28
4.4 - Efeito do pH na estabilidade da lipase livre e imobilizada .....	30
4.5 - Estabilidade térmica da lipase livre e imobilizada pelo método de encapsulação.....	31
4.6 - Estabilidade operacional da lipase imobilizada .....	34
4.7 Parâmetros cinéticos da lipase livre e imobilizada por encapsulação .....	35
5- CONCLUSÃO .....	36
CAPÍTULO II .....	37
RESUMO .....	38
ABSTRACT .....	39
1- INTRODUÇÃO .....	40
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	41
2.1 – Caracterização morfológica do suporte e da lipase imobilizada por encapsulação em matriz sol-gel.....	41
2.2 – Análises Térmicas .....	46
2.2.1 - Análise termogravimétrica (TGA) .....	47
2.2.2 – Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	49
3 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	51
3.1 MATERIAIS .....	51
3.2 METODOLOGIA .....	51
3.2.1– Propriedades morfológicas e físico-químicas da lipase encapsulada e da matriz sol-gel .....	51
3.2.1.1 – Determinação da área de superfície específica, diâmetro e volume de poros... 51	
3.2.1.2 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	51
3.2.1.3 - Análise Termogravimétrica (TGA).....	52
3.2.1.4 – Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	52

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
4.1 – Determinação da área de superfície específica, diâmetro e volume de poros.....	52
4.1.2 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	55
4.1.3 – Análise termogravimétrica (TGA) .....	56
4.1.4 – Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) .....	58
5 – CONCLUSÃO .....	60
6- CONCLUSÃO GERAL.....	61
7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	62
8 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Constante de inativação térmica e tempo de meia-vida da lipase livre e imobilizada em diferentes temperaturas por 4 h.....	34
Tabela 2: Parâmetros cinéticos lipase livre e imobilizada.....	35
Tabela 3: Propriedades texturais de adsorção-dessorção de nitrogênio de amostras de matriz pura e biocatalisador imobilizado.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das reações catalisadas por lipases.....	10
Figura 2: Estrutura molecular de lipase fúngica de <i>Rhizomucor—miehei</i> .....	13
Figura 3: Representação esquemática do sítio catalítico de lipase.....	13
Figura 4: Representação esquemática dos métodos para imobilização de enzimas.....	15
Figura 5: Efeito de pH na atividade relativa da lipase livre e imobilizada.....	28
Figura 6: Efeito de temperatura sobre a atividade relativa da lipase livre e imobilizada.....	29
Figura 7: Efeito do pH na estabilidade da lipase livre <i>A. niger</i> .....	30
Figura 8: Efeito do pH na estabilidade da lipase de <i>A. niger</i> imobilizada por encapsulação em matrizes hidrofóbicas sol-gel.....	31
Figura 9: Estabilidade térmica da lipase livre.....	32
Figura 10: Estabilidade térmica da lipase imobilizada por encapsulação.....	32
Figura 11: Atividade residual (%) da lipase de <i>Aspergillus niger</i> imobilizada por encapsulação em sol-gel em função do nº de ciclos de reutilização.....	34
Figura 12: Característica física e composição química da lipase imobilizada em matriz sol-gel.....	41
Figura 13: Isotermas de adsorção e dessorção.....	43
Figura 14: Classificação dos loops de histereses.....	45
Figura 15: Equipamento utilizado para recobrimento com carbono ou deposição metálica sobre as amostras não condutoras.....	46
Figura 16: Gráfico de uma curva termogravimétrica.....	47
Figura 17: Diagrama esquemático dos compartimentos do DSC por compensação de energia.....	49
Figura 18: Diagrama esquemático dos compartimentos do DSC por fluxo de calor.....	50
Figura 19: Isotermas de adsorção-dessorção da matriz pura e biocatalisador imobilizado.....	53
Figura 20: Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) de matriz pura, lipase livre e biocatalisador imobilizado.....	56
Figura 21: Curva termogravimétrica das amostras de matriz pura, biocatalisador imobilizado e lipase livre.....	57
Figura 22: Curva DSC para amostra de matriz pura, biocatalisador imobilizado e lipase livre.....	59

## INTRODUÇÃO GERAL

Com o avanço tecnológico e o crescimento do mercado, houve a necessidade de se buscar no universo científico alternativas menos agressivas e que pudessem usar os próprios recursos naturais existentes em nosso meio. A biocatálise surgiu como uma das alternativas para atender esse anseio e o desenvolvimento de biocatalisadores mais específicos se fez necessário para a síntese de novos compostos com alto valor agregado.

Os micro-organismos, tendo como principal classe de interesse, a dos fungos filamentosos, são importantes no desenvolvimento de novos biocatalisadores. Estes, ao contrário dos catalisadores químicos, que produzem efluentes tóxicos, operam em temperaturas e pressões altas, produzem enzimas muito seletivas para com seu substrato, são biodegradáveis e capazes de agir sob condições ambientais brandas (CONTESINI, *et al.* 2010).

Dentre as enzimas hidrolíticas de maior interesse estão as lipases (triacilglicerol ester hidrolase E C. 3.1.1.3), que são biocatalisadores que catalisam a hidrólise e a síntese de ésteres a partir de glicerol e de ácidos graxos de cadeia longa. São enzimas muito versáteis, pois, são capazes de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. Além de não requerem cofatores, podem ser utilizadas com uma ampla gama de substratos (BORNSCHEUER, 2002).

Devido à quantidade de nutrientes muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o aproveitamento de resíduos sólidos agroindustriais para a obtenção de lipases, através de processos fermentativos e dentre os resíduos podemos citar sementes de abóbora, cascas de abacate, torta de babaçu, torta de mamona e borra de café (SANTOS *et al.*, 2012; DANTAS & AQUINO, 2010). O grande potencial é principalmente na produção de enzimas através de fungos filamentosos, os quais têm recebido a maioria das atenções nas pesquisas, pois apresentam capacidade de crescimento em baixos níveis de água (COUTO & SANROMAN, 2006; RODRIGUEZ, *et al.* 2006; GRAMINHA, *et al.* 2008; SUN & XU, 2008). Particularmente, espécies pertencentes ao gênero *Rhizopus sp*, *Mucor sp*, *Geotrichum sp*, *Penicillium sp* e *Aspergillus sp* são amplamente reconhecidas como as melhores fontes de lipase. Dentre estes micro-organismos, *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* são considerados os mais seguros segundo a agência americana Food and Drug Administration (FDA) (MAHADIK, *et al.* 2002; CARVALHO, *et al.* 2005; CONTESINI, *et al.* 2010).

Apesar de apresentarem propriedades interessantes as enzimas na forma livre apresentam variações na eficiência catalítica e em determinadas situações, podem ser instáveis e deixam a desejar em relação à sua atividade, seletividade e estabilidade ideais (CONTESINI, *et al.* 2010). Com o objetivo de minimizar estas restrições, foram desenvolvidas ao longo dos anos diversas pesquisas a respeito de técnicas de imobilização com o intuito de obter enzimas com maior estabilidade operacional, tornando assim o processo de imobilização vantajoso economicamente.

A técnica de imobilização consiste em restringir o movimento da enzima, por meio do seu confinamento ou interação ao suporte, com retenção de sua atividade catalítica (SEBRÃO, *et al.* 2007; PAULA, *et al.* 2008). As técnicas de imobilização mais utilizadas são adsorção, ligação ou vínculo da enzima a um suporte insolúvel, aprisionamento da enzima em géis poliméricos ou encapsulamento. A principal vantagem de utilizar enzimas imobilizadas como biocatalisadores é que é possível reutilizá-los, uma vez que podem ser facilmente recuperados, tornando assim o processo economicamente viável. Várias técnicas e muitos materiais usados como suporte têm sido estudados, possibilitando variações no processo de imobilização, com grande diversidade em relação à estabilidade, eficiência e atividade. Existem alguns parâmetros muito importantes em relação ao suporte que devem ser levados em consideração: resistência mecânica, estabilidade química e física, caráter hidrofílico/hidrofóbico e custo (DA SILVA, *et al.* 2008). Os processos envolvendo matrizes sol-gel estão ganhando importância crescente como suporte sólido para a imobilização de biomoléculas a ser usado em biocatálise, oferecendo uma alternativa à tradicional tecnologia de polímeros (PIROZZI *et al.* 2009). No processo sol-gel, ocorre primeiramente, a hidrólise de um metal de baixo peso molecular, precursor alcóxido como tetrametoxissilano (TMOS), ou tetraetoxissilano (TEOS) na presença de água em pH ácido (ou alcalino), o que resulta na formação de grupos reativos do tipo silanol. (Si-OH) (SASSOLAS, *et al.* 2012). Após formação dos grupos silanol, ocorre, a reação de condensação entre grupos silanol em presença de grupos alcalinos (ou ácidos) resultando na formação de polímeros siloxano (Si-O-Si), formando uma matriz na qual uma enzima pode ser aprisionada com sucesso (SASSOLAS, *et al.* 2012).

Os materiais utilizados como suporte se diferenciam em naturais, sintéticos, orgânicos, inorgânicos e híbridos com distintas características de tamanho, forma e densidade (FREITAS, *et al.* 2009; PAULA, *et al.* 2008; SANTOS, *et al.* 2008; FREITAS, *et al.* 2007; XIE, *et al.* 2009). Diversos compostos orgânicos têm sido empregados na síntese de suportes híbridos, porém os biopolímeros se mostram promissores devido ao seu baixo custo, baixa

toxicidade, biocompatibilidade e propriedades multifuncionais (FREITAS, *et al.* 2009; PAULA, *et al.* 2008; SANTOS, *et al.* 2008; FREITAS, *et al.* 2007; XIE, *et al.* 2009; SHCHIPUNOV, 2003; AYRES & HUNT, 2001; SONG, *et al.* 2008). Precursores silanos, tais como tetraetilortossilicato (TEOS) (FREITAS, *et al.* 2009; PAULA, *et al.* 2008; SANTOS, *et al.* 2008; FREITAS, *et al.* 2007; XIE, *et al.* 2009; SHCHIPUNOV, 2003; AYRES & HUNT, 2001; SONG, *et al.* 2008) e tetrametilortossilicato (TMOS), (RETUERT, *et al.* 2003; CAZACU, *et al.* 2003), têm sido amplamente empregados na síntese de matrizes híbridas e se mostraram compatíveis com diversos polímeros.

As estruturas dos catalisadores podem ser investigadas através de características estruturais e físico-químicas determinadas através de análises de Microscopia eletrônica de Varredura (MEV), método BET, análise termogravimétrica (TGA), Calorimetria exploratória diferencial (DSC), entre outros (MOTHÉ & AZEVEDO, 2002). A caracterização desses materiais é de fundamental importância para a aplicação dos mesmos em importantes processos tecnológicos.

Neste contexto o intuito deste trabalho foi realizar a imobilização pelo método de encapsulação da lipase de *Aspergillus niger* em matrizes hidrofóbicas sol-gel. Esta enzima foi obtida, em trabalhos prévios, por fermentação em estado sólido de farinha de sementes de abóbora. Foram determinadas as características bioquímica, morfológica e físico-química e os parâmetros cinéticos das enzimas na forma livre e imobilizada, bem como foi avaliada a estabilidade operacional do biocatalisador imobilizado.

# CAPÍTULO I

Imobilização de lipase de *Aspergillus niger* por encapsulação em matriz sol-gel: Caracterização bioquímica, determinação dos parâmetros cinéticos e estabilidade operacional

## RESUMO

ZUBIOLLO, C., MSc. Universidade Federal de Sergipe; Fevereiro, 2013. Imobilização de lipase de *Aspergillus niger* por encapsulação em matriz sol-gel: Caracterização bioquímica, estabilidade operacional e determinação dos parâmetros cinéticos. Orientadora: Dra. Luciana Cristina Lins de Aquino.

Os processos biotecnológicos surgiram para atender lacunas deixadas pelos processos químicos clássicos e serem mais vantajosos. As enzimas são um exemplo de produtos gerados pela biocatálise e uma classe que merece atenção, são as lipases, um grupo capaz de realizar várias reações, tais como, de hidrólise, esterificação, inter-esterificação, entre outras. As lipases podem ser obtidas por várias fontes, mas os micro-organismos representam a classe de escolha por apresentarem grande seletividade para com seus substratos e serem biodegradáveis. Dentre os micro-organismos estão os fungos filamentosos, que despertaram grande atenção por se desenvolverem em ambientes com níveis baixos de água e serem seguros para uso em alimentos. Devido ao alto custo do processo para se obter enzimas, as pesquisas se encaminharam para o desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas, tornando o processo contínuo com a reutilização das enzimas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi imobilizar a lipase de *Aspergillus niger* por encapsulação em matriz sol-gel e realizar a caracterização bioquímica das formas livre e imobilizada e determinar a estabilidade operacional. A imobilização por encapsulação na matriz hidrofóbica foi realizada pela técnica sol-gel, a partir do precursor Tetraetilortosilicato (TEOS). A lipase livre e imobilizada foi caracterizada quanto ao pH, temperatura, estabilidade em pH e temperatura, parâmetros cinéticos e estabilidade operacional. A lipase encapsulada de *A. niger* apresentou rendimento de imobilização de 71,4%. A lipase livre apresentou maior atividade hidrolítica em pH 4,0, porém foi mais estável em pH 6,0 e temperatura ótima e maior estabilidade a 37°C. Após a imobilização a lipase manteve-se com maior atividade hidrolítica em pH 3,0, sendo mais estável em pH 6,0, e temperatura ótima e maior estabilidade a 45°C. Os parâmetros cinéticos foram determinados segundo linearização Lineweaver-Burk e foi obtido para lipase livre  $K_m$  (45,38 mM) e  $V_{m\acute{a}x}$  (1680,67U/mg) e para lipase imobilizada  $K_m$  (57,05 mM) e  $V_{m\acute{a}x}$  (526,31 U/mg). A estabilidade operacional manteve 50% de sua atividade hidrolítica até seis ciclos de reutilização.

Palavras-Chave: Lipase, *A. niger*, imobilização, sol-gel, reutilização.

## ABSTRACT

ZUBIOLO, C., MSc. Federal University of Sergipe; February, 2013. Immobilization of lipase from *Aspergillus niger* by encapsulation in sol-gel matrix: Biochemical characterization, operational stability and determination of kinetic parameters. Leader: Dra. Luciana Cristina Lins de Aquino.

The biotechnological processes have emerged to meet gaps left by traditional chemical processes and be more profitable. Enzymes are an example of products generated by the biocatalysis and a class that deserves attention, are lipases, one group capable of performing various reactions, such as hydrolysis, esterification, inter-esterification, among other. The lipases may be obtained from various sources, but the microorganisms represent a class of choice by great selectivity towards their substrate and being biodegradable. Among the filamentous fungi are microorganisms, which attracted much attention if they develop in environments with low levels of water and be safe for use in foods. Due to the high cost of the process for obtaining enzymes, studies were directed to the development of immobilized enzymes, because this would make the process continuous reuse of the enzymes. In this context, the aim of this work was to immobilize the lipase from *Aspergillus niger* by encapsulation in sol-gel matrix and perform biochemical characterization of free and immobilized forms and determine the operational stability. The immobilized by encapsulation in a hydrophobic matrix was obtained by the sol-gel technique from the precursor tetraethylorthosilicate (TEOS). The free and immobilized lipase, were characterized with respect to pH, temperature, pH and temperature stability, kinetic parameters and operational stability. The immobilized lipase *A. niger* showed immobilization yield of 71.4%. The free lipase showed higher hydrolytic activity at pH 4.0 but was more stable at pH 6.0 and optimum temperature and stability at 37°C. After immobilizing the lipase remained with higher hydrolytic activity at pH 3.0, being more stable at pH 6.0, and optimum temperature stability and increased to 45°C. The kinetic parameters were determined by Lineweaver-Burk linearization and free lipase was obtained for  $K_m$  (45.38 mM) and  $V_{max}$  (1680.67 U/mg) and immobilized lipase  $K_m$  (57.05 mM) and  $V_{max}$  (526.31 U/mg). The operational stability maintained 50% of its hydrolytic activity up to six cycles of reuse.

Keywords: Lipase, *A. niger*, immobilization, sol-gel, reusability

## 1-INTRODUÇÃO

Atualmente os biocatalisadores são utilizados em diversas aplicações industriais. Apresentam muitas vantagens em relação aos processos químicos como seletividade em relação ao substrato, especificidade, ser biodegradáveis e poder agir em condições ambientais brandas (CONTESINI, *et al.* 2010).

As lipases são biocatalisadores muito importantes, pois são capazes de catalisar reações de hidrólise de triacilgliceróis (CASTRO, *et al.* 2004; HASAN, *et al.* 2006; MENDES, *et al.* 2008; SHARMA, *et al.* 2001; MATEO, *et al.* 2007), sob certas condições, elas também são capazes de catalisar reações de síntese de ésteres (CARVALHO, *et al.* 2006), além de realizarem acidólise, alcoólise, aminólise, esterificação e inter-esterificação (SAXENA, *et al.* 2003).

Dentre as fontes, podem-se encontrar as lipases microbianas que oferecem as mais diversas vantagens para aplicação industrial devido a maior estabilidade, especificidade de substrato e os custos de produção menores quando comparado a outras fontes sem contar que existe uma imensa biodiversidade, levando a busca de novas lipases (CARVALHO, *et al.* 2005). Neste contexto a fermentação em estado sólido vem se destacando na obtenção de lipases pela possibilidade de crescimento microbiano, principalmente fungos, em substratos de baixo custo como os resíduos agroindustriais. Do ponto de vista de aplicação industrial, as enzimas na forma livre não podem ser reutilizadas, sendo economicamente inviáveis em alguns processos devido à necessidade de grandes quantidades de enzima. O processo de imobilização surgiu para melhorar as propriedades enzimáticas, como a seletividade e estabilidade (MATEO, *et al.* 2007), reduzir os custos operacionais da indústria com a seleção de um método de imobilização adequado (CONTESINI, *et al.* 2010) e principalmente poder reutilizar esta enzima, tornando assim o processo economicamente viável (DA RÓS *et al.* 2010).

Os métodos de imobilização mais utilizados são: adsorção física (TZIALLA *et al.* 2010), ligação covalente (DA RÓS *et al.* 2010), encapsulação ou aprisionamento (REETZ *et al.* 2003; YILMAZ *et al.* 2011), entre outros. Para que o processo de imobilização seja eficiente é necessário escolher um suporte adequado. Existe um grande número de matrizes, englobando materiais orgânicos e inorgânicos, naturais ou sintéticos (ZANIN & MORAES, 2004). Vários parâmetros do suporte são importantes e deve ser considerado: resistência mecânica, química e de estabilidade física, caráter hidrófobo/hidrófilo, custo, entre outros (DA SILVA, *et al.* 2009). Entre os métodos de imobilização citados o encapsulamento de

enzimas em um polímero inorgânico é um método que tem recebido atenção considerável nos últimos anos e se baseia em processos sol-gel. Este processo tem várias vantagens, pois o aprisionamento mecânico de enzimas que utilizam materiais sol-gel permite a estabilização da estrutura terciária da enzima devido à formação de uma rede de gel forte (SOARES *et al.* 2006). As enzimas encapsuladas em matriz sol-gel, normalmente apresentam uma maior resistência térmica e química evitando a sua desnaturação, bem como uma melhor estabilidade operacional e de armazenamento (GILL & BALLESTEROS, 2000; REETZ *et al.*, 1996).

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi a imobilização da lipase de *Aspergillus niger* encapsulada em matrizes hidrofóbicas obtidas pela técnica sol-gel, cuja enzima foi obtida por fermentação em estado sólido de farinha de sementes de abóbora. Determinar os parâmetros bioquímicos e avaliar a estabilidade operacional.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - Lipases Microbianas

Lipases (triacilglicerol acilhidrolases EC 3.1.1.3) são enzimas responsáveis por catalisar reações de hidrólise de triacilglicerol (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (VILLENEUVE *et al.* 2000). Além de hidrólise, as lipases também são capazes de catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (Inter esterificação, alcóólises e acidólises) (CASTRO *et al.* 2004; CARVALHO *et al.* 2003), aminólise (síntese de amidas) (CASTRO *et al.* 2004; KLOBITZ, 2003) e lactonização (CONTI, 2001; KLOBITZ, 2003).

As lipases atuam sobre substratos insolúveis em água, em interfaces de lipídeo/água, hidrolisando acilgliceróis preferencialmente de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono). Além desses compostos considerados seus substratos naturais, atuam sobre uma grande diversidade de outros substratos naturais ou sintéticos e são também capazes de catalisar reações de síntese em ambientes restritamente aquosos (KOBLOITZ, 2010).

As lipases podem ser distintas das esterases pelo fenômeno de ativação interfacial, a qual foi unicamente observada para as lipases (BORNSCHEUER, 2002). Nas lipases, o sítio ativo fica localizado dentro de uma cavidade hidrofóbica, que pode ser superficial ou profunda de acordo com a homologia a que pertencem. Nessa cavidade, aloja-se o ácido graxo, para posicionar a ligação éster alinhado com o sítio ativo. A cavidade é geralmente protegida por uma “tampa” polipeptídica que se abre, expondo o sítio ativo, quando a lipase encontra-se na interface polar/ apolar. Isso explica porque a grande maioria das lipases tem sua atividade muito aumentada na interface óleo/água, sobre substratos insolúveis, ao contrário de outras esterases (KOBLOITZ, 2010).

As reações catalisadas por lipases estão sumarizadas na Figura 1.

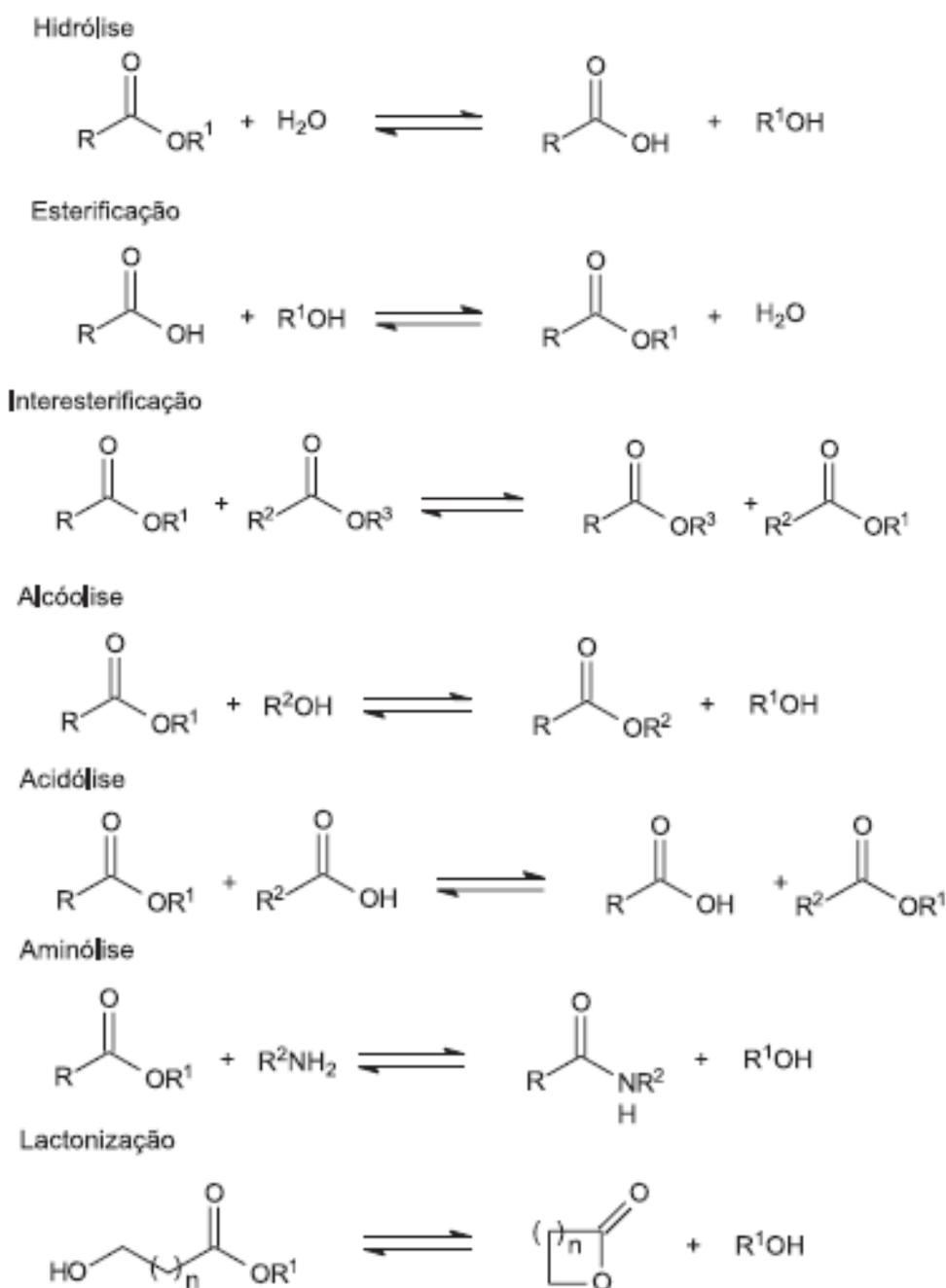


Figura 1: Representação das reações catalisadas por lipases (PAQUES & MACEDO, 2006).

Estas enzimas encontram-se largamente distribuídas na natureza nos animais, vegetais e microrganismos, mas em aplicações industriais as lipases microbianas merecem destaque devido a sua maior estabilidade, especificidade de substrato e os custos de produção ser mais baixos quando comparado a outras fontes, além da imensa biodiversidade de microrganismos existente o que leva a busca de novas lipases (CARVALHO, *et al.* 2005).

Segundo Carvalho *et al.* (2003), as lipases microbianas são classificadas em três grupos, em função de sua especificidade com relação ao substrato:

- Lipases 1,3 específicas: catalisam a liberação de ácidos graxos especificamente das posições *sn*-1 e *sn*-3 dos acilgliceróis. As lipases de *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger* e *Mucor miehei* pertencem a este grupo. A lipase pancreática é uma típica lipase *sn*-1,3 específica, e algumas lipases vegetais (colza, mostarda e lupino) têm demonstrado possuir este tipo de especificidade;

- Lipases não específicas: catalisam a hidrólise de TAG em ácidos graxos livres e glicerol, de modo aleatório. Exemplos são as lipases de *Penicilium cyclopium*, *Corynebacterium acnes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Candida cylindracea*;

- Lipases ácido graxo específicas: catalisam a hidrólise de tipos específicos de grupos acilas nas moléculas de TAG. Um representante típico deste grupo é a lipase de *Geotrichum candidum* que hidrolisa preferencialmente grupos acila de cadeia longa, que contenham dupla ligação *cis* na posição nove.

A utilização de lipases como catalisadores em nível industrial apresenta diversas vantagens relativamente à catálise química e aos biocatalisadores em geral. Dentre elas, pode-se citar (KOBBLITZ, 2010):

- elevada especificidade;
- diminuição de riscos para a saúde, quando utilizadas na indústria alimentar;
- baixos níveis de ocorrência de reações laterais e as condições reacionais brandas, que permitem um menor consumo energético e evitam a degradação ou decomposição de produtos e reagentes;
- não requerem cofatores;
- atuam em uma faixa de pH relativamente grande e são muito estáveis neste meio.

## **2.2 - Propriedades catalíticas das lipases fúngicas**

O efeito de diferentes fatores sobre a atividade e estabilidade de lipases na forma bruta ou purificada, tais como o pH, temperatura, efeito de íons metálicos, solventes orgânicos, detergentes/tensoativos e outros inibidores, pode aumentar ou suprimir a atividade das lipases e esta caracterização irá determinar a sua adequação para utilização em diferentes ambientes e indústrias (HASAN, *et al.* 2009).

Os fungos filamentosos são reconhecidos como os melhores produtores de lipase e são atualmente as fontes preferenciais, pois produzem lipases extracelulares, que facilitam a extração a partir de processos fermentativos (CARVALHO, *et al.* 2005). Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, mas existem lipases, como de *Aspergillus awamori* que podem apresentar massa molecular de até 90 kDa (BASHEER, 2011). As maiores atividades estão na faixa de pH entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40 °C. Contudo, sua termo estabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica. (CONTESINI, *et al.* 2010).

Dentre as variáveis do processo fermentativo, o binômio pH e temperatura são amplamente estudados e considerados como fator de grande influência na atividade destas enzimas. As lipases produzidas por *Aspergillus niger* apresentam propriedades cinéticas e de estabilidade bastante diversificadas. São capazes de produzir lipases em valores de pH extremos, como pH de 1,5 ou em valores acima de pH neutro em pH 7,5-8,5 (DA SILVA, *et al.* 2008). Santos *et al.* (2013), relataram para a lipase livre de *A. niger*, obtida da FES de sementes de abóbora, pH ótimo de 4,0, maior estabilidade (atividade relativa acima de 80%) nos pHs 6,0 e 7,0, temperatura ótima de 37°C, porém maior estabilidade térmica à 30°C até 4h de incubação. Mahadik *et al.* (2002) obtiveram para lipase de *Aspergillus niger* atividade residual de 63%, em temperatura de 70°C em pH 5,5 até 5 h de incubação e atividade residual de 70% em pH 2,5, temperatura de 30°C, em 24 h de incubação.

Segundo Kapoor & Gupta, (2012) até o momento não foi descrita a estrutura tri-dimensional, para todas lipases inclusive a da lipase de *A. niger*. Para exemplificar a estrutura tri-dimensional de um fungo, na Figura 2 é apresentada a estrutura de raios-X da lipase de *Rhizomucor-miehei*.

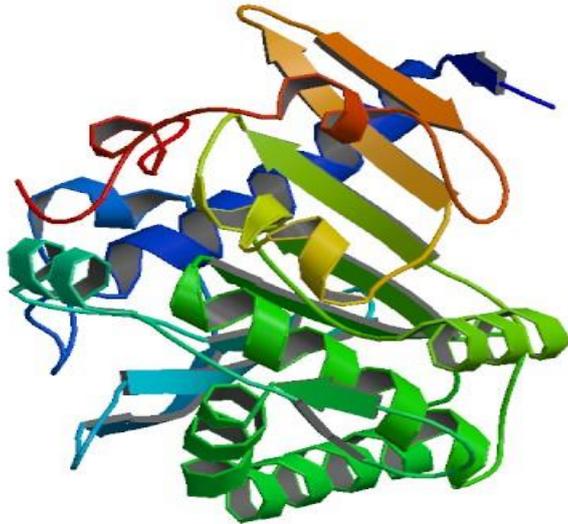


Figura 2: Estrutura molecular de lipase fúngica de *Rhizomucor-miehei* (disponível: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1TGL>, acesso 29/01/2013).

O sítio catalítico das lipases é composto por uma tríade catalítica (G-X1-S-X2-G, onde G= glicina; S= Serina; X1= histidina e X2= ácido glutâmico ou aspártico), semelhante à observada primeiramente em serina-proteases. O nucleófilo catalítico (serina) é responsável pela catálise e está unido por ligações de hidrogênio a um resíduo de histidina; o resíduo carboxilado ligado ao mesmo resíduo de histidina poderá ser um aspartato ou glutamato (Jaeger *et al.*, 1994). No sítio ativo da lipase (Figura 3) observamos que o resíduo nucleofílico serina está localizado no C-terminal da fita  $\beta$ -5 de um pentapeptídeo GX SXG altamente conservado, formando uma característica principal “ $\beta$  em torno de  $\alpha$ ,” designada como a cavidade nucleofílica.

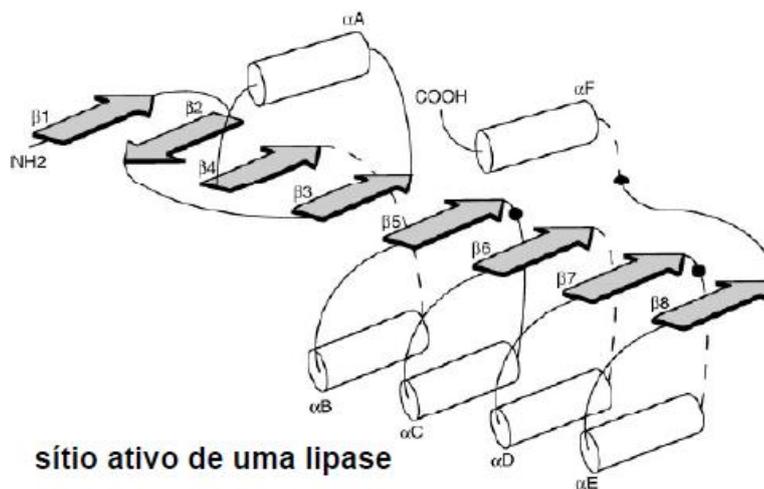


Figura 3: Representação esquemática do sítio ativo de uma lipase (NELSON & COX, 2006).

### 2.3 - Métodos de imobilização de lipases

O processo de imobilização consiste em restringir o movimento da enzima, por meio do seu confinamento numa certa região (suporte), com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser usada repetida e continuamente em reatores contínuos, com fácil separação de catalisador-produto e aumento da produtividade do processo (SEBRÃO, *et al.* 2007; PAULA, *et al.* 2008). Além dessas vantagens, podemos destacar também melhor estabilidade operacional, recuperação simples do biocatalisador e dos produtos além da possibilidade de operação contínua. Contudo, diversos estudos ainda se faz necessário para diferentes sistemas imobilizados com o objetivo de aplicação industrial (YANG, *et al.* 2010).

O desenvolvimento de técnicas de imobilização são importantes por proporcionar a reutilização de enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos. O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo em comparação com a sua forma livre. Espera-se que não ocorra alteração estrutural, bem como modificações no sítio ativo, após o processo de imobilização, mas não existem regras dando garantias que o processo de imobilização irá aumentar a atividade e estabilidade da enzima (SOARES *et al.* 1999). Alguns fatores devem ser apresentados, não como desvantagens, mas como pontos a serem evitados, dentre eles estão: perda da atividade durante o processo de imobilização, efeitos difusionais (transferência de massa, características físicas do biocatalisador e do fluido e estabilidade do biocatalisador (BON, *et al.* 2008).

De modo geral, não há uma técnica de imobilização que possa ser aplicada para qualquer enzima. A escolha do melhor método se dá por tentativa e erro, até que um sistema satisfatório tenha sido desenvolvido. Vale lembrar que a enzima deve ser estável durante o processo de imobilização (HANEFELD, *et al.* 2009).

O tipo de suporte, bem como o método de imobilização influencia a atividade e estabilidade operacional de lipases imobilizadas (MATEO *et al.* 2007; OZMEN *et al.* 2009). As lipases são imobilizadas em vários suportes, por vários métodos, tais como: adsorção (física ou iônica), ligação covalente e encapsulação em matriz polimérica ou em membrana (YILMAZ *et al.* 2009; MATEO *et al.* 2003; GUIBAN, 2006).

A Figura 4 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas (DALLA VECHIA, 2004).

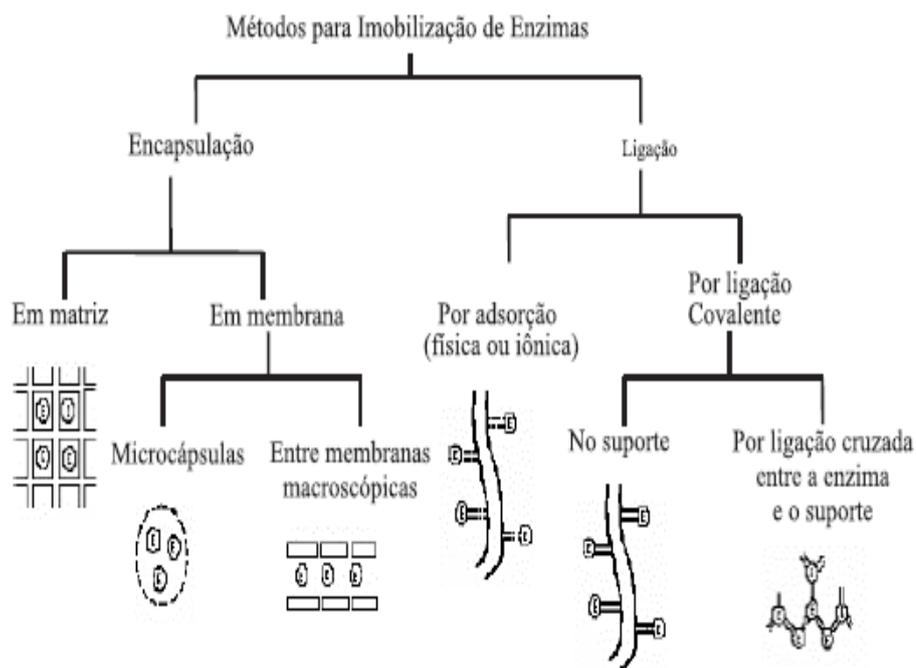


Figura 4: Representação esquemática dos métodos para imobilização de enzimas (DALLA VECHIA, 2004).

Os métodos de imobilização mais comumente encontrados são os que estão descritos abaixo:

### 2.3.1 - Adsorção

A enzima imobilizada por adsorção física em um suporte sólido envolve ligações de baixa energia, tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser usados por este método e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo. O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, dependem, do tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros (VILLENEUVE *et al.* 2000).

Este método de imobilização tem como vantagens: ser um dos métodos mais simples, sendo por isso um dos mais utilizados, causar pouca ou nenhuma inativação da enzima imobilizada e suas desvantagens são: enzimas são fracamente ligadas ao suporte e de dessorção da enzima resultando em mudanças de temperatura, pH e força iônica. Outra desvantagem é a adsorção não específica de outras proteínas ou substâncias (SASSOLAS, *et al.* 2012).

Santos, *et al.* (2013), imobilizaram lipase de *A. niger* (obtida da FES de sementes de abóbora) por adsorção, usando sílica obtida pela técnica sol-gel e obtiveram rendimento de

imobilização de 81,88%. Kharrat, *et al.* (2011) imobilizaram lipase de *Rhizopus oryzae* por adsorção física usando sílica aerogel como suporte. Contesini, *et al.* (2010), relataram a imobilização por adsorção de *A. niger*, usando como suporte uma membrana de polipropileno, onde foi realizada a hidrólise de manteiga. Em comparação com outras proteínas presentes no extrato bruto, a lipase foi seletivamente adsorvida sobre o suporte. Lipase de *Aspergillus niger* foi imobilizada por adsorção tendo celite como suporte e obteve-se rendimento de (26%) para forma imobilizada na síntese de éster de ibuprofeno e o rendimento foi 1,8 vezes maior que para a enzima livre (14,6%), segundo Da Silva, *et al.* (2008).

### **2.3.2 - Ligação covalente no suporte ou ligação Cruzada**

A imobilização de lipases por ligação covalente envolve modificação química de um dos aminoácidos das enzimas devido à ligação covalente entre as proteínas (cross-linking) ou entre as proteínas de apoio (MIGNEAULT *et al.* 2004).

Este tipo de união é muito estável, uma vez que os átomos que unem o suporte e a enzima compartilham pares de elétrons. Este compartilhamento compreende a ligação entre grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos da enzima (NH<sub>2</sub> da lisina e arginina, CO<sub>2</sub>H do ácido aspártico ou glutâmico; OH da serina ou tionina e grupo SH da cisteína) (CARDOSO *et al.* 2009). Apesar de apresentar um tipo de união bastante estável, às vezes, é necessário fazer um pré-tratamento, podendo-se ocasionar mudanças na conformação da enzima, com eventuais perdas de sua atividade. A imobilização é feita em duas partes: na primeira, o suporte é tratado com um reativo que ativa alguns de seus grupos funcionais; em seguida, o suporte ativado é misturado com a enzima e ambos se unem (ORDÓÑEZ *et al.* 2005).

Este método é atraente devido a sua simplicidade e por apresentar forte ligação química. Em contrapartida apresenta como desvantagens: possíveis perdas de atividade devido a distorções de conformação da enzima ativa e alterações químicas do sítio ativo (SASSOLAS *et al.* 2012).

Chatterjee *et al.* (2009) imobilizaram lipase de *Aspergillus sp.* em fibras de seda através de ligação cruzada para a hidrólise de óleo de girassol. A atividade da lipase foi baixa no sistema bifásico óleo/ água, mas aumentou com emulsificação do óleo de girassol em um meio contendo uma solução com biossurfactante. A lipase imobilizada pôde ser reutilizada para a hidrólise de óleo de girassol via biossurfactante até o terceiro ciclo de reação.

### **2.3.3 - Encapsulação**

A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulação consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste sistema cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos se difundem. A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador (VILLENEUVE *et al.* 2000).

O procedimento mais comum utilizado para a encapsulação envolve a união de dois ou mais polímeros, em especial polissacarídeos, como alginatos e carragenanas que são encontrados em algas marinhas. A associação da quitosana com alginato de cálcio leva à formação de cápsulas, que são utilizadas para encapsulação de enzimas (DALLA VECHIA, 2004). Contesini *et al.* (2010) também relataram o uso de polímeros naturais diferentes como alginatos e pectina de baixa metoxilação para encapsular lipases, bem como polímeros sintéticos, tais como álcool polivinílico e poli (óxido de etileno).

Ellaiah *et al.* (2004) estudaram diferentes suportes para a imobilização de *A. niger* para a produção de lipase. Os autores observaram que a atividade enzimática de células inteiras imobilizada em gel de poliacrilamida  $\kappa$ -carragenana foi baixa em comparação com aqueles imobilizados em alginato.

A imobilização de uma lipase comercial de *Aspergillus sp.* por encapsulação em matriz hidrofóbica sol-gel, demonstrou uma melhor atividade da lipase imobilizada em comparação com lipase comercialmente disponíveis na forma livre (REETZ *et al.* 1996). Em outro trabalho, Reetz *et al.* (2003), relataram que o processo de encapsulação em matriz sol-gel tem mostrado ser uma forma particularmente fácil e eficaz para imobilizar enzimas e as lipases imobilizadas por sol-gel foram excelentes catalisadores na resolução cinética de compostos quirais.

## **2.4 - Suportes para imobilização de enzimas**

As propriedades das preparações de enzimas imobilizadas são influenciadas pelas propriedades da enzima e do material do suporte. A interação entre esses dois componentes proporciona um derivado imobilizado com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específica. Os parâmetros que devem ser considerados na interação entre a enzima e o suporte são: pH, temperatura, força iônica, agitação, pressão, liberação de substrato com remoção de produtos. Estes fatores influenciam no desempenho do suporte, conformação da enzima, velocidade de transferência de massa e, portanto, afetam o comportamento da enzima imobilizada (BON *et al.* 2008).

Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos, orgânicos ou inorgânicos com diferentes características como: tamanho, forma e densidade têm sido estudadas para a imobilização de lipase. Quando um suporte é selecionado, devem ser avaliadas suas características físicas e químicas, bem como seu poder de regeneração (GOMES, *et al.* 2006). Com exceção da enzima, a escolha adequada do suporte pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, bem como uma seleção inadequada pode afetar o desempenho global do sistema (BON, *et al.* 2008).

De acordo com sua morfologia os suportes podem ser divididos em (GUISAN, 2006):

- Porosos: tem como ponto positivo grande área superficial, pois a enzima se distribui tanto na face externa, quanto interna dos poros.
- Não-porosos: sua principal vantagem é a acomodação das moléculas de enzima apenas na superfície externa, facilitando a interação da enzima com o substrato. Apresenta como ponto negativo uma pequena área superficial.

De acordo com sua composição os suportes são classificados em (SCHMIDELL *et al.* 2007; PAULA *et al.* 2008):

#### 1- Orgânicos:

- Naturais: alginato (ELLAIAH *et al.* 2004); agarose (RODRIGUES *et al.* 2008), quitosana (HUANG *et al.* 2007; TAN *et al.* 2002; YE *et al.* 2005; RODRIGUES *et al.*, 2008), seda (CHEN *et al.* 2010);
- Sintéticos: nylon (PAHJANI *et al.* 2008), poliacrilamida (ELLAIAH, *et al.* 2004), polivinílicos (KARTAL, *et al.* 2009; OZTURK & KILINC, 2010).

#### 2- Inorgânicos:

- Minerais: bentonita (YESILOGLU, 2005; SEDAGHAT *et al.* 2009), pedra-pomes (PAZARLIOGLU & TELEFONCU, 2005).

- Fabricados: cerâmica (IDA *et al.* 2000; SHELDON & SMALL, 2005), sílica (SOARES, 2000) obtida pela técnica sol-gel, alumina (COSTA *et al.* 2001; YANG *et al.* 2007).

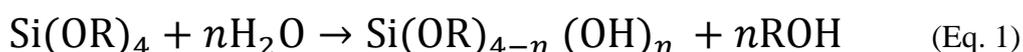
Na sua maioria, utilizam-se suportes inorgânicos porosos de alto custo devido, em parte, a sua resistência ao ataque microbiano e grande área superficial disponível para ligação com a enzima. Entretanto, várias substâncias orgânicas, tais como celulose e seus derivados, são também dotadas de grande estabilidade física e resistência ao ataque por microrganismos (GOMES, *et al.* 2006).

## 2.5 - Imobilização em matriz hidrofóbica sol-gel

Os processos envolvendo matrizes sol-gel estão ganhando uma importância crescente como suporte sólido para a imobilização de biomoléculas a ser usado em biocatálise, biossensores e aplicações biomédicas, oferecendo uma alternativa à tradicional tecnologia de polímeros (PIROZZI *et al.* 2009).

Entre os métodos de imobilização disponíveis, a encapsulação de enzimas em uma matriz de polímero inorgânico, tem recebido atenção considerável, nos últimos anos (UYANIK *et al.* 2011).

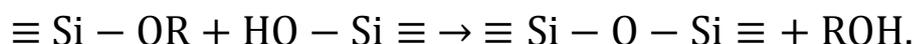
O processo sol-gel envolve em primeira etapa, como descrito na Eq. (1), a hidrólise de um metal de baixo peso molecular, precursor alcóxido como tetrametoxissilano (TMOS), ou tetraetoxissilano (TEOS) na presença de água em pH ácido (ou alcalino), o que resulta na formação de grupos reativos do tipo silanol. (Si-OH) (SASSOLAS *et al.* 2012).



Na segunda etapa, como descrito na Eq. (2), a reação de condensação entre grupos silanol em presença de grupos alcalinos (ou ácidos) resulta na formação de polímeros siloxano (Si-O-Si), formando uma matriz na qual uma enzima pode ser aprisionada com sucesso (SASSOLAS *et al.* 2012).



Ou



Este processo envolve diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, entre outros. Estas variáveis determinam as características finais dos materiais, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação e homogeneidade do produto (PAULA *et al.* 2008).

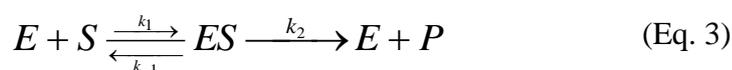
Os óxidos de metais, citados acima são em sua maioria, não tóxicos, inertes, quimicamente e termicamente estáveis. Assim, eles têm amplas aplicações onde biocompatibilidade e os requisitos de estabilidade térmica são essenciais (PIROZZI *et al.* 2009). Em comparação com outras matrizes, o processo sol-gel tem muitas vantagens, tais como: estabilização da estrutura terciária da proteína devido à formação de rede de gel forte, rigidez física, química, inércia biológica, estabilidade térmica, tem alta relação de volume/superfície e são altamente porosos. Em contrapartida, por serem porosos estas matrizes podem sofrer encolhimento durante o processo de secagem, podendo levar a quebra do material e colapso de poros (SOARES *et al.* 2006). Algumas pesquisas relatam o uso de aditivos para diminuir as tensões internas e o encolhimento dos materiais, possibilitando também melhora nas propriedades mecânicas. Como exemplo, temos glicerol como aditivo químico usado no controle de secagem, sendo considerada uma possibilidade interessante (DESIMONE *et al.* 2008). Outros polímeros naturais, tais como quitosana ou polietilenoglicol também podem ser utilizados para prevenir craqueamento (CHOI *et al.* 2005).

Soares *et al.* (2006) e Pinheiro *et al.* (2008) imobilizaram lipase de *Candida rugosa* em matriz sol-gel por encapsulação utilizando precursores como tetraetoxissilano (TEOS), na presença de polietilenoglicol. Da Silva *et al.* (2008), imobilizaram lipase de *Aspergillus niger* pela técnica sol-gel utilizando método de deposição em celite. Pirozzi *et al.* (2009) imobilizaram lipase de *Rhizopus oryzae* por encapsulação pela técnica sol-gel. Yilmaz *et al.* (2011) imobilizaram lipase de *C. rugosa* por encapsulação em matriz sol-gel utilizando tetraetoxissilano (TEOS) e octiltriatoxisilano (OTES). Lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada por encapsulação utilizando matriz sol-gel como suporte (UYANIK *et al.* 2011).

## 2.6 - Cinética enzimática

Na cinética enzimática estuda-se a velocidade de uma reação em presença de uma molécula de enzima. Os fatores principais que podem influenciar a velocidade de uma reação são: a concentração de substrato (s), temperatura, pH do meio e presença de moléculas de ligante que podem ser ativadores ou inibidores (BON *et al.* 2008).

Na abordagem o estudo das velocidades de reação enzimática, considera-se, em geral, a cinética de uma reação simples, de um único reagente (substrato) com formação de um produto único, reação à qual se aplica o modelo de Michaelis-Menten, conforme mostrado esquematicamente pela (Eq. 3). Este modelo admite que: a catálise ocorra por meio da formação rápida e reversível de um complexo (ES) entre enzima (E) e substrato (S). Em seguida, (ES) sofre decomposição unimolecular para formar um produto (P) e E é regenerado para reutilização em um novo ciclo. O passo de formação de produto (P) é irreversível, (BON *et al.* 2008).



Onde  $k_1$  é a constante de formação do complexo ES;  $k_{-1}$  é a constante de dissociação e  $k_2$  é a constante de formação do produto (TZAFRIRI & EDELMAN, 2007; CALDER & SIEGEL, 2008; YI & LIU, 2010).

Com o aumento da concentração do substrato (S), a atividade catalítica da enzima aumenta de forma hiperbólica, aproximando-se de uma velocidade máxima ( $V_{\text{máx}}$ ) específica para cada enzima, onde praticamente toda enzima está na forma do complexo ES (TZAFRIRI & EDELMAN, 2007; CARVALHO *et al.*, 2010; YI & LIU, 2010). A concentração do substrato que produz metade da velocidade máxima é a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), que é específica para cada enzima. A equação de Michaelis-Menten (Eq. 4) está descrita a seguir (GOLICNIK, 2010).

$$v = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq. 4})$$

$v$  = velocidade inicial

Em estudos de cinética enzimática, determinam-se os valores de velocidades iniciais correspondentes a diferentes concentrações iniciais de substrato, de acordo com uma representação de seção de hipérbole correspondente à equação de Michaelis-Menten. A fim de calcular o valor de  $V_{\text{máx}}$  e  $K_m$  utilizam-se modelos de linearização da equação de Michaelis-Menten. As três representações lineares mais utilizadas foram descritas por Woolf (BON *et al.* 2008), mas são conhecidas pelos nomes dos bioquímicos que as utilizaram para tratar seus resultados: Lineweaver e Burk (1934); Eadie (1942) e Hofstee (1952); Hanes (1932).

A equação 5 representa a linearização de Lineweaver-Burk, sem dúvida a mais popular entre os bioquímicos, onde se faz a inversão da equação de Michaelis-Menten.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{máx}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}} \quad (\text{Eq. 5})$$

### **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 – Enzima**

A lipase utilizada neste trabalho foi obtida através de fermentação em estado sólido de farinha de semente de abóbora, enzima esta, produzida e fornecida por SANTOS *et al.* (2012). A lipase parcialmente purificada foi armazenada na forma liofilizada sob refrigeração (4°C), para posteriormente passar pelo processo de imobilização por encapsulação. A sílica usada como suporte foi obtida pela técnica sol-gel (SOARES *et al.* 2004a) com granulometria de 200 mesh e o processo de imobilização por encapsulação foi realizado no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (Aracaju, SE).

#### **3.2 - Reagentes Químicos**

O tetraetoxissilano, precursor silano (TEOS) foi adquirido por Across Organic (New Jersey-USA). Etanol (mínimo 99%), amônia (mínimo 28%), ácido clorídrico (mínimo 36%), hexano, polietilenglicol (PEG-1500), acetona e goma arábica foram adquiridos pela Synth. Azeite de oliva foi comprado em um mercado local. Os outros produtos químicos utilizados eram de grau analítico e foram utilizados como recebidos.

#### **3.3 - Metodologia**

##### **3.3.1- Imobilização de lipase por encapsulação em matriz sol-gel**

A imobilização por encapsulação da lipase foi realizada segundo metodologia sob patente de N° PI0306829-3. Método de encapsulação de lipase em matriz hidrofóbica preparada por meio da técnica sol-gel e que emprega tetraetilortossilicato (TEOS) como precursor (2003). O TEOS, por ser altamente higroscópico foi manipulado, durante a preparação das soluções (diluição), em ambiente de atmosfera controlada, neste caso atmosfera inerte de nitrogênio.

O TEOS foi diluído (30 mL) em 36 mL de álcool etílico absoluto em atmosfera inerte e a solução foi transferida para um balão de três bocas, onde foi acoplado em um

condensador de refluxo, sendo o sistema mantido sob agitação constante e através de banho-maria a temperatura foi mantida a 35°C. Após um período de 5 minutos o sistema recebeu uma solução de ácido clorídrico (0,22 mL) diluídos em 5 mL de água ultra pura (solução pré-hidrolisante), lentamente gotejada pelo funil de adição. Após receber completamente a solução pré-hidrolisante, o sistema ficou sob agitação, à temperatura de 35°C, durante 90 min. Em seguida foi adicionada 2,70g da enzima (lipase) dissolvida em 10 mL de água ultra pura juntamente com o aditivo (solução de polietilenoglicol (PEG-1500), 4% p/v). Por último, foi adicionado lentamente pelo funil de adição, 1 mL de hidróxido de amônio (28%) diluído em 6mL de etanol absoluto (solução hidrolisante, 1:6) e a solução permaneceu em repouso em temperatura de 35°C durante 60min. O material foi lacrado e mantido no balão de três bocas por 24h, em condições estáticas para policondensação completo (SOARES *et al.* 2006).

O volume de gel foi lavado com hexano (60 mL) e acetona (20 mL), e seco sob vácuo à temperatura ambiente durante 72 h. Os filtrados foram analisados quanto à atividade enzimática conforme equação 6 (SOARES *et al.* 1999).

### **3.3.2 - Determinação da Atividade Hidrolítica**

A atividade enzimática da lipase pré-purificada e do biocatalisador imobilizado (BI) foram determinados pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com o procedimento descrito por Soares *et al.* (1999), com algumas modificações. O substrato foi preparado utilizando-se azeite de oliva (50 mL) e 50 mL de solução de goma arábica 7% (p/v). Para o biocatalisador imobilizado, foram adicionados em frascos erlenmeyeres de 125 mL: 5 mL do substrato, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e o biocatalisador imobilizado (100 mg). Para a lipase parcialmente purificada foram adicionados 5 mL do substrato, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e a enzima livre (100mg). Os erlenmeyers foram incubados a 37°C por 10 min., em banho termostatizado com agitação para o biocatalisador imobilizado e para a enzima livre o tempo de reação foi de 5 min. Após este tempo a reação foi paralisada pela adição de solução acetanólica (2 mL) da mistura de acetona, etanol e água (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,04 M, utilizando fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por min. de reação, nas condições de ensaio (37°C/pH 7,0/150 rpm). As atividades são expressas em (1U/g=1µmol/min). Para cada análise de atividade foi preparado um branco (controle).

Para a determinação da atividade da lipase parcialmente purificada e do biocatalisador imobilizado foi utilizada a equação 6 (SOARES *et al.* 1999).

$$Atividade(U / g) = \frac{((V_a - V_b) \times N \times 10^3)}{m \times t} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde:

$V_a$  = volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL);

$V_b$  = volume de KOH gasto na titulação do controle (mL);

N = normalidade da solução de KOH;

t = tempo de reação (minutos);

m = massa de enzima usada na reação (g).

A atividade hidrolítica é expressa em termos de atividade relativa (%), que é a divisão da atividade hidrolítica pela máxima atividade hidrolítica obtida.

### 3.3.3 - Rendimento de imobilização (%)

Para calcular o rendimento da imobilização do biocatalisador imobilizado, foi determinada a atividade enzimática segundo equação 6 (SOARES *et al.* 1999). O rendimento (%) da lipase imobilizada foi calculado conforme a equação 7, descrita por Soares *et al.* (1999):

$$\eta(\%) = \frac{U_s}{U_o} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

$U_s$  = unidade de atividade enzimática total presente no suporte

$U_o$  = unidade de atividade da enzima oferecida para imobilização

## 3.4 - Propriedades catalíticas da lipase na forma livre e imobilizada

### 3.4.1- Efeito de pH das lipases na forma livre e imobilizada

As atividades hidrolíticas das lipases tanto na forma livre quanto do biocatalisador imobilizado foram determinadas pelo método de hidrólise do azeite de oliva segundo Soares *et al.* (1999), descrito no ítem 3.3.2 em diferentes valores de pH. Para os pHs 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 utilizou-se o tampão citrato de sódio 0,1M; pH 6,0, 7,0, 8,0 usou-se tampão fosfato de sódio 0,1M; pH 9,0, 10,0, 11,0 usou-se tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M (MORITA,

2007). A faixa de pH onde a enzima apresentou atividade hidrolítica máxima foi usada como parâmetro para avaliar o efeito das temperaturas para as lipases livre e imobilizada.

### **3.4.2 - Efeito de temperatura das lipases na forma livre e imobilizada**

As atividades hidrolíticas da lipase na forma livre e do biocatalisador imobilizado foram determinadas em diferentes temperaturas de 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 70°C e 80°C e utilizou-se para a determinação a metodologia de hidrólise do azeite de oliva segundo Soares *et al.* (1999), descrito no item 3.3.2. A faixa de temperatura onde a enzima apresentou atividade hidrolítica máxima foi usada como parâmetro para se estudar a estabilidade da enzima em diferentes valores de pH.

### **3.4.3 - Estabilidade hidrolítica da lipase livre e imobilizada em diferentes pHs**

A determinação da estabilidade hidrolítica para o pH foi realizada através da reação de hidrólise, conforme descrito no item 3.3.2, utilizando três tampões com diferentes pHs. Para a enzima livre a reação de hidrólise foi realizada nos tampões pH 4,0, 6,0 e 8,0 e para o biocatalisador imobilizado utilizou-se tampões nos pHs 3,0, 6,0 e 8,0. Nos tempos de 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 min de incubação retirou-se uma amostra e determinou-se a atividade hidrolítica.

### **3.4.4 - Estabilidade hidrolítica da lipase livre e imobilizada em diferentes temperaturas**

A determinação da estabilidade hidrolítica para a temperatura foi realizada utilizando-se três temperaturas onde foram verificadas as melhores atividades hidrolíticas. As amostras contendo as lipases tanto na forma livre e imobilizada foram incubadas, no pH ótimo determinado no item 3.4.1, nas temperaturas de 37°C, 45°C e 60°C em banho-maria por um período de 4 h e durante esse tempo foram retiradas amostras para a determinação da atividade hidrolítica aos 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 minutos.

A constante de inativação térmica ( $kd$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), para a lipase na forma livre e imobilizada foram calculadas segundo equações 8 e 9, respectivamente (YANG *et al.* 2010).

$$A_{in} = A_{in0} \exp(-kd \cdot t) \quad (\text{Eq. 8})$$

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_d \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde:

$A_{in}$ : atividade residual após tratamento (U);

$A_{ino}$ : atividade enzimática inicial (U).

### **3.4.5 - Determinação dos parâmetros cinéticos para lipase livre e imobilizada**

Os parâmetros cinéticos  $V_{max}$  (velocidade máxima) e  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) foram determinados para a lipase livre e imobilizada, conforme (Eq. 4).

Os sistemas de reação foram preparados contendo ácidos graxos em concentrações variando de 37-2604 mM, obtidos a partir de emulsões contendo diferentes concentrações de azeite de oliva (1-70%). As atividades hidrolíticas das lipases livre e imobilizada foram determinadas de acordo com a metodologia descrita no ítem 3.3.2. Os valores aparentes de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram calculados por linearização segundo Lineweaver-Burk conforme (Eq. 5), utilizando-se programa Origin<sup>®</sup> 8.0.

### **3.4.6 - Estabilidade operacional da lipase imobilizada**

A estabilidade operacional do sistema imobilizado foi determinada em reações de hidrólise em lotes consecutivos com reutilização de lipase encapsulada de *Aspergillus niger*. Este processo foi realizado em todos os lotes, utilizando a mesma massa de biocatalisador imobilizado. Foram realizadas reações de hidrólise conforme ítem 3.3.2, num intervalo de 10 minutos entre as reações, para a enzima imobilizada por encapsulação em matriz sol-gel, à temperatura de 37°C e pH 3,0 (melhor pH da lipase imobilizada). A lipase encapsulada foi lavada com hexano, até remoção completa do substrato e utilizou-se a mesma enzima para o ciclo subsequente de hidrólise. Este procedimento se repetiu por vários ciclos.

## **4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo serão apresentados os resultados e discussão referentes ao rendimento de imobilização da lipase de *A. niger* imobilizada por encapsulação em matrizes hidrofóbicas obtidas pela técnica sol-gel, parâmetros bioquímicos, cinéticos e estabilidade operacional.

### **4.1 - Rendimento de imobilização da lipase encapsulada**

No processo de imobilização por encapsulação da lipase de *A. niger* obtida pela técnica sol-gel foi obtido rendimento de imobilização de 71,4%. O resultado foi obtido

partindo-se da atividade hidrolítica da lipase encapsulada de 338,47 U/g de biocatalisador imobilizado e atividade hidrolítica da enzima oferecida ao suporte de 473,88 U/g. O valor obtido foi superior ao obtido por Soares *et al.* (2004) os quais obtiveram rendimento máximo de imobilização de lipase de *Candida rugosa* em matriz sol-gel de 31,98 % usando PEG-1500 como aditivo e muito próximo ao obtido por Souza *et al.* (2012), os quais obtiveram rendimento de imobilização de 71% de lipase de *Bacillus* sp. ITP 001 em matriz sol-gel. Yilmaz, *et al.* (2011), obtiveram rendimento de imobilização de 100% de lipase de *Candida rugosa* em matriz sol-gel, porém a atividade hidrolítica de 95,1 U/g de suporte, foi inferior a obtida neste trabalho. Santos *et al.* (2013), obtiveram rendimento de imobilização de 81,88% da lipase de *A. niger* (obtida de FES de sementes de abóbora), imobilizada por adsorção em matriz hidrofóbica obtida pela técnica sol-gel. Não foi encontrado na literatura consultada relatos de encapsulação de lipase de *A. niger* obtida a partir de resíduo agrindustrial em matriz sol-gel.

#### **4.2 - Efeito de pH sobre a atividade da lipase livre e imobilizada**

O pH é considerado um dos parâmetros que mais influenciam a atividade enzimática. O efeito do pH sobre a atividade relativa da lipase livre e imobilizada foi determinado à 37°C na faixa de pH de 2,0 a 11,0 (Figura 5). A máxima atividade hidrolítica relativa da lipase livre foi em pH 4,0, tendo caráter ácido. A enzima livre manteve atividade relativa superior a 80% na faixa de pH entre 3,0 a 11,0, sendo a atividade mínima de 65% em pH 2,0. Mhetras *et al.*, (2009) também obteve lipase ácida de *Aspergillus niger*, cuja máxima atividade relativa foi em pH 2,5. A maioria das lipases de *Aspergillus spp* apresentaram pH ácido entre 5,0 e 6,0 (SAXENA *et al.* 2003; CONTESINI, *et al.*, 2010). Da Silva, *et al.* (2008), também obteve atividade relativa máxima em pH 6,0, caráter ácido, para lipase livre de *Aspergillus niger*.

A lipase imobilizada apresentou máxima atividade relativa (100%) em pH 3,0, mantendo-se com o valor acima de 80% na faixa de pH entre 3,0 a 6,0, a partir do pH 7,0 houve decréscimo na atividade relativa, chegando a 50% em pH 10,0 e atingindo 9% em pH 11,0. Este resultado foi diferente ao observado com a lipase de *Candida rugosa* encapsulada em matriz sol-gel, a qual apresentou máxima atividade relativa em pH 7,0 (UYANIK *et al.*, 2011), mas próximo ao observado por Yilmaz, *et al.* (2011), onde a lipase de *Candida rugosa*, imobilizada por encapsulação em matriz sol-gel, apresentou como pH ótimo 5,0. O pH depende principalmente do método de imobilização e da interação entre a enzima e o suporte. As diferenças observadas no comportamento do efeito de pH na enzima livre e imobilizada

estão relacionados com o processo de imobilização, o qual pode resultar em alterações conformacionais da enzima resultando em uma variação de pH ótimo (UYANIK, *et al.* 2011). O efeito do pH na enzima, também se deve as variações no estado de ionização dos componentes do sistema à medida que o pH varia (NELSON & COX, 2006).

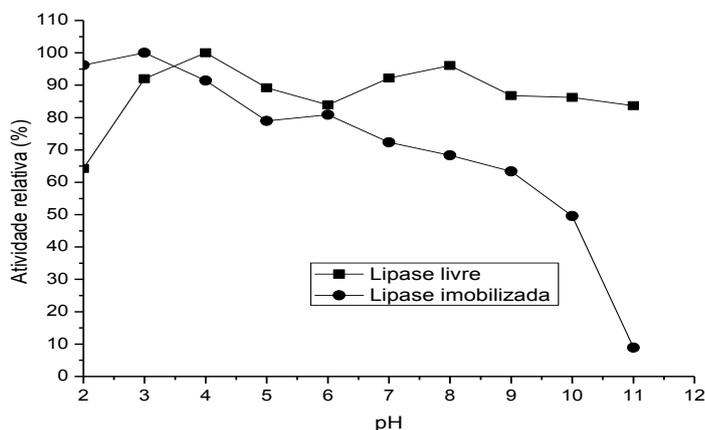


Figura 5: Efeito de pH na atividade relativa da lipase livre e imobilizada.

#### 4.3 - Efeito de temperatura sobre a atividade da lipase livre e imobilizada

O efeito da temperatura na atividade hidrolítica foi determinado em pH 4,0 (atividade máxima da enzima) para a lipase livre e em pH 3,0 (atividade máxima da enzima) para a lipase imobilizada (Figura 6), de acordo com os valores ótimos de pH determinados no item 4.2. A lipase livre apresentou máxima atividade relativa (100%), na temperatura ótima de 37°C, nas temperaturas subsequentes observou-se um decréscimo na atividade relativa, de 55% a 60°C, e o mínimo de 45% na temperatura de 80°C. Este resultado está de acordo com a literatura, a qual relata que lipases de *Aspergillus sp.* têm apresentado temperatura ótima entre 30°C e 60°C (CONTESINI *et al.* 2010; DA SILVA, *et al.* 2008; MHETRAS *et al.* 2009; ROMERO *et al.* 2012). Na avaliação do perfil de temperatura, notou-se a diminuição da atividade hidrolítica da enzima com aumento de temperatura (Figura 6). O aumento de temperatura do meio reacional, geralmente provoca um aumento da velocidade das reações, com isso aumentam as colisões entre as moléculas. Esse aumento de temperatura também eleva a velocidade da desativação térmica, provocando quebra de ligações da estrutura enzimática (pontes de hidrogênio, ligações dissulfeto e interações hidrofóbicas), com a consequente redução da atividade hidrolítica da enzima livre (BALCÃO *et al.*, 1996).

Por outro lado, a enzima imobilizada apresentou máxima atividade relativa (100%) na temperatura de 45°C, mantendo-se acima de 70% até a temperatura de 80°C. Este resultado foi superior ao obtido por Yilmaz *et al.* (2011), onde obtiveram para lipase de *Candida rugosa*, encapsulada em matriz sol-gel, atividade máxima em temperatura de 35°C e ao obtido por Da Silva, *et al.* (2008), onde a atividade máxima obtida foi em 40°C para lipase de *Aspergillus niger*.

Soares *et al.* (2006), obtiveram resultados superiores de atividade relativa máxima com a lipase de *Candida rugosa* encapsulada em matriz sol-gel, onde apresentou atividade relativa em torno de 70% na temperatura de 45°C, sendo a atividade relativa máxima (100%) em 65°C, seguido de diminuição para cerca de 60% na temperatura de 75°C.

Uyanik *et al.* (2011), apresentaram resultados similares com a lipase de *Candida rugosa* a qual apresentou temperatura ótima de 35°C e 45°C, na forma livre e encapsulada pela técnica sol-gel, respectivamente. O mesmo ocorreu com Chaubey *et al.* (2009) com a lipase de *Arthrobacter sp* encapsulada em matriz sol-gel a qual apresentou temperatura ótima entre 30 e 40°C. Em geral, as enzimas imobilizadas tem apresentado temperatura ótima maior do que aquelas obtidas pela enzima na forma livre. O processo de imobilização proporciona maior rigidez a estrutura molecular, além de aumentar a resistência da enzima à desnaturação térmica, devido à criação ou limitação conformacional entre a enzima e o suporte que ocorre como resultado da interação hidrofóbica entre os mesmos (SOARES *et al.* 2006; MATEO *et al.* 2007; UYANIK *et al.* 2011).

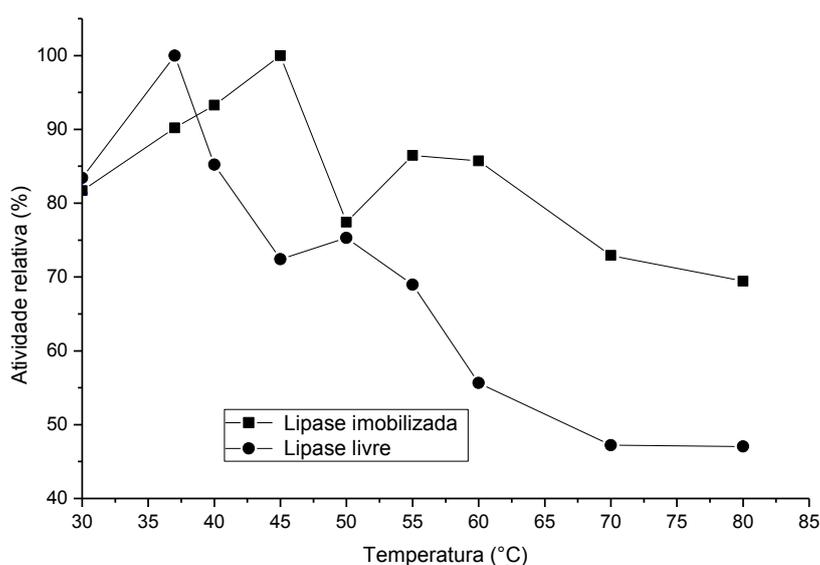


Figura 6: Efeito de temperatura sobre a atividade relativa da lipase livre e imobilizada.

#### 4.4 - Efeito do pH na estabilidade da lipase livre e imobilizada

A estabilidade da lipase livre e imobilizada em pH foi determinada em três diferentes pHs durante um período de incubação em banho-maria por 240 minutos (4h) a 37°C. A enzima livre manteve a atividade relativa acima de 75% até 210 min (3,5h) de incubação nos pHs 4,0, 6,0 e 8,0. Apesar do pH ótimo da enzima livre ser 4,0, a maior estabilidade da enzima foi em pH 6,0 (atividade relativa em torno de 85% após 240 min de incubação) (Figure 7). Essa diferença observada entre o pH ótimo e a estabilidade em pH, também foi obtida por Mhetras *et al.*, (2009), cuja lipase de *Aspergillus niger* foi mais ativa em pH 2,5 e mais estável em pH entre 8,0 e 11,0 durante cinco dias de incubação e Mahadik *et al.* (2002) relatou para a lipase de *Aspergillus niger* pH ótimo de 2,5 a 3,0 e maior estabilidade em pH 7,0 após 24 h de incubação.

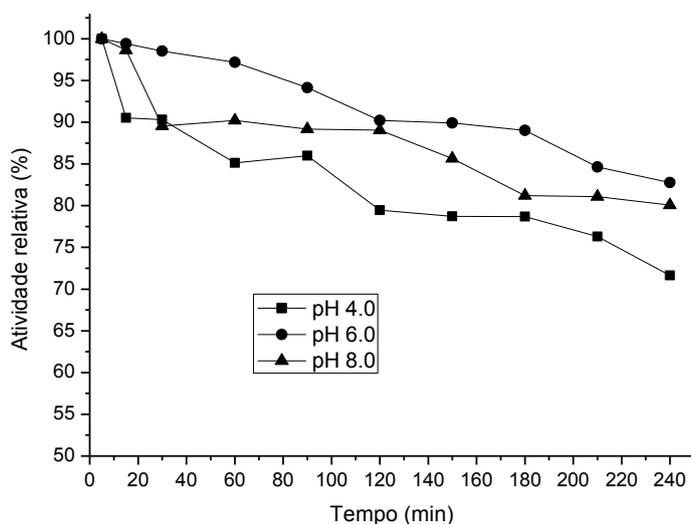


Figura 7: Efeito do pH na estabilidade da lipase livre *A. niger*.

A lipase imobilizada pelo método de encapsulação apresentou atividade relativa acima de 70% nos pHs de 3,0, 6,0 e 8,0 até 210 min (3,5 h) de incubação. Após este tempo, apenas a lipase em pH 6,0 manteve-se com atividade relativa de 75%, nos demais pHs 3,0 e 8,0 houve queda na atividade relativa para 45% e 65%, respectivamente (Figura 8). O biocatalisador imobilizado, apesar do pH ótimo ser 3,0, a maior estabilidade foi em pH 6,0, similar à enzima livre. Kharrat, *et al.* (2011) relatou para a lipase de *Rhizopus oryzae* adsorvida em sílica aerogel, atividade relativa acima de 60% em pH de 5,0 a 12,0 apenas em 1h de incubação,

neste trabalho a lipase de *Aspergillus niger* apresentou elevada atividade relativa após um período maior de incubação (3,5 h de incubação).

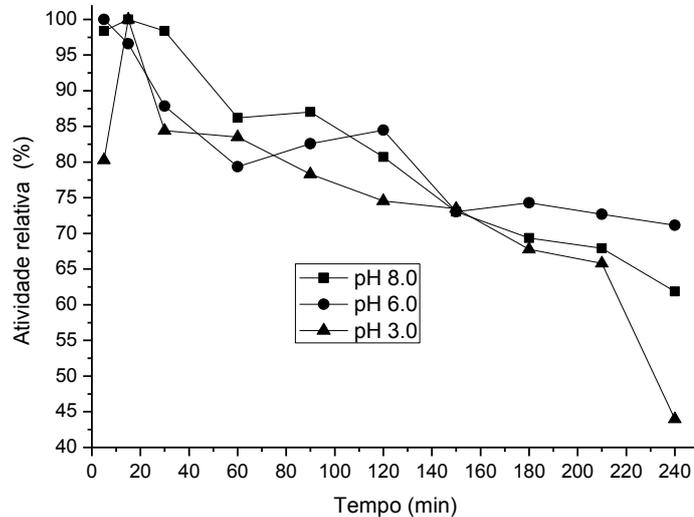


Figura 8: Efeito do pH na estabilidade da lipase de *A. niger* imobilizada por encapsulação em matrizes hidrofóbicas sol-gel.

#### 4.5 - Estabilidade térmica da lipase livre e imobilizada pelo método de encapsulação

A estabilidade térmica da lipase livre e imobilizada foi determinada em pH 4,0 (pH ótimo) e 3,0 (pH ótimo), conforme definido no item 4.2, nas temperaturas de 37°C, 45°C e 60°C durante 240 min de incubação. A Figura 9 representa a atividade relativa (%) para a lipase livre em cada temperatura durante o tempo de incubação.

A atividade relativa da lipase livre manteve-se acima de 80% em todas as temperaturas testadas até 120 min de incubação. Em 240 min de incubação, as atividades relativas foram cerca de 83%, 70% e 60% nas temperaturas de 37°C, 45°C e 60°C, respectivamente. A enzima livre apresentou maior estabilidade na temperatura de 37°C. Este resultado está de acordo com a literatura, visto que lipases fúngicas tem sido relatadas mais estáveis em temperaturas entre 35°C a 50°C (HIOL *et al.* 2000; MAHADIK *et al.* 2002; MHETRAS *et al.* 2009; PIROZZI *et al.* 2009).

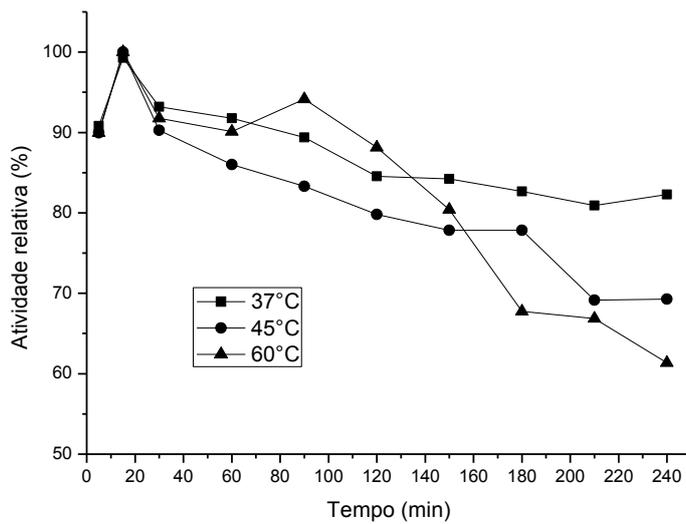


Figura 9: Estabilidade térmica da lipase livre.

Por outro lado, o biocatalisador imobilizado apresentou maior estabilidade térmica que a enzima livre, mantendo a atividade relativa em torno de 85% em todas as temperaturas até 120 min de incubação como é mostrado na Figura 10. Após este tempo a atividade relativa diminuiu atingindo aproximadamente 83%, 75% e 65% nas temperaturas de 45°C, 37°C e 60°C, respectivamente em 240 min de incubação.

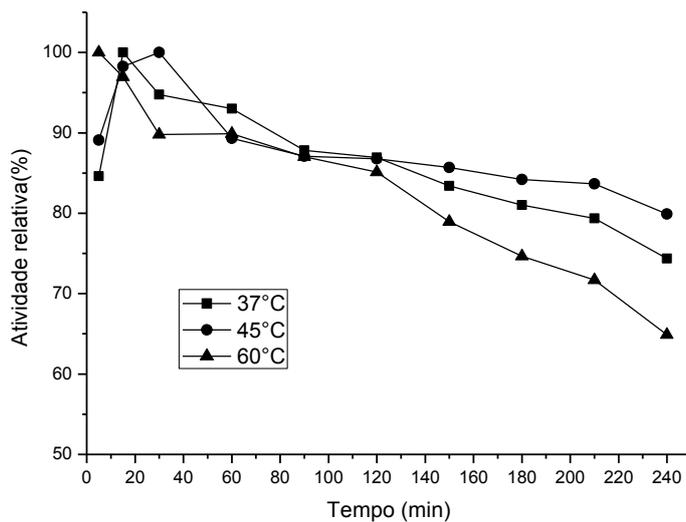


Figura 10: Estabilidade térmica da lipase imobilizada por encapsulação.

A lipase de *Aspergillus niger* imobilizada por encapsulada em matrizes hidrofóbicas sol-gel apresentou maior estabilidade térmica do que a lipase de *Candida rugosa* encapsulada pela técnica sol-gel utilizada por Yilmaz *et al.* (2011), a qual foi incubada a 60°C e atingiu valor próximo a zero em 100 min de incubação e a utilizada por Soares *et al.* (2006), a qual também apresentaram atividade relativa próxima de zero, quando incubada à temperatura de 60°C durante 240min. Zheng *et al.* (2012), determinou a estabilidade térmica da lipase imobilizada de *Candida rugosa* em 50 e 60°C, tendo sílica como suporte e foi observado que a atividade diminuiu de forma mais lenta para a forma imobilizada em relação à livre nas duas temperaturas estudadas.

Em geral o método de encapsulação promove maior estabilidade térmica às lipases imobilizadas do que a enzima na forma livre. Isto ocorre devido a maior rigidez da estrutura molecular que o método de encapsulação proporciona, além de aumentar a resistência da enzima à desnaturação térmica, devido à criação ou limitação conformacional entre a enzima e o suporte (SOARES *et al.* 2006; MATEO *et al.* 2007; UYANIK *et al.* 2011).

A partir desses dados, foram calculadas a constante de inativação térmica ( $K_d$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), para a lipase livre e imobilizada. Na Tabela 1 estão demonstrados os resultados das constantes de inativação térmica ( $K_d$ ) e o tempo de meia-vida da lipase livre e imobilizada, nas temperaturas de 37°C, 45°C e 60°C, calculados de acordo com as equações (8) e (9). O tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial da enzima (SIMÕES *et al.* 2011).

O tempo de meia-vida para a lipase imobilizada foi maior do que os obtidos pela lipase livre nas temperaturas de 45°C e 60°C e menor na temperatura de 37°C. O tempo de meia-vida para o biocatalisador imobilizado na temperatura de 45°C (13,6 horas) é de aproximadamente 95% maior do que para enzima livre (7,0 horas) e aproximadamente 50% maior para lipase encapsulada na temperatura de 60°C. Este resultado sugere que a estabilidade térmica da lipase imobilizada por encapsulação nas temperaturas mais altas é maior do que da enzima livre, comprovando o sucesso do método de imobilização. A lipase livre e imobilizada de *Aspergillus niger* em matriz sol-gel apresentou maiores estabilidade térmica e tempo de meia-vida do que a lipase de *Candida antarctica* imobilizada covalentemente em matriz sol-gel ( $k_d= 0,36 \text{ h}^{-1}$  e  $t_{1/2}= 1,9 \text{ h}$  a 40 °C e  $k_d=0,5 \text{ h}^{-1}$  e  $t_{1/2}=1,38$  a 60 °C) (YANG *et al.* 2010).

**Tabela 1:** Constante de inativação térmica e tempo de meia-vida da lipase livre e imobilizada em diferentes temperaturas por 4 h.

Temperatura (°C)	Lipase livre		Lipase imobilizada	
	$k_d$ (h <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (h)	$k_d$ (h <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (h)
37	0,053	13,07	0,07	9,9
45	0,099	7,00	0,051	13,6
60	0,140	5,00	0,094	7,40

#### 4.6 - Estabilidade operacional da lipase imobilizada

Para aplicações em larga escala de uma enzima, a reutilização do biocatalisador imobilizado é de grande importância em termos de economia de processo. A lipase encapsulada foi reutilizada repetidamente em tampão acetato de sódio pH 3,0 em temperatura de 37°C, onde sua atividade hidrolítica foi determinada através do método de hidrólise do azeite de oliva conforme item 3.3.2. Para os primeiros quatro ciclos de reutilização, a atividade relativa ficou acima de 80%, mantendo-se acima de 50% após seis ciclos de reutilização (Figure 11). A lipase de *Aspergillus niger* imobilizada por encapsulação em matriz sol-gel apresentou maior estabilidade operacional do que a lipase de *Bacillus sp* ITP-001 imobilizada por encapsulação a partir da técnica sol-gel a qual apresentou atividade relativa de 50% até 2 ciclos de reutilização (SOUZA, *et al.* 2012).

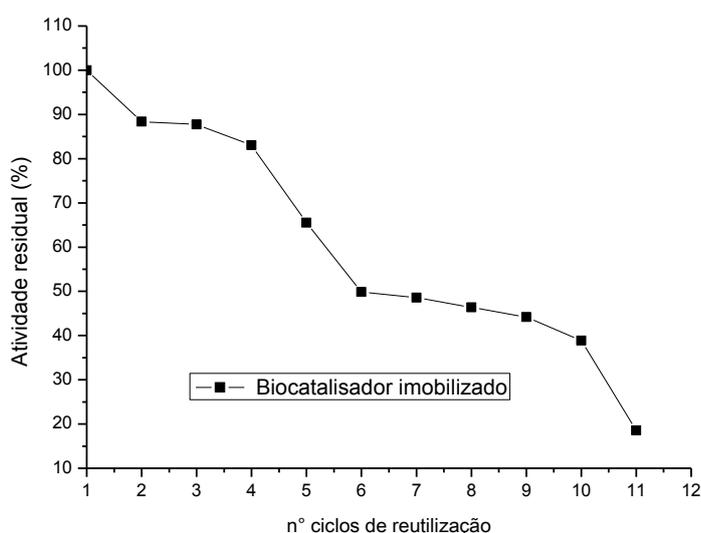


Figura 11: Atividade residual (%) da lipase de *Aspergillus niger* imobilizada por encapsulação em sol-gel em função do n° de ciclos de reutilização.

#### 4.7 Parâmetros cinéticos da lipase livre e imobilizada por encapsulação

Os parâmetros cinéticos foram determinados pelo método de hidrólise de azeite de oliva, conforme item 3.3.2, à 37°C em pH 4,0 para lipase livre e pH 3,0 para lipase imobilizada onde foram usados para os experimentos 100mg de lipase livre ou imobilizada em cada reação. A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima de reação ( $V_{m\acute{a}x}$ ) tanto da lipase livre como da imobilizada foram calculados segundo linearização de Lineweaver-Burk (Tabela 2). Para constante de Michaelis ( $K_m$ ) sabe-se que os valores elevados significam baixa afinidade pelo substrato, ou seja, é necessária maior concentração de substrato para atingir a metade da atividade máxima (GUPTA *et al.* 2008). O maior valor de  $K_m$  da enzima encapsulada (57,05 mM) em relação à enzima livre (45,38 mM) indicou uma alteração na afinidade da enzima com o substrato devido ao processo de imobilização na matriz sol-gel, o que provavelmente ocasionou limitações de transferência de massa (YANG *et al.*, 2010). Comportamento diferenciado foi observado por Soares *et al.* (2006), os quais obtiveram para a lipase de *Candida rugosa* encapsulada em matriz sol-gel,  $K_m$  de 83,4 mM e para enzima livre  $K_m$  de 247,4 mM.

O valor de  $V_{m\acute{a}x}$  da lipase de *Aspergillus niger* imobilizada (526,31 U/mg) foi cerca de 30% menor que o obtido pela enzima livre (1680,67 U/mg). Assim como os valores mais altos de  $K_m$  para lipase encapsulada indicam baixa afinidade da enzima pelo substrato, a redução do valor de  $V_{m\acute{a}x}$  para lipase imobilizada em relação à lipase livre nos levam a crer, que podem ter ocorrido mudanças conformacionais na estrutura tridimensional enzimática, devido ao processo de imobilização, onde houve menor acesso do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada por encapsulação. Este resultado foi próximo ao obtido por Soares *et al.*, (2006), onde o  $V_{m\acute{a}x}$  da lipase de *Candida rugosa* encapsulada a partir da técnica sol-gel foi cerca de 40% menor que o  $V_{m\acute{a}x}$  da enzima livre.

**Tabela 2:** Parâmetros cinéticos lipase livre e imobilizada

	Parâmetros	
	$K_m$ (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)
Lipase livre	45,38	1680,67
Lipase imobilizada	57,05	526,31

## 5- CONCLUSÃO

O método de imobilização por encapsulação em matriz sol-gel da lipase de *Aspergillus niger* obtida a partir da fermentação em estado sólido (FES) de farinha de sementes de abóbora resultou em rendimento de imobilização satisfatório de 71,4%. A caracterização bioquímica da enzima livre apresentou atividade relativa máxima no pH 4,0, caracterizando-a como acídica, e em temperatura de 37°C, porém apresentou maior estabilidade em pH 6,0, mantendo como temperatura de maior estabilidade a sua temperatura ótima (37°C). O biocatalisador imobilizado apresentou atividade máxima no pH 3,0 (pH ótimo), caráter também ácido, porém o pH de maior estabilidade foi em pH 6,0, apresentando temperatura ótima e de maior estabilidade térmica em 45°C. A maior estabilidade térmica do biocatalisador imobilizado foi comprovada pelos menores valores de constante de desativação térmica e maiores tempos de meia-vida nas temperaturas de 45°C e 60°C. Por outro lado, o processo de encapsulação sugere que ocorreram alterações de afinidade da enzima pelo substrato, apontados pelo maior valor de  $K_m$  e valores menores de  $V_{máx}$ , sendo 30% menor que o valor obtido pela enzima livre. Isto provavelmente ocorreu devido às mudanças conformacionais na estrutura da enzima ocasionadas pelo processo de imobilização. Em relação à estabilidade operacional, o biocatalisador imobilizado manteve atividade relativa acima de 50% até seis ciclos de reutilização no pH 3,0 e em temperatura de 37°C. Tendo em vista que não há relatos na literatura sobre a encapsulação em matriz sol-gel de lipase de *Aspergillus niger* proveniente da fermentação de resíduo agroindustrial é de extrema relevância os resultados obtidos neste trabalho como base para o desenvolvimento de trabalhos futuros, com perspectiva de futuras aplicações industriais.

## **CAPÍTULO II**

### **Caracterização morfológica e físico-química da lipase de *Aspergillus niger* livre e imobilizada por encapsulação em matriz sol-gel**

## RESUMO

**ZUBIOLO, C., MSc. Universidade Federal de Sergipe; Fevereiro, 2013.** Caracterização morfológica e físico-química da lipase de *A. niger* livre e imobilizada por encapsulação em matriz sol-gel. Orientadora: Dra. Luciana Cristina Lins de Aquino.

Lipase de *Aspergillus niger* foi imobilizada por encapsulação em matrizes hidrofóbicas, obtidas pela técnica sol-gel, onde foi preparada por policondensação do precursor tetraetoxissilano (TEOS), na presença de polietileno glicol (PEG-1500) como aditivo. A matriz hidrofóbica resultante (sílica) e a lipase imobilizada foram caracterizadas quanto à morfologia e caracterização físico-química. A morfologia foi determinada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os parâmetros físico-químicos analisados foram quanto à área de superfície específica, isothermas de adsorção (método BET), volume de poros ( $V_p$ ) e tamanho de poros ( $d_p$ ) por adsorção de  $N_2$  do suporte e biocatalisador imobilizado. As análises térmicas realizadas foram por Termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). As análises realizadas tem como intuito avaliar o processo de imobilização a partir de uma análise criteriosa da estrutura morfológica do suporte, enzima livre e imobilizada. Os resultados das propriedades texturais obtidos para matriz pura quanto à área superficial foi de ( $224 \text{ m}^2/\text{g}$ ), volume de poro ( $0,21 \text{ cc/g}$ ) e diâmetro de poro ( $35 \text{ \AA}$ ) e para o biocatalisador imobilizado quanto à área superficial foi de ( $108 \text{ m}^2/\text{g}$ ), volume de poro de ( $0,7 \text{ cc/g}$ ) e diâmetro de poro ( $20 \text{ \AA}$ ). Estes resultados enquandram a matriz pura e o biocatalisador imobilizado na classificação como sendo sólidos mesoporosos, por apresentam diâmetro médio de 20 a  $500 \text{ \AA}$ , bem como os resultados de isoterma de adsorção (Método BET), tanto para matriz pura quanto biocatalisador imobilizado classificando-se, como isothermas tipo IV, confirmando a caracterização de materiais mesoporosos. A microscopia eletrônica de varredura apresentou superfície com maior porosidade para biocatalisador imobilizado em relação à matriz pura. A enzima livre apresentou elevada perda de massa na curva termogravimétrica (TG), com perda de 95% de sua massa à  $350^\circ\text{C}$ , resultado oposto foi apresentado pelo biocatalisador imobilizado, onde se manteve com 60% de sua massa mesmo após a temperatura atingir  $1000^\circ\text{C}$ . Na análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC), as amostras de matriz pura e biocatalisador imobilizado, apresentaram picos com transição endotérmica em temperaturas muito próximas ( $170^\circ\text{C}$ ). O biocatalisador imobilizado e a lipase livre apresentaram picos próximos em temperatura de ( $370^\circ\text{C}$ ), com picos de transição endotérmica, porém a lipase livre apresentou pico com área bem maior.

Palavras-chave: lipase, encapsulação, sol-gel, caracterização morfológica e físico-química.

## ABSTRACT

ZUBIOLO, C., MSc. Federal University of Sergipe; February, 2013. Morphological and physicochemical lipase of *A. niger* free and immobilized by encapsulation in sol-gel matrix. Supervisor: Dra. Luciana Cristina Lins de Aquino.

Lipase from *Aspergillus niger* was immobilized by encapsulation in hydrophobic matrix obtained by sol-gel technique, which has been prepared by polycondensation of the precursor tetraethoxysilane (TEOS) in the presence of polyethylene glycol (PEG-1500) as an additive. The resulting hydrophobic matrix (silica) and immobilized lipase were characterized for morphology and physicochemical characterization. The morphology was determined by scanning electron microscopy (SEM). The physico-chemical parameters were analyzed as to the specific surface area, adsorption isotherms (BET method), pore volume ( $V_p$ ) and pore size ( $d_p$ ) by  $N_2$  adsorption support and immobilized biocatalyst. The thermal analyzes were performed by Thermogravimetry (TG) and differential scanning calorimetry (DSC). Analyzes done is to aim to evaluate the immobilization process from a careful analysis of the morphological structure of the support, free and immobilized enzyme. Results of textural properties obtained for pure as matrix surface area was (224  $m^2/g$ ), pore volume (0.21  $cc/g$ ) and pore diameter (35Å) and the biocatalyst immobilized on the surface area was of (108  $m^2/g$ ), pore volume (0.7)  $cc/g$  and pore diameter (20Å). These results fall matrix pure and immobilized biocatalyst classification as mesoporous materials, have an average diameter of 20-500Å and the results of adsorption isotherm (BET method), both as pure matrix immobilized biocatalyst to be classified as type IV isotherm, confirming the characterizing mesoporous materials. The scanning electron microscopy showed surface with immobilized biocatalyst for higher porosity compared to pure matrix. The free enzyme showed high mass loss in the TG curve (TG), with loss of 95% of its mass at 350°C, the opposite result was presented by biocatalyst immobilized, which remained at 60% of its mass even after the temperature reaches 1000°C . The analysis by differential scanning calorimetry (DSC), samples of pure matrix and immobilized biocatalyst showed peaks with endothermic transition at temperatures very close (170°C). The biocatalyst immobilized and free lipase showed nearby peaks in temperature (370°C), with peak endothermic transition, but the free lipase showed a peak with much larger area.

Keywords: lipase, encapsulation, sol-gel, morphological and physical chemistry.

# 1- INTRODUÇÃO

Os métodos de imobilização de lipases conquistaram grande espaço na biotecnologia por apresentarem grande eficiência devido ao aumento em sua seletividade, estabilidade térmica e operacional. Por conseguinte, inúmeras pesquisas têm sido realizadas na preparação de lipases imobilizadas em formas, que envolvam uma variedade de suportes e de métodos de imobilização (BON, *et al.* 2008). Comparado com os métodos químicos para a imobilização de enzimas, métodos de encapsulamento especialmente pela técnica sol-gel, pode apresentar um grande potencial, porque eles são mais simples, menos dispendioso e pode manter a atividade catalítica (NOUREDDINI, *et al.* 2005).

As estruturas dos catalisadores podem ser investigadas por diversas técnicas, sendo a caracterização desses materiais de fundamental importância para a aplicação dos mesmos em importantes processos tecnológicos. O conhecimento da morfologia e a caracterização físico-química dos catalisadores heterogêneos, bem como dos suportes onde as enzimas estão ligadas por algum método de imobilização, são de fundamental importância para se poder explicar e prever algumas das suas principais propriedades: atividade, seletividade e estabilidade (NOUREDDINI, *et al.* 2005).

A caracterização textural é fundamental para compreender o comportamento cinético do catalisador, e exige a determinação dos seguintes parâmetros: área superficial, volume médio dos poros e distribuição dos tamanhos de poros (KEELING-TUCKER *et al.* 2000; IZA *et al.* 2000). Sendo a catálise um fenômeno de superfície, o conhecimento da área superficial específica e distribuição de tamanho de poros de um catalisador são importantes na interpretação da atividade catalítica. A morfologia dos suportes é conhecida por desempenhar um papel importante no processo de imobilização (SERRA *et al.* 2010).

Neste contexto o intuito deste trabalho foi realizar a caracterização morfológica e determinar as características físico-químicas da lipase de *Aspergillus niger* livre e encapsulada em matriz hidrofóbica obtida a partir da técnica sol-gel.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – Caracterização morfológica do suporte e da lipase imobilizada por encapsulação em matriz sol-gel

A caracterização morfológica e físico-química de biocatalisadores imobilizados em diferentes suportes sólidos é de fundamental importância para explicar e prever algumas de suas principais propriedades bioquímicas, como atividade, seletividade e estabilidade. Na Figura 12 é apresentada a possível estrutura física e química de lipase imobilizada por encapsulação utilizando a técnica sol-gel, processo que envolve reações de hidrólise e policondensação entre a solução de enzima, a água, o alcoóxido e o ácido.

O processamento de tais reações leva ao surgimento de cadeias poliméricas inorgânicas, que interagem entre si, formando um reticulado tridimensional (gel), onde a lipase pode estar localizada na superfície do suporte, no seu interstício e totalmente encapsulada (SOARES, 2004).

No processo sol-gel a hidrofobicidade reforçada na matriz de óxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) se correlaciona com o aumento da atividade da enzima. Maior estabilidade térmica e atividade enzimática parecem resultar de interações multipontos por meio de ligações de hidrogênio, bem como interações iônicas e hidrofóbicas (van der Waals). As interações hidrofóbicas podem resultar em um tipo de ativação interfacial, a lipase pode ter sua forma conformacional presa na matriz com a "tampa-aberta", ou seja, na sua forma ativa (Guisan, 2006).

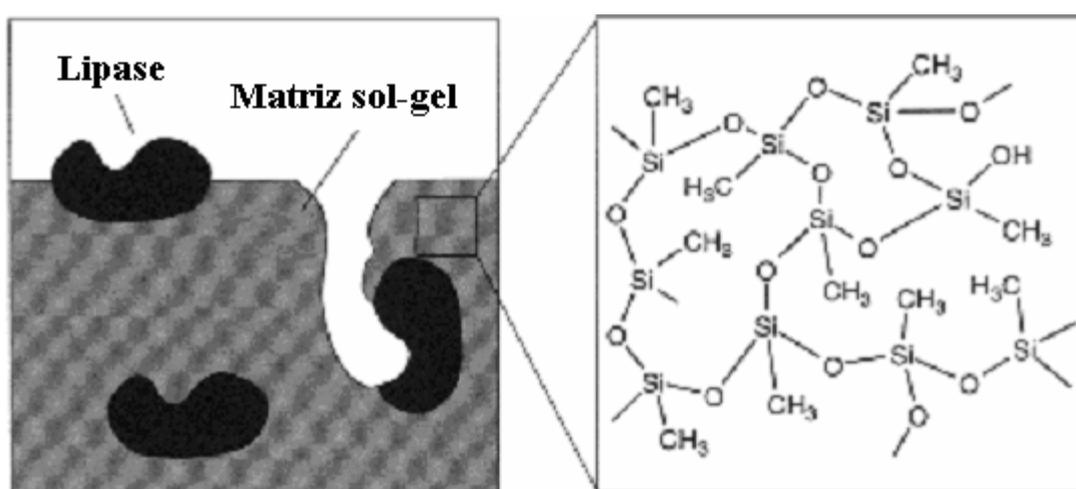


Figura 12: Característica física e composição química da lipase imobilizada em matriz sol-gel (Soares, 2004 adaptado de REETZ *et al.* 1996).

As propriedades de superfície são fundamentais para diversas áreas de pesquisas associadas à catálise, cromatografia, deposições em superfícies, etc. Uma das medidas fundamentais em relação a essas superfícies corresponde a sua área superficial específica. Em partículas sólidas essa área tem sido usualmente obtida através do método desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller e conhecido pelo nome de BET. Nesta técnica, a quantidade de gás adsorvido por um sólido é medida, que por sua vez está diretamente relacionado com as propriedades e a estrutura do material poroso (GROEN *et al.* 2003).

Vários tipos de gases podem ser utilizados, tais como o nitrogênio (N<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e argônio (Ar) e são definidos dependendo da natureza do sólido adsorvente e da informação requerida. Além de avaliar a área de superfície, este método também avalia tamanho de poro, volume de poros e a distribuição de tamanho de poro de materiais sólidos porosos (JARONIEC *et al.* 1999).

O volume de gás adsorvido pelo sólido é medido em uma ampla gama de pressões relativas, as curvas formadas entre o volume adsorvido com variação da pressão relativa (P/P<sub>0</sub>) é chamado isoterma de adsorção (GROEN *et al.* 2003).

A caracterização textural é fundamental para compreender o comportamento cinético do catalisador e exige a determinação dos seguintes parâmetros, entre outros (GREGG & SING, 1982):

- Área superficial específica;
- Volume de poros;
- Porosidade;
- Distribuição de tamanho de poros.

Os poros são geralmente classificados em três grupos, de acordo com a sua largura (GREGG & SING, 1982):

- Macroporos: os poros são tão largos que é quase impossível mapear a isoterma em detalhes;
- Mesoporos: ocorre a condensação capilar com histerese característica;
- Microporos: o potencial de interação é significativamente maior em poros estreitos devido à proximidade das paredes.

A isoterma de uma substância sobre um adsorvente (N<sub>2</sub>) é a função que relaciona à temperatura constante, a quantidade de substância adsorvida em equilíbrio com a sua pressão ou concentração na fase gasosa. A isoterma de adsorção é obtida ponto-a-ponto, determinando, na Pressão de equilíbrio, o volume de N<sub>2</sub> adsorvido na superfície do sólido. A

isoterma de dessorção é obtida pela medida da quantidade de gás removida da amostra quando a  $P/P_0$  é reduzida (GREGG & SING, 1982):

As isotermas são classificadas em seis tipos característicos, conforme figura 13 (SING *et al.* 1985):

- Isotermas do tipo I: são características de sólidos microporosos com superfícies externas relativamente pequenas. A quantidade adsorvida tende para um valor limite quando a pressão relativa tende a 1. Esta isoterma representa também a adsorção química, caso em que o valor limite corresponde à formação de uma monocamada molecular adsorvida.

- Isotermas II e III: a quantidade adsorvida tende para valores elevados quando a pressão relativa tende a 1. Correspondem à adsorção em camadas múltiplas sobrepostas e ocorrem em sólidos não-porosos ou macroporosos.

-Isotermas dos tipos IV e V: correspondem respectivamente às isotermas II e III quando o sólido apresenta mesoporos (diâmetro médio de 20 a 500 Å), nos quais ocorre o fenômeno de condensação capilar. A quantidade adsorvida tende a um valor máximo finito e corresponde ao enchimento completo dos capilares.

-Isoterma do tipo VI (em degraus): ocorre em superfícies uniformes não-porosas e representa uma adsorção camada a camada. A altura do degrau equivale à capacidade de cada monocamada.

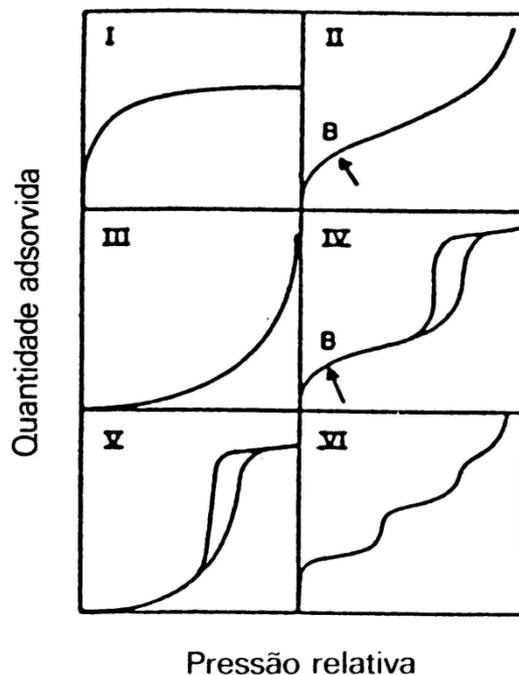


Figura 13: Isotermas de adsorção e dessorção classificadas pela IUPAC (SING *et al.* 1985).

O fenômeno da histerese nas isotermas de adsorção está associado à condensação capilar em estruturas mesoporosas. Verifica-se então que a curva de adsorção não coincide com a curva de dessorção, isto é, não há reversibilidade. Condensação capilar é a formação de uma fase líquida a partir do vapor em uma pressão abaixo da pressão de saturação (SING *et al.*, 1985).

Existem quatro tipos de histerese (SING *et al.*, 1985), conforme pode ser visto na Figura 14:

-Histerese do tipo H1: caracterizada por dois ramos da isoterma quase verticais e paralelos durante uma extensa gama de valores da ordenada, representa materiais porosos constituídos por aglomerados rígidos de partículas esféricas de tamanho uniforme ordenadas regularmente. Disso resulta uma distribuição estreita dos tamanhos de poros.

-Histerese do tipo H2: só o ramo de dessorção é praticamente vertical, correspondendo a uma distribuição definida de tamanhos e formas de poros. Geralmente associa-se este tipo de histerese aos diferentes mecanismos de condensação e evaporação em poros com um gargalo estreito e corpo largo (poros em forma de tinteiro).

-Histerese do tipo H3: caracteriza-se por dois ramos da isoterma em relação à vertical  $P/P_0 = 1$  e está associada a agregados não-rígidos de partículas em forma de placa, originando poros em fenda.

-Histerese do tipo H4: apresentam os dois ramos da isoterma quase horizontais e paralelos durante uma extensa gama de valores da abscissa. Este tipo também está associado a poros estreitos em fenda e sua forma semelhante à isoterma do tipo I é sugestiva de microporosidade.

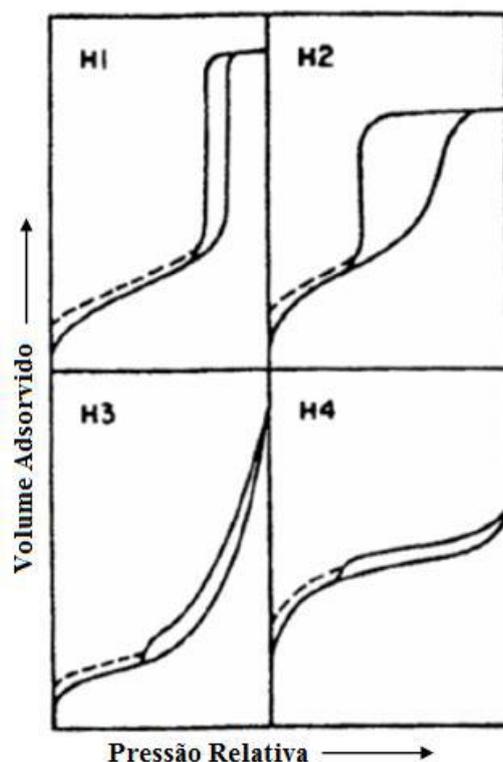


Figura 14: Classificação dos loops de histereses (SING *et al.*, 1985).

A outra técnica utilizada para a avaliação da morfologia do suporte é a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de muito fácil interpretação. O princípio de funcionamento do MEV consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 kV. Essa variação de voltagem permite a variação da aceleração dos elétrons, e também provoca o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo (SMITH, 1998).

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação e resolução (até 300.000x). Uma característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica (SMITH, 1998).

Devido à necessidade de interação do feixe eletrônico com a amostra, alguns elétrons são absorvidos pela amostra que deve conduzi-los para o fio terra, por isso, é preciso que as

amostras sejam condutoras. Caso isto não ocorra, é possível torná-las condutoras através de vários processos físicos como evaporação ou a deposição de íons (sputtering). Outro motivo para o recobrimento das amostras, é que as camadas depositadas podem melhorar o nível de emissão de elétrons, pois emitem mais elétrons que o material da amostra, facilitando a construção da imagem (GOLDSTEIN *et al.*1992).

Geralmente o mais utilizado é o recobrimento por deposição de íons metálicos de ouro (Au), liga de ouro-paládio (Au-Pd) ou platina (Pt), entre outros. Neste processo, as amostras são colocadas em uma câmara com pressão em torno de 0,1 a 0,05 mbar e o alvo metálico é bombardeado com átomos de gás inerte como, por exemplo, argônio. Os átomos do alvo são depositados sobre a amostra. As máquinas utilizadas para esta finalidade são denominadas metalizadoras e oferecem como parâmetros de ajuste: corrente aplicada (em mA), tempo de deposição e altura da amostra em relação ao alvo, a fim de que seja calculada a espessura do metal depositado. A Figura 15 mostra um equipamento que pode ser utilizado para recobrimento das amostras por sputtering ou por evaporação. Os recobrimentos metálicos utilizados por estes procedimentos visam apenas tornar as amostras condutoras de modo a gerar imagens com boa resolução no MEV, portanto, é preciso um controle da espessura depositada a fim de evitar artefatos na imagem que podem mascarar a superfície real da amostra (GOLDSTEIN *et al.*,1992).



Figura 15: Equipamento utilizado para recobrimento com carbono ou deposição metálica sobre as amostras não condutoras.

## 2.2 – Análises Térmicas

A definição usualmente aceita para análise térmica foi originalmente proposta pelo Comitê de Nomenclatura da Confederação Internacional de Análises Térmicas (ICTA) sendo,

subsequentemente, adotada tanto pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) quanto pela Sociedade Americana de Testes de Materiais (ASTM).

Análise Térmica é um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada (MACKENZIE, 1979).

As áreas de aplicação da análise térmica incluem os seguintes estudos: decomposição térmica; determinação de umidade, de voláteis, de resíduos e de teor de cinzas; oxidação térmica; cinética de reação de cura e cristalização; diagrama de fases; determinação de calor específico; determinação de transição vítrea, de fusão, tempo de armazenamento; dentre outros (MOTHÉ & AZEVEDO, 2002). As principais técnicas de análise térmica são, dentre outras: Calorimetria exploratória diferencial (DSC), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Análise Termogravimétrica (TGA) (PIERRE, 1998).

### 2.2.1 - Análise termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria de acordo com estudos de variação de massa é o resultado de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função do tempo ou da temperatura. Esta técnica possibilita conhecer a faixa de temperatura em que a amostra adquire uma composição química fixa, a temperatura em que se decompõe e o andamento das reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição, etc. É uma técnica muito utilizada na caracterização do perfil de degradação de polímeros e de outros materiais. A exposição à temperatura elevada pode, algumas vezes, alterar a estrutura química e, por consequência, as propriedades físicas dos materiais (MOTHÉ & AZEVEDO, 2002).

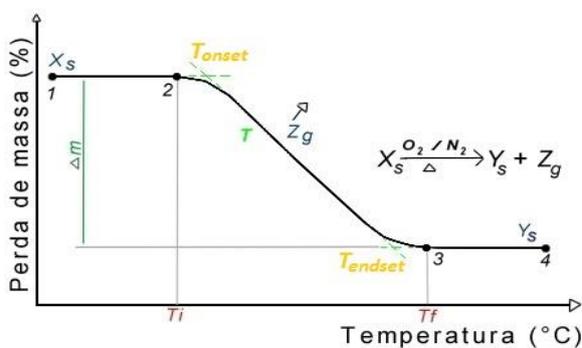


Figura 16: Gráfico de uma curva termogravimétrica

De acordo com o gráfico de uma curva termogravimétrica (Figura 16), podemos tirar várias informações sobre o material analisado (HAINES, 1995):

- $X_s$  é a massa inicial e de acordo com o gráfico podemos observar a permanência da estabilidade entre os pontos 1 e 2;
- $Y_s$  é a massa final que permanece estável a partir do ponto 3;
- Ponto 2 inicia-se a decomposição térmica de  $X_s$ , liberando  $Z_g$ ;
- Ponto 3, término da decomposição térmica de  $X_s$ , restando  $Y_s$ , termicamente estável.

A linha T extrapola a curva de reação. Extrapolando as linhas de base e a linha T, podemos obter os pontos  $T_{onset}$  e  $T_{endset}$ , definidos como início e fim do evento térmico. Entre os patamares dos pontos 1, 2, 3, 4 temos a quantidade de massa desprendida da amostra na reação.

O equipamento utilizado na análise termogravimétrica é basicamente constituído por uma micro-balança, um forno, termopares e um sistema de fluxo de gás. Os fornos, de um modo geral, são capazes de operar na faixa de 1000 – 1200°C, existindo também fornos que podem operar até 1600 – 2400°C. É possível controlar a atmosfera que envolve a amostra, podendo viabilizar o trabalho com atmosfera estática ou dinâmica à pressão ambiente, sob pressão ou a vácuo. Podem ser utilizados gases inertes (nitrogênio, argônio), oxidantes (oxigênio) ou corrosivos (HAINES, 1995).

Dentre as inúmeras aplicações existentes da termogravimetria destacam-se (MOTHÉ & AZEVEDO, 2002): calcinação e torrefação de minerais; corrosão de materiais em várias atmosferas; curvas de adsorção e dessorção; decomposição de materiais explosivos; degradação térmica oxidativa de substâncias poliméricas; decomposição térmica ou pirólise de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos; determinação da pressão de vapor e entalpia de vaporização de aditivos voláteis; determinação da umidade, volatilidade, e composição de cinzas; estudo da cinética das reações envolvendo espécies voláteis; estudo da desidratação e da higroscopicidade; reações no estado sólido que liberam produtos voláteis; taxas de evaporação e sublimação, dentre outras.

### 2.2.2 – Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

É uma técnica que mede as temperaturas e o fluxo de calor associado com as transições dos materiais em função da temperatura e do tempo. Essas medidas informam, qualitativamente e quantitativamente sobre mudanças físicas e químicas que envolvem processos endotérmicos (absorção de calor), exotérmicos (liberação de calor) ou mudanças na capacidade calorífica (MOTHÉ & AZEVEDO, 2002).

Em um experimento de Calorimetria Exploratória Diferencial, mede-se a variação de entalpia que ocorre entre a amostra e a referência durante o processo de aquecimento/resfriamento. Diferentes arranjos de construção utilizam o mesmo nome para o equipamento. O termo DSC foi utilizado primeiramente em 1963, para definir um sistema desenvolvido pela empresa norte-americana Perkin-Elmer. Existem dois tipos de equipamentos de DSC (MOTHÉ & AZEVEDO, 2002):

- DSC - por compensação de energia;
- DSC - por fluxo de calor.

Por Compensação de energia: a amostra e a referência são colocadas em compartimentos diferentes com fontes de aquecimento individuais, onde a temperatura e a energia são monitoradas e geradas por filamentos de platina idênticos, atuando assim como termômetros resistivos e aquecedores (MOTHÉ & AZEVEDO, 2002).



Figura 17: Diagrama esquemático dos compartimentos do DSC por compensação de energia

Esta técnica como é mostrado no diagrama da (Figura 17) mantém constante o calor fornecido. Porém, ao invés de medir a diferença de temperatura entre a amostra e a referência durante a reação, um sistema de controle aumenta imediatamente a energia fornecida para a amostra quando o processo é endotérmico, e aumenta a energia fornecida para a referência quando o processo é exotérmico, conservando assim a amostra e a referência com a mesma temperatura.

Por Fluxo de calor: A amostra e a referência são aquecidas pelo mesmo sistema de fornecimento de energia, sendo que possui apenas um forno, como é mostrado na (Figura 18).

Cada vez que a amostra reage, um fluxo de energia se estabelece entre os cadinhos através da base de platina. O fluxo é então mensurado através dos sensores de temperatura posicionados sob cada cadinho, obtendo assim um sinal proporcional à diferença de capacidade térmica entre a amostra e a referência (MOTHÉ & AZEVEDO, 2002).

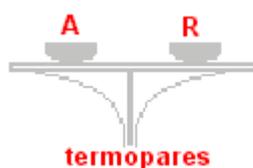


Figura 18: Diagrama esquemático dos compartimentos do DSC por fluxo de calor

Os equipamentos de compensação de calor são, geralmente, limitados a temperaturas até 725°C, enquanto os de fluxo de calor podem operar até 1500°C. O registro posteriormente corrigido da curva DSC, em ambas as técnicas, é expresso em termos de temperatura ou tempo nas ordenadas, em mW/mg (miliwatts por miligramas) na abscissa (BERNAL *et al.* 2002).

Os cadinhos utilizados em DSC são produzidos desde materiais altamente condutores de calor, como platina, até alumina. Estes cadinhos são vulgarmente conhecidos como “panelinha” devido ao seu formato. No DSC por compensação de energia cada cadinho é colocado em um forno, no DSC por fluxo de energia os cadinhos são colocados em cada lado da base de platina, permitindo assim o fluxo de calor entre a amostra e a referência (MOTHÉ e AZEVEDO, 2002).

O DSC é uma das técnicas mais empregadas para medir a temperatura de transição vítrea dos diversos materiais, além de fornecer informações sobre a compatibilidade da mistura entre dois ou mais polímeros. A temperatura de transição vítrea de um polímero é a temperatura na qual as cadeias moleculares começam a adquirir energia suficiente para vencer as forças atrativas e mover-se de forma translacional e vibracional (MOTHÉ e AZEVEDO, 2002).

A análise de DSC pode ser aplicada para: análises de copolímeros; catálise; capacidade calorífica; condutividade térmica; controle de qualidade; determinação de pureza; estabilidade térmica e oxidativa; grau de cristalinidade; intervalo de fusão; transição vítrea e taxas de cristalização e reações (MOTHÉ e AZEVEDO, 2002).

## **3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 MATERIAIS**

A lipase encapsulada em matrizes hidrofóbicas obtidas pela técnica sol-gel (conforme obtida no item 3.3.1) e a matriz pura (doadada pelo ITP/UNIT) foram mantidas sob refrigeração à 4°C e caracterizadas quanto à morfologia e características físico-químicas.

### **3.2 METODOLOGIA**

#### **3.2.1– Propriedades morfológicas e físico-químicas da lipase encapsulada e da matriz sol-gel**

As análises morfológicas usando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas no Centro Multiusuário de Nanotecnologia da Universidade Federal de Sergipe – UFS e as análises morfológicas através do método BET foram realizadas no Laboratório de Catálise Energia e Materiais (LCEM), do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP).

As análises físico-químicas: Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram realizadas no Laboratório de Catálise Energia e Materiais (LCEM), do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP).

##### **3.2.1.1 – Determinação da área de superfície específica, diâmetro e volume de poros**

O suporte e o Biocatalisador imobilizado, antes de serem analisados, foram submetidos a um tratamento térmico a 120°C por 48 h, para eliminar toda a água existente no interior dos poros dos sólidos. A área superficial da matriz pura e do biocatalisador imobilizado foi calculada usando o método Brunauer-Emmett-Teller (BET) (BRUNAUER, *et al.*, 1938). O volume de poros e diâmetro médio dos poros foi calculado com base no método BJH (RAMOS *et al.*, 1998), sendo avaliados pelo software BET (Modelo NOVA 1200e - Área de Superfície e Analisador de Tamanho de Poro, Quantschrome Instruments, versão 11.0), utilizando adsorção de N<sub>2</sub> a 77 K.

##### **3.2.1.2 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As amostras de matriz pura, lipase livre e biocatalisador imobilizado foram preparados pela aspersão das amostras sobre uma base metalizada que apresentava uma fina camada de

suspensão de grafite e levados à mufla por 3h, à 150°C para melhor fixação das amostras. Transcorrido o tempo, foi realizado o recobrimento das amostras por deposição de íons metálicos de ouro (Au). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para caracterizar a superfície da matriz pura, lipase livre e biocatalisador imobilizado e as micrografias foram realizadas com microscópio eletrônico de varredura marca JEOL modelo JSM 6510 LV, operando a 10 kV.

### **3.2.1.3 - Análise Termogravimétrica (TGA)**

As amostras foram pesadas, aproximadamente 4 mg e seladas em placas de platina. A curva termogravimétrica (TGA) foi obtida através de um aparelho DTG-60H Shimadzu DTA-TG simultâneo, sob atmosfera de nitrogênio, que começou a curva a partir da temperatura ambiente e continuou até 1000°C, a uma taxa de aquecimento de 20°C/min.

### **3.2.1.4 – Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

As amostras foram pesadas, aproximadamente de 4-6 mg e colocadas em panelinhas de alumínio e foram analisadas, sob atmosfera de nitrogênio em aparelho DSC-60 Shimadzu. As análises foram conduzidas começando a partir da temperatura ambiente e continuou até atingir 500°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

## **4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos na caracterização morfológica e físico-química da matriz pura, biocatalisador imobilizado (BI) e lipase livre. As análises foram realizadas através da determinação da área de superfície específica, diâmetro e volume de poros, microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

O biocatalisador imobilizado analisado neste estudo foi obtido pelo processo de imobilização por encapsulação em matriz sol-gel, realizado segundo metodologia previamente estabelecida pela Patente - PI0306829-3 (2003), o qual resultou em um rendimento de imobilização de 71,4%.

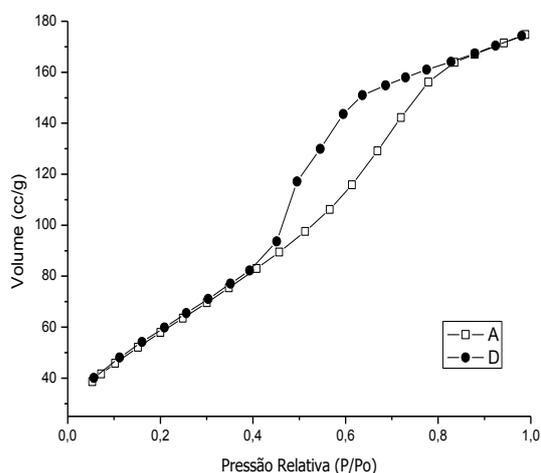
### **4.1 – Determinação da área de superfície específica, diâmetro e volume de poros**

Os métodos baseados na adsorção de gás são os mais convenientes para o estudo das propriedades de materiais sólidos porosos, utilizando medições volumétricas da quantidade de gás adsorvido. As isotermas de adsorção-dessorção de N<sub>2</sub>, área de superfície específica, volume específico de poros (V<sub>p</sub>) e diâmetro médio de poro (dp) da matriz hidrofóbica e biocatalisador imobilizado foram determinados a partir de isotermas de adsorção-dessorção, que é um método amplamente utilizado para a caracterização de materiais mesoporosos.

A isoterma de adsorção-dessorção das amostras em nitrogênio à -196°C é apresentada na Figura 19-A (Matriz pura) e 19-B (Biocatalisador imobilizado). A matriz pura e o biocatalisador imobilizado foram classificados pertencentes às isotermas tipo IV com um ciclo de histerese, que são tipicamente exibidas por sólidos mesoporosos (SUDIPTO, 2011).

Os resultados observados para matriz pura e do biocatalisador imobilizado nos testes de adsorção-dessorção de N<sub>2</sub> coincidem com as de isotermas com loops de histerese H2, o que é uma característica de materiais mesoporosos e geralmente associado com poros com gargalo estreito e corpos largos (poros em forma de tinteiro), de acordo com IUPAC. Soares, *et al.* 2004, obteve para lipase de *Candida rugosa* encapsulada em matriz sol-gel resultado semelhante com a mesma isoterma característica classificada como do tipo IV, com loops de histerese H2, característica de materiais sólidos mesoporosos.

(A)



(B)

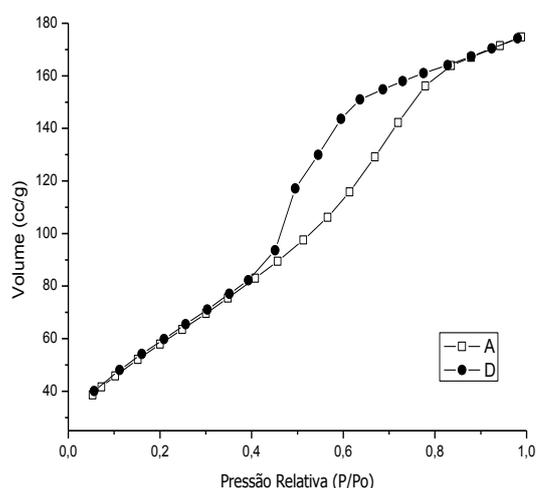


Figura 19: Isoterma de adsorção-dessorção da matriz pura (A) e biocatalisador imobilizado (B).

Os resultados em relação à área de superfície específica (método BET), volume de poros e diâmetro médio de poro de lipase encapsulada e matriz sol-gel são apresentados na Tabela 3. A área superficial do biocatalisador imobilizado (BI) foi de 108 m<sup>2</sup>/g com valor

menor que a área superficial da matriz pura cujo valor foi de 224 m<sup>2</sup>/g. A diminuição observada na área superficial para lipase encapsulada pode ter ocorrido por bloqueio de alguns microporos durante o processo de imobilização da enzima. Comportamento similar ocorreu com Soares *et al.*, (2004), em relação à área de superfície específica, onde utilizando uma lipase comercial de *Candida rugosa* imobilizada em matriz sol-gel tendo polietilenoglicol, como um aditivo, está apresentou valores mais baixos de área de superfície da enzima imobilizada, em comparação com o suporte (348 e 607 m<sup>2</sup>/g, respectivamente). Porém, houve aumento de volume de poro, em que o valor para a matriz pura foi de 0,21 cc/g, enquanto que para o biocatalisador imobilizado, foi de 0,70 cc/g. O aumento no volume de poro do biocatalisador imobilizado sugere que a enzima esteja no interior do poro da matriz hidrofóbica.

Os valores obtidos para o diâmetro médio de poro da matriz pura e para o biocatalisador imobilizado foram de 35 e 20 Å, respectivamente. A diminuição na área superficial do BI pode ter ocorrido por possíveis danos causados na estrutura da sílica e a possíveis contrações do gel durante o processo de imobilização da enzima, além da possibilidade de parte da enzima estar na superfície do suporte. Apesar da determinação da área superficial ser um importante parâmetro, a distribuição do diâmetro dos poros do biocatalisador imobilizado é considerado, um dos fatores mais críticos, podendo afetar a eficiência catalítica, isto é, quanto maior for o diâmetro dos poros maior será o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada no suporte, minimizando, desta forma, os efeitos difusionais e impedimentos estéricos do biocatalisador, porém deve existir um diâmetro de poro limitante que impeça a saída da enzima do interior da matriz (SOARES, 2004).

Souza, *et al.* (2013), apresentaram resultados semelhantes aos deste trabalho, para matriz pura, nas três propriedades texturais analisadas, utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por encapsulação em matriz sol-gel, sendo os valores de 224 m<sup>2</sup>/g para área superficial, 0,21 cc/g (Vp) e 35 Å para (dp). Porém apresentou valores menores ao obtido neste trabalho para o biocatalisador imobilizado, no que se refere à (Vp) e (dp), sendo de 0,05 cc/g e 19 Å, respectivamente, apresentando valor acima ao deste trabalho apenas em relação à área superficial, que foi de 143 m<sup>2</sup>/g.

**Tabela 3:** Propriedades texturais de adsorção-dessorção de nitrogênio de amostras de Matriz pura e biocatalisador imobilizado

Amostras	Área superficial (m <sup>2</sup> /g)	Volume do poro (cc/g)	Diâmetro do poro (Å)
Matriz pura	224	0,21	35
Biocatalisador imobilizado	108	0,70	20

#### 4.1.2 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias da matriz pura, lipase livre e biocatalisador imobilizado, são mostrados na Figura 20. Ao analisar as micrografias da matriz pura (Figura 20A), pode-se observar a presença de uma estrutura rígida superficial, provavelmente formando apenas um bloco. A morfologia da lipase imobilizada pelo método de encapsulação em matriz hidrofóbica obtida pela técnica sol-gel apresentou uma estrutura superficial de maior porosidade, que certamente possui papel fundamental na obtenção do aumento do volume dos poros, embora os poros ainda se apresentem irregulares como mostrado na Figura 20 (C e D).

A lipase livre (Figura 20B) apresentou estrutura bem diferenciada ao do biocatalisador imobilizado, o que era esperado já que não passou pelo processo de imobilização. Souza *et al.* 2012, estudaram a micrografia da matriz pura e observaram a presença de uma estrutura superficial rígida, sugerindo formação de apenas um bloco, similar a este trabalho. A morfologia do biocatalisador imobilizado apresentou uma estrutura superficial de rugosidade e porosidade maiores que a matriz pura como as apresentadas neste trabalho.

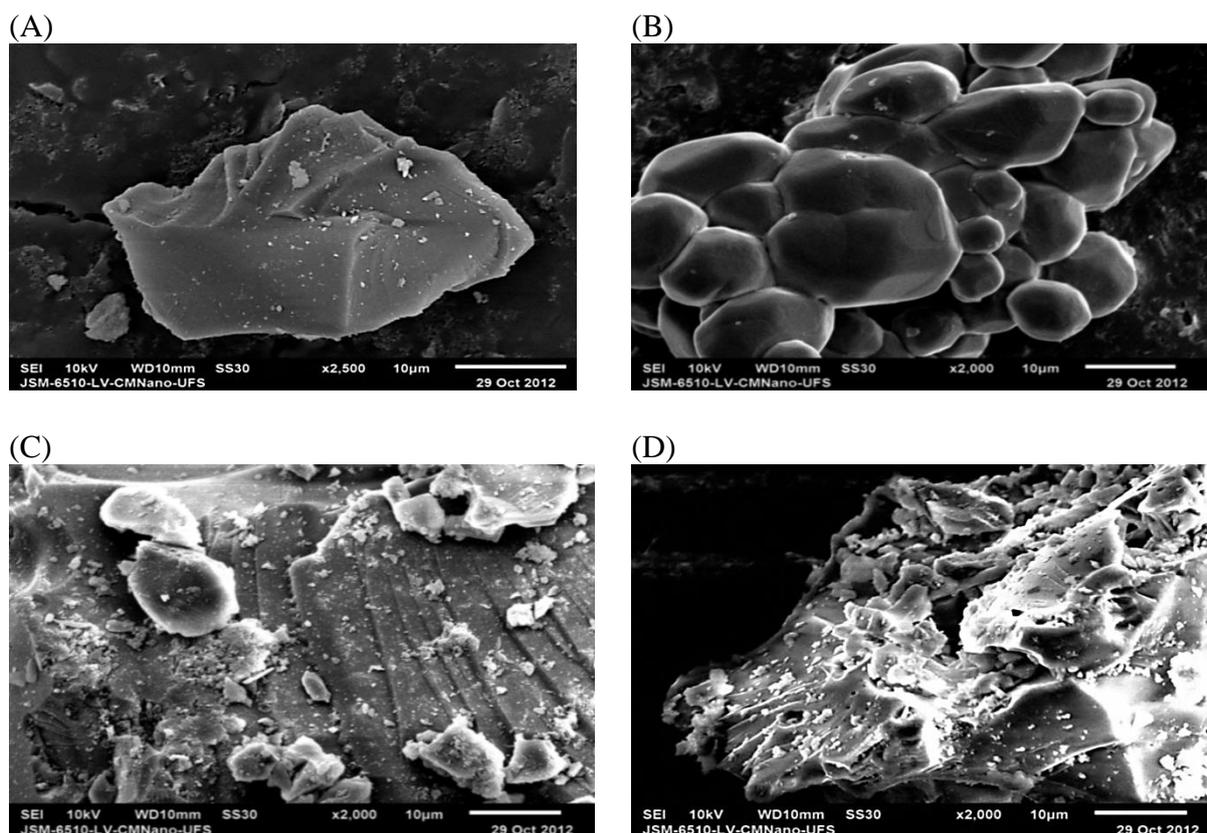


Figura 20: Micrografias eletrônicas de varredura para: (A) Matriz pura (x2500), (B) Lipase livre (x2000) (C e D) Biocatalisador imobilizado (x2000).

#### 4.1.3 – Análise termogravimétrica (TGA)

A perda de massa de amostras de matriz pura, lipase livre e biocatalisador imobilizado (BI) foram determinadas por análise termogravimétrica (TGA). A perda de massa obtida após aquecimento das amostras até 1000°C são relatadas na Figura 21. A perda de massa das amostras de matriz pura e do (BI), apresentaram decréscimo de aproximadamente 20% quando atingiram a temperatura de 100°C. Após esta temperatura a matriz pura, perdeu mais 5% de sua massa, totalizando 25% de perda ao atingir a temperatura de 1000°C. O biocatalisador imobilizado apresentou um declínio um pouco maior, com perda de 38% de massa em relação à massa inicial, ao atingir a temperatura de 1000°C. O mesmo não aconteceu com a lipase livre, que manteve massa constante até atingir a temperatura de 300°C, mas com o aumento de temperatura houve uma forte perda de massa, atingindo a máxima degradação em 450°C, perdendo 95% de sua massa inicial.

Os termogramas foram divididos em três regiões. Na região I, que compreende até a temperatura de 200°C, a perda de massa está associada principalmente com água da

desidratação da superfície e decomposição de grupos amino, geralmente de grupos orgânicos. Na região II, que compreende entre 200°C e 600°C, temos maior perda de massa para o BI evidenciando a presença de compostos orgânicos e água no interstício dos poros, sugerindo assim o bom rendimento de imobilização obtido, e na região III, a perda de massa nesta região está associada com reações de desidroxilação finais e carbonização definitiva de compostos orgânicos, incluindo lipase.

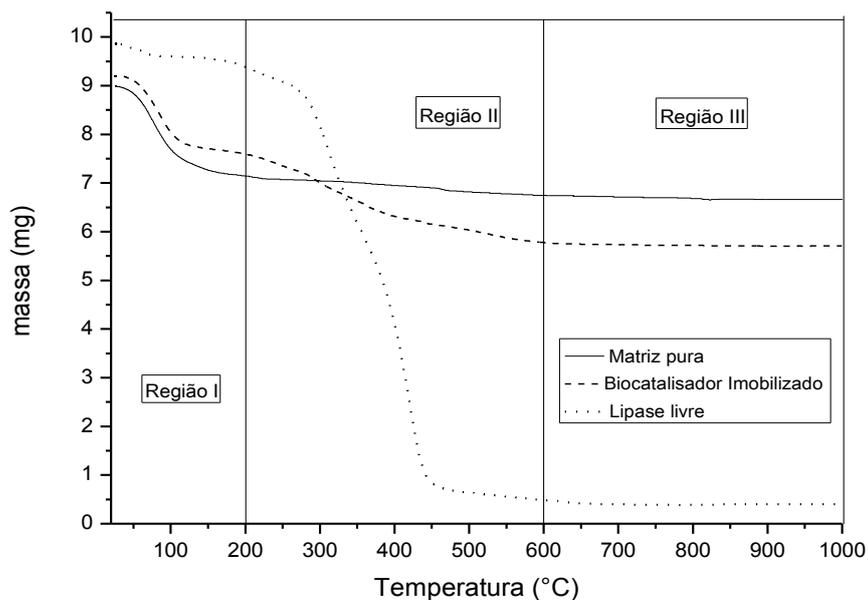


Figura 21: Curva termogravimétrica das amostras de matriz pura, biocatalisador imobilizado e lipase livre sob atmosfera de N<sub>2</sub> à 20°C/min.

De acordo com este resultado, podemos observar que o (BI) apresentou maior resistência térmica que a lipase livre, demonstrando que o processo de imobilização foi eficiente e é de grande importância no estudo de estabilidade e decomposição térmica ou pirólise de materiais orgânicos. Resultados similares foram obtidos por Souza *et al.* (2012), cuja lipase livre de *Burkholderia cepacia* apresentou perdas de massa em torno de 99% e a matriz pura apresentou perda de massa de 22%. Porém a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por encapsulação em matriz sol-gel apresentou perda de massa de 45%, superior à obtida com a lipase de *A. niger* do trabalho em questão que foi de 38% (SOUZA *et al.*, 2012). Pirozzi *et al.* (2009), também obtiveram perda de massa de 44,4% para a lipase de *Rhizopus oryzae* encapsulada em zircônio pela técnica sol-gel, superior a obtida neste

trabalho. Soares *et al.* (2004) obtiveram para a matriz pura perda de massa superior (em torno de 45%) a obtida neste trabalho que foi de 25%, porém a lipase de *Candida rugosa* encapsulada em matriz sol-gel apresentou perda de massa de aproximadamente 25%, inferior à obtida neste trabalho que foi de 38%.

#### 4.1.4 – Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

É uma técnica em que uma amostra é submetida a aquecimento controlado, onde o fluxo de calor é medido e a transição de fases dá origem a picos endotérmicos ou exotérmicos na gama de temperaturas exploradas. Transições de primeira ordem (endotérmicas ou exotérmicas) são caracterizadas como picos, mesmo que eles possam sobrepujar um ao outro. A área do pico diretamente sob a curva mW/mg é proporcional a entalpia  $\Delta H$  envolvida no processo endotérmica/exotérmica, expresso em Quilojoule por Quilograma (KJ/Kg), ou, Joule por grama (J/g). O DSC permite determinações quantitativas, estando a área dos picos relacionada com a energia envolvida no processo, sendo utilizados padrões para calibração do equipamento. Estes padrões apresentam variação de entalpia conhecida, normalmente de fusão, e a área do pico deste processo é comparada com a área do processo apresentado pela amostra. (BERNAL *et al.* 2002).

A matriz pura apresentou apenas um pico de transição endotérmica em uma temperatura de pico de 156°C e entalpia de 280,53 J/g. O BI apresentou dois picos de transição endotérmica, o primeiro pico na temperatura de 153,45°C, entalpia de 271,63 J/g e o segundo a 344,51°C com entalpia de 39,70 J/g, evidenciando a imobilização da lipase no suporte. A matriz pura e o BI apresentaram o primeiro pico em temperaturas e entalpia muito próximas, picos estes associados à perda de água presente nos poros. A proximidade destes picos sugere a presença do suporte nas duas amostras, portanto a presença da enzima no processo de imobilização proporcionou a formação de um segundo pico.

A enzima livre apresentou três picos de transição endotérmica, sendo o primeiro a 67,99°C com entalpia de 5,35 J/g, o segundo pico em 206,61°C com entalpia de 19,62 J/g e o terceiro pico em 370,56°C com entalpia de  $1,07 \cdot 10^3$  J/g. O último pico da enzima livre (370,56°C) apresentou-se bem próximo ao último pico do BI (344,51°C), porém com entalpia maior. Este comportamento provavelmente está associado ao fato de que a enzima livre por não estar protegida pelo processo de imobilização, quando submetida a elevadas temperaturas sofre processos de decomposição de compostos orgânicos, bem como desnaturação

enzimática (NELSON & COX, 2006), além disto, a maior entalpia também pode estar relacionada ao desdobramento da estrutura terciária da enzima em altas temperaturas.

Os picos endotérmicos da Figura 22 estão relacionados com a decomposição de compostos orgânicos da lipase livre e do BI, grupos silanol da matriz sol-gel, bem como com a remoção de moléculas de água, que foram fortemente ligadas à matriz de sílica, assim chamada "água de hidratação" (Guan-Sajonz *et al.* 1997). As moléculas de água podem estar fortemente ligadas à superfície do gel de sílica por forças diferentes, tanto físicas quanto químicas e influenciar de forma eficiente no rendimento de imobilização (WEI *et al.* 1999).

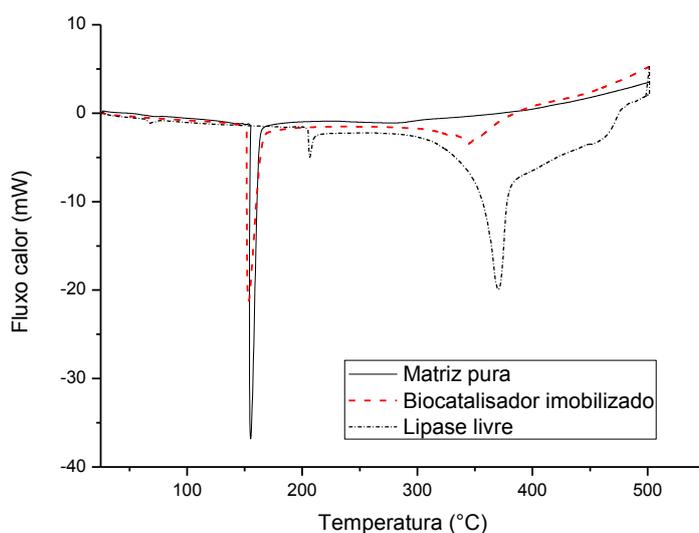


Figura 22: Curva DSC a 10°C/min., sob atmosfera de N<sub>2</sub> para amostra de matriz pura, biocatalisador imobilizado e lipase livre.

Souza *et al.* (2012), obtiveram para lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por encapsulação em matriz sol-gel, apenas um pico de transição endotérmica para sílica pura em temperatura de 65°C e entalpia de 364,3 J/g. O BI na ausência de líquido iônico apresentou o pico de transição endotérmica em temperatura de 100°C e para lipase livre um primeiro pico em temperatura de 98°C foi determinada a entalpia de 177,7 J/g, sendo que os outros picos foram menos significantes e estão associados com a decomposição de compostos orgânicos e perda de água. Pirozzi *et al.* (2009), obtiveram para lipase de *Rhizopus oryzae* encapsulada em matriz sol-gel, dois picos endotérmicos, sendo um pico de alta intensidade a 86°C e um com intensidade mais baixa em 350-400°C. O primeiro pode ser relacionado com a evaporação de água presente nos poros abertos e moléculas de álcool fisicamente presos no

gel, o último pico provavelmente pode ter ocorrido devido à decomposição de moléculas fortemente ligadas que não reagiram (ARONNE *et al.* 1991).

## 5 – CONCLUSÃO

No presente trabalho a lipase de *A. niger* imobilizada por encapsulação em matriz hidrofóbica sol-gel apresentou rendimento de imobilização de 71,4% e foi caracterizada com base em parâmetros morfológicos e físico-químicos. As amostras de matriz pura e biocatalisador imobilizado (BI) foram caracterizadas através de isotermas de adsorção-dessorção de N<sub>2</sub>, como isotermas tipo IV com loops de histerese H2, típicas de materiais sólidos mesoporosos, conforme IUPAC. A lipase imobilizada por encapsulação apresentou uma estrutura superficial de maior porosidade e rugosidade que a matriz pura, visualizadas através das micrografias apresentadas através do (MEV). O volume de poro do BI foi superior (0,70 cc/g) ao da matriz pura (0,21 cc/g), sugerindo uma maior interação do substrato com a enzima presente dentro dos poros. O diâmetro de poro da matriz pura e BI foram de 35Å e 20 Å, respectivamente. O menor diâmetro de poro da lipase imobilizada por encapsulação é favorável, pois dificultará a saída da enzima presente dentro dos poros. O perfil da curva termogravimétrica mostrou que o BI apresentou maior resistência térmica do que a lipase livre. A análise de DSC mostrou similaridade entre as amostras de matriz pura e o BI onde foi observado formação de picos de transição endotérmica com temperaturas muito próximas, picos que estão relacionados com a perda de água. O BI apresentou um segundo pico sugerindo a presença da enzima dentro dos poros, o mesmo não aconteceu com a matriz pura onde a formação de apenas um pico evidenciou que na amostra tratava-se apenas de sílica. Ao contrário, os outros picos do BI demonstraram além de perda de água, decomposição de compostos orgânicos como lipase e grupos silanol presentes no suporte. O processo de imobilização considerado satisfatório, através dos resultados de rendimento de imobilização, proporcionou maior resistência térmica da lipase imobilizada por encapsulação e características morfológicas típicas de biocatalisador imobilizado.

## 6 - CONCLUSÃO GERAL

Os esforços em pesquisa estão direcionados para hoje eficientemente os biocatalisadores assumirem posição de destaque perante os catalisadores químicos tradicionais na produção de enzimas. Os resíduos agro-industriais, antes descartados, hoje são vistos como substratos com grande potencial para produção enzimática. A farinha de sementes de abóbora foi utilizada como substrato para produção de lipase a partir de *Aspergillus niger*. A lipase foi imobilizada por encapsulação tendo como suporte sílica obtida pela técnica sol-gel, onde obteve rendimento de 71%, considerado satisfatório. Os parâmetros bioquímicos foram determinados e a enzima imobilizada apresentou resultados de temperatura ótima e estabilidade térmica maiores do que para enzima na forma livre. Estes resultados fortaleceram ainda mais o processo de imobilização, mostrando o quanto é importante e se faz necessário otimizar processos com a perspectiva de se poder aplicar-lós a nível industrial. A estabilidade operacional da lipase imobilizada foi determinada e o biocatalisador permaneceu por seis ciclos de reutilização mantendo atividade hidrolítica de 50%. Este resultado foi de grande importância, já que um dos entraves da biocatálise na disputa com os processos químicos é sua baixa estabilidade operacional quando comparada com o método tradicional. Na segunda etapa do trabalho o suporte e a lipase encapsulada foram analisados quanto à sua morfologia e aspecto físico-químico. A morfologia realizada através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostrou através de micrografias a formação da estrutura porosa da lipase encapsulada em sua superfície quando comparada com o suporte. A isoterma de adsorção-dessorção de N<sub>2</sub> apresentou curva característica de isoterma tipo IV, que segundo a literatura é característica de materiais mesoporosos. Resultado confirmado pela análise de diâmetro e volume de poro da sílica pura (diâmetro de poro de 35Å, V<sub>p</sub> de 0,21 cc/g) e da lipase encapsulada (diâmetro de poro de 20Å e V<sub>p</sub> de 0,7cc/g). As análises físico-químicas realizadas através de Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) demonstraram que o processo de imobilização ofereceu resistência térmica à enzima e confirmou sua eficiência. Sendo assim, o processo de imobilização, a escolha do suporte adequado e o microrganismo produtor da enzima são de suma importância para o sucesso do processo e o futuro da biocatálise na sua aplicabilidade.

## **7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Purificar a enzima por mais de um método de purificação, selecionando o método mais adequado para se fazer a caracterização enzimática;
- Aplicar mais de um método de imobilização para mesma enzima utilizando diferentes aditivos;
- Otimizar metodologias para produção de ácidos graxos e/ou outros compostos de interesse na área de alimentos;
- Realizar estudos de viabilidade econômica dos processos de imobilização visando sua aplicabilidade em nível comercial.

## 8 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARONNE, A.; PERNICE, P.; MAROTTA, A. J. Mater. Sci. Lett. 10, 1136, 1991.

AYERS, M. R.; HUNT, A. J.; J. Non-Cryst. Solids, 285, 123, 2001.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 392-416. 1996.

BASHEER, S. M.; CHELLAPPAN, S.; BEENA, P.S.; SUKUMARAN, R. K; ELYAS, K.K; CHANDRASEKARAN, M. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and applications in oil effluent treatment. *New Biotechnology* 28, 6, 2011.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, É. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 5, 849-855, 2002.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Editora Interciência. 2008.

BORNSCHEUER, T.U.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, H.S. “Optimizing lipases and related enzymes for efficient application”. *Trends in Biotechnology*, v. 20, n. 10, p. 433-437, 2002.

BORNSCHEUER, U.T.; KAZLAUSKAS, R.J. *Hydrolases in organic synthesis regio and stereoselective biotransformations*. Wiley –VCH, Weinheim. 1999.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P.H.; TELLER, E. *Journal of the American Chemical Society*, v. 60, n. 2, 309-319, 1938.

CALDER, M. S.; SIEGEL, D. Properties of the Michaelis-Menten mechanism in phase space. *Journal of Mathematical Analysis and Applications*, v. 339, p. 1044-1064, 2008.

CARDOSO, P. de O.; MORAES, M. C. de; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, v. 32, n° 1, 2009.

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; BASTOS, D.H.M.; OLIVEIRA, J.G. *Acta Farma Bonaer.* 21, 85, 2002.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D'A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. *Quim. Nova*, 26, 75, 2003.

CARVALHO, P.O.; CONTESINI, F.J.; IKEGAKI, M. *Braz. J. Microbiol.* 37, 329–337, 2006.

CASTRO, de H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, Vol. 27, No. 1, 146-156, 2004.

CARVALHO, P.O. CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D'A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Potential of enantioselective biocatalysis by microbial lipases. *Quim. Nova* 28, 614–621, 2005.

CARVALHO, N. M. F.; PIRES, B. M.; ANTUNES, O. A. C.; FARIA, R. B.; OSÓRIO, R. E. H. M. B.; PIOVEZAN, C.; NEVES, A. Uso de equações lineares na determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten. *Quím. Nova*, v.33, 2010.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L.; *Quim. Nova*, 27, 146, 2004.

CAZACU, M.; DRAGAN, S.; VLAD, A. J. *Appl. Polym. Sci.*, 88, 2060, 2003.

CHATTERJEE,S.; BARBORA,L.; CAMEOTRA, S.S.; MAHANTA, P.; GOSWAMI, P. *Appl.Biochem. Biotechnol.* 157,593–600, 2009.

CHAUBEY, A.; PARSHAD, R.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N. *Arthrobacter* sp. lipase immobilization on magnetic sol–gel composite supports for enantioselectivity improvement. *Process Biochemistry* 44, 154–160, 2009.

CHEN, B.; YIN, C.; CHENG, Y.; LI, W.; CAO, Z. A.; TAN, T. Using silk woven fabric as support for lipase immobilization: the effect of surface hydrophilicity/hydrophobicity on enzymatic activity and stability. *Biomass and Bioenergy*, p. 1-8, 2010.

CHOI H.N., KIM M.A., LEE W.Y. Amperometric glucose biosensor based on sol-gel-derived metal oxide/Nafion composite films. *Anal. Chim. Acta*, 537:179–187, 2005.

CONTESINI, F. J., DA SILVA, V. C. F., MACIEL, R. F., DE LIMA, R. J., BARROS, F. F. C. de OLIVEIRA CARVALHO, P. Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *The Journal of Microbiology*, Vol. 47, 563-571, 2009.

CONTESINI, F.J. Lopes, D.B.; Macedo, G.A.; Nascimento, M.G.; Carvalho. P.O. *Aspergillus* sp. lipase: potential biocatalyst for industrial use. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 67, 163–171, 2010.

CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S.; *Quim. Nova*, 24, 672, 2001.

COSTA, S. A.; TZANOV, T.; PAAR, A.; GUDELJ, M.; GUBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. Immobilization of catalases from *Bacillus* SF on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, p. 815-819, 2001.

COUTO, S.; R.; SANROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry— A review. *Journal of Food Engineering*, v. 76, p. 291–302, 2006.

DA RÓS, P.C.M.; SILVA, G.A.M.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; HEIZIR, F.; DE CASTRO, H.F; Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 101, 5508–5516, 2010.

DA SILVA, V. C. F. DA; CONTESINI, F. J.; CARVALHO, O. P. Characterization and Catalytic Activity of Free and Immobilized Lipase from *Aspergillus niger*: a Comparative Study. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 19, No. 8, 1468-1474, 2008.

DA SILVA, V.C.F.; CONTESINI, F.J.; CARVALHO, P.O. *J. Ind. Microbiol.* 36, 949–954, 2009.

DALLA-VECCHIA, R. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química nova*, Vol. 27, No. 4, 623-630, 2004.

DANTAS, E. M.; AQUINO, L. C. L. Fermentação em Estado Sólido de diferentes Resíduos para a obtenção de Lipase Microbiana. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.12, n.1, p.81-87, 2010.

DESIMONE, M. ; MATIACEVICH, S; BUERA, M; DIAZ, L. Effects of relative humidity on enzyme activity immobilized in sol–gel-derived silica nanocomposites. *Enzyme Microb Technol*, 42:583–8, 2008.

ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; TALEB, A.T.; ADINARAYANA, K. *Process Biochem.* 39, 525–528, 2004.

FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18, 1360, 2007.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. *Process Biochem.* 44, 1068, 2009.

GILL, I., BALLESTEROS, A. Bioencapsulation with in synthetic polymers: sol-gel encapsulated biologicals. *Trends Biotechnol.* 18, 282–296, 2000.

GOLDSTEIN J.I.; NEWBURY D. E.; ECHIL P; Joy DC; Romig Jr AD; Lyman CE; Fiori C; Lifshin E. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. New York: Plenum Press; 1992.

GOLICNIK, M. Evaluation of enzyme kinetic parameters using explicit analytic approximations to the solution of the Michaelis-Menten equation. *Biochemical Engineering Journal*, 2010.

GOMES, M. F.; PAULA, V. A.; SILVA dos S. G. e CASTRO F. H. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. *Química Nova*, Vol. 29, No. 4, 710-718, 2006.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; GOMES, E.R.S. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, v. 144, p. 1–22, 2008.

GREGG, S.J.; SING, K.S.W. Adsorption, surface area and porosity, 2. ed. London: Academic Press, Inc., 1982.

GROEN, J.C.; PEFFER, L.A.A.; PÉREZ-RAMÍREZ, J. Pore size determination in modified micro and mesoporous materials. Pitfalls and limitations in gas adsorption data analysis. *Microporous and mesoporous materials*, 60, 1-17, 2003.

GUAN-SAJONZ,H.G; GUIOCHON, G; DAVIS, E; GULAKOWSKI, K; SMITH, D.W. Study of the physico-chemical properties of some packing materials: III. Pore size and surface area distribution. *J. Chromatogr. A*. 33-51, 1997.

GUISAN, J.M. Immobilization of Enzymes and Cells Humana Press Inc, Totowa, NJ. pp. 107–128, second ed., 2006.

GUPTA, S.; YOGESH; S. JAVIYA, M. BHAMBI, C.S. PUNDIR, K. SINGH, A. BHATTACHARYA. Comparative study of performances of lipase immobilized asymmetric polysulfone and polyether sulfone membranes in olive oil hydrolysis. *Int. J. Biol. Macromol.* 42, 145-151, 2008.

HAINES, P. J. Thermal Methods of Analysis: Principles, Applications and Problems". Blackie Academic & Professional, 1995.

HANEFELD, U.; GARDOSSIB, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization. *Chem. Soc. Rev.*, 38, 453–468, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A.; “Industrial application of microbial lipase.” *Enzyme and Microbial technology*, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. *Biotechnol. Adv.* 27,782–798, 2009.

HEMMINGER, W. *Calorimetry and Thermal Analysis of Polymers*; Mathot, M.B.F., ed.; Hanser: Munique, 1994, p. 18-45.

HIOL, A., JONZO, M.D., RUGANI, N., DRUET, D., SARDA, L., COMEAU, L.C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 421–430, 2000.

HONG J, XU D, GONG P, YU J, MA H, YAO S. Covalent-bonded immobilization of enzyme on hydrophilic polymer covering magnetic nanogels. *Micropor Mesopor Mater* 109:470–7, 2008.

HUANG, X.J.; GE, D.; XU, Z.K. Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal*, v. 43, p. 3710–3718, 2007.

IDA, J. I.; MATSUYAMA, T.; YAMAMOTO, H. Immobilization of glucoamylase on ceramic membrane surfaces modified with a new method of treatment utilizing SPCP-CVD. *Biochemical Engineering Journal*, v. 5, p. 179-184, 2000.

INPI Patente N°. PI0306829-3, Método de encapsulação de lipase em matriz hidrofóbica preparada por meio da técnica sol–gel e que emprega tetraetilortossilicato como precursor, Setembro, 2003.

ISAKSSON, D.; SJODIN, K.; HOGBERG, H. E. “Enantiomerically enriched cryptone by lipase catalyzed kinetic resolution.” *Tetrahedron:Asymmetry*, v. 17, n. 2, p. 275-280, 2006.

IZA, M.; WORLEY, S.; DANUMAH, C.; KALIAGINE, S.; BOUSMINA, M., “Determination of pore size distribution for mesoporous materials and polymeric gels by means of DSC measurements: thermoporometry”, *Polymer*, v. 41, 5885-5893, 2000.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W., REETZ, M.T. “Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications lipases.” *Annual Review Microbiology*, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K.E.; GGERT, T. “Lipases for biotechnology.” *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. “Microbial lipases form versatile tools for biotechnology.” *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 396-403, 2002.

JARONIEC, M.; KRUK, M.; OLIVIER, J.P. Standard nitrogen adsorption data for characterization of nanoporous silica. *Langmuir*. 15(16), 5410-5413, 1999.

KAPOOR, M.; GUPTA, MUNISHWAR NATH. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47, 555–569, 2012.

KARTAL, F.; AKKAYA, A.; KILINC, A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on glycidyl methacrylate grafted poly vinyl alcohol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 57, p. 55–61, 2009.

KHARRAT, N.; BEN ALI, YASSINE; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y.; KARRA-CHAABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochemistry* 46, 1083–1089, 2011.

KEELING-TUCKER, T., RAKIC, M., SPONG, C., BRENNAN, J.D. “Activity of lipase within sol-gel derived bioglasses via organo silane and polymer doping”, *Chemistry Materials*, v. 12, pp. 3695-4704, 2000.

KOBLITZ, M. G. B.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003.

KOBLITZ, B.G.M., *Bioquímica de Alimentos: TEORIA E APLICAÇÕES PRÁTICAS*. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2010.

LAFUENTE, R.; GUIBAN, J.M. Sepabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzyme via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnol. Progr.* 18, 629–634, 2002.

LEE, D. H.; PARK, C. H.; YEO, J. M.; KIM, S. W. Lipase immobilization on Silica Gel Using a Cross-linking Method. *J. Ind. Eng. Chem.*, Vol. 12, No. 5, 777-782, 2006.

LOZANO, P.; PÉREZ-MARÍN, A.B.; DIEGOA, T.D.; GÓMEZB, D.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D.; BELLEVILLE, M.P.; RIOS G.M; IBORRA, J.L. Active membranes coated with immobilized *Candida Antarctica* lipase B: preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media. *Journal of Membrane Science*, v. 201, p.55–64, 2002.

MACEDO GA, LOZANO MMS, PASTORE GM. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus* sp. *J Biotechnol*, 6, 2003.

MACKENZIE, R.C. *Termochim. Acta*, 28,1, 1979.

MAHADIK, N.D. PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochem.* 38, 715–721, 2002.

MAHAPATRA, P.; KUMARI, A.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R.; NAG, A. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 60, 57–63, 2009.

MATEO, C.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; HIDALGO, A.; LOPEZ-GALLEGO, F.; ABIAN, O.; PALOMO, J.M.; BETANCOR, L.; PESSELA, B.C.C.; GUIBAN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Epoxy-amino groups: a

new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules* 4, 772– 777, 2003.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PEDROCHE, J.; FERNANDEZ-MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. *Enzyme Microb. Technol.* 40,1451–1463, 2007.

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO JR., A.; *Quim. Nova*, 28, 296, 2005.

MENDES, A. A.; RODRIGUES, D. S.; FILICE, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M.; PALOMO, J. M.; *Tetrahedron*, 64, 10721, 2008.

MHETRAS, N. C.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology*, v. 100, P. 1486-1490, 2009.

MIGNEAULT, C.; DARTIGUENAVE, M.J.; BERTRAND, K.C.; *Waldron, Biotechniques* 37, 790–802, 2004.

MINOVSKA,V.;WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. *J. Serb. Chem. Soc.* 70 (4) 609–624, 2005.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. *Manual de soluções, reagentes e solventes*. Editora Blucher. 2º edição. 2007.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. *Análise térmica de materiais*. São Paulo: Editora, 2002.

MURTY, R. V.; BHAT, J.; MUNISWARAN. P. K. A. Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2002, 7: 57-66.

NAKAJIMA M, SNAPE J, KHARE SK. In: Gupta MN, editor. *Method in non-aqueous enzymology*. Basel: Birkhauser Verlag; p. 52– 69 2000.

NELSON, L.D.; COX, M. M. Lehninger Princípios de bioquímica. Quarta edição, São Paulo, 2006.

NINI, L.; SARDA, L.; LOUIS-CLAUDE, C.; BOITARD, E.; JEAN-PAUL, D.; CHAHINIAN, H. (2001) "Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a Kinetic study." *Biochemical Biophysics Acta*, v. 1534, p. 34-44.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresour Technol.*, 96(7):769-77, 2005.

OKADA, T.; MORRISSEY, M.T. *Food Chem.* 103, 146–150, 2007.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; FACCIO, C.; MENONCIN, S. ; AMROGINSKI, C. Influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática de óleo de mamona. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 24(2): 178-182, abr.-jun. 2004.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. de F.; PERALES, L. de la H.; CORTECERO, M. D. S. *Tecnología de alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos*. vol 1. Porto Alegre-RS: ARTMED, 2005.

OSBORN, H.-T.; AKOH, C.C. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety* 3, 93–103, 2002.

OZMEN, E.Y.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Synthesis and characterization of cyclodextrin-based polymers as a support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *J. Mol. Catal.: B Enzym.* 57, 109–114, 2009.

OZTURK, T. K.; KILINC, A. Immobilization of lipase in organic solvent in the presence of fatty acid additives. *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67, p. 214-218, 2010.

PAHUJANI, S.; KANWAR, S. S.; CHAUHAN, G.; GUPTA, R. Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: enzyme characteristics and stability. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 2566-2570, 2008.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Quím. Nova*, vol.29, n° 1, São Paulo, Jan./Feb.2006.

PAULA V. A.; BARBOZA C. J.; CASTRO F. H. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 5, 792-796, 2005.

PAULA, A. V.; MOREIRA, R. B. A.; BRAGA, P. L.; de Castro, H. F. *Quimica Nova*, V. 31, N° 1, 35-40, 2008.

PAZARLIOGLU, N. K.; TELEFONCU, A. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized on activated pumice particle. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1807-1814, 2005.

PIERRE, A. C. Introduction to Sol-Gel Processing, United States of America, New York, Kluwer Academic Publishers, pp.356, 1998.

PINHEIRO, A. D. T.; BRÍGIDA, A. I. S.; GONÇALVES, L. R. B. Influência do pH no processo de imobilização de lipase em fibra da casca de coco verde. *VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*. Unicamp, SP, 2005.

PINHEIRO, R. C.; SOARES, C. M.F.; SANTOS, O. A.A. ; CASTRO, H. F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Influence of gelation time on the morphological and physico-chemical properties of the sol-gel entrapped lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 52–53, 27–33, 2008.

PIROZZI, D.; FANELLI, E.; ARONNE, A.; PERNICE, P.; MINGIONE, A. Lipase entrapment in a zirconia matrix: Sol-gel synthesis and catalytic properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 59, 116–120, 2009.

RAMOS, M.A.; GIL, M.H.; SCHAT, E.; MATTHYS, G.; MONDELAERS, W. FIGUEIREDO, M.M. *Powder Technol.* 99 , 79, 1998.

REETZ, M.T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 527–534, 1996.

REETZ, M.T.; TIELMANN, P.; WISENHOFER, W.; KONEN, W.; ZONTA, A. *Adv. Synth. Catal.* 345, 717–728, 2003.

RETUERT, J.; QUIJADA, R.; ARIAS, V.; YAZDANI-PEDRAM, M.; *J. Mater. Res.*, 18, 487, 2003.

RODRIGUES, S.D.; MENDES, A. A.; ADRIANO, S. W.; GONÇALVES, R. B. L.; GIORDANO, C. L. R. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 51,100–109, 2008.

RODRIGUEZ, J. A.; MATEOS, J.C.; NUNGARAY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2264–2269, 2006.

ROMERO, C.M.; PERA, L.M.; LOTO, F.; VALLEJOS, C.; CASTRO, G. ; BAIGORI, M.D. Purification of An organic solvent-tolerant lipase from *Aspergillus niger* MYA 135 and its application in ester synthesis . *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 1, 25–31, 2012.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 61, 229, 2008.

SANTOS, R. C. A. Obtenção de lipase microbiana a partir de sementes de abóbora e avaliação do potencial de imobilização da enzima. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Sergipe, 2011.

SANTOS, R. C. A; ARAÚJO, K. B.; SOARES, C. M. F.; AQUINO, L. C. L. Evaluation of temperature and moisture response surface on the lipase from pumpkin seeds fermentation using *Aspergillus niger*. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 34, n. 3, p. 255-260, July-Sept., 2012.

SANTOS, R. C. A.; ARAUJO, K. B.; ZUBIOLLO, C.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; AQUINO, L. C. L. Microbial lipase obtained from the fermentation of pumpkin seeds: Potential of immobilization in hydrophobic matrices. *Acta Scientiarum. Technology* (Impresso), 2013.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30, 489–511, 2012.

SAXENA, R.K.; DAVIDSON, W.S.; SHERON, A.; GIRI, B. *Process Biochem.* 39,239–247, 2003.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia industrial*. Editora Edgard Blucher LTDA, v. 2, 2007.

SEBRÃO, D.; SILVA, NASCIMENTO, M. G.; MOREIRA, M. A. imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 5, 1182-1187, 2007.

SEDAGHAT, M. E.; GHIACI, M.; AGHAEI, H.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Enzyme immobilization. Part 3: immobilization of  $\alpha$ -amylase on n-bentonite and modified bentonite. *Applied Clay Science*, v. 46, p. 125-130, 2009.

SERRA, E.; DÍEZ, E.; DÍAZ, I.; BLANCO, R.M. A comparative study of periodic Mesoporous organosilica and diferents hydrophobic mesoporous silicas for lipase immobilization. *Microporous and Mesoporous Materials* 132, 487–493, 2010.

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

SHCHIPUNOV, A.; *J. Colloid Interface Sci.*, 268, 68, 2003.

SHELDON, M. S.; SMALL, H. J. Immobilization and biofilm development of on *Phanerochaete chrysosporium* polysulphone and ceramic membranes. *Journal of Membrane Science*, v.263 , p. 30-37, 2005.

SING, K.S.W; EVERETT, D.H.; HAUL, R.A.W.; MOSCOU, L; PIEROTTI, R.A.; ROUQUEROL, J; SIEMIENIEWSKA, T. Pure and applied chemistry. 57, 603-619, 1985.

SMITH, W. F. Princípio de ciência e engenharia dos materiais. 3º ed. Portugal: McGraw-Hill, 1998.

SOARES, C. M. F. Otimização por planejamento experimental da imobilização de lipase em sílica de porosidade controlada na presença de estabilizantes. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química da Unicamp, Campinas-SP, 2000.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F.F. de; ZANIN, G. M. “Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77-79, p. 745-758, 1999.

SOARES, C. M. F., DE CASTRO, H. F., SANTANA, M. H. A., ZANIN, G. M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91–93, 703–718, 2001.

SOARES, C.M.F.; SANTOS, O.A.A.; OLIVO, J.E.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. *J. Mol. Catal.: B Enzym.* 29, 69–79, 2004.

SOARES, C.M.F. Encapsulação da Enzima Lipase em Matrizes Sol-Gel e sua Aplicação em Reações de Hidrólise e Esterificação. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Maringá, Brasil, 2004.

SOARES, C.M.F.; SANTOS, O.A.A.; CASTRO, H.F. ; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. ITAKO, J.E. *J. Non-Cryst. Solids* 352, 3477–3649, 2006.

SOARES, C.M.F.; SANTOS, O.A.A.; OLIVO, J.E.; CASTRO, H.F. ; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. *J.Mol. Catal.: B Enzym.* 39, 69–76, 2006.

SONG, R.; XUE, R.; HE, L. H.; LIU, Y.; XIAO, Q. L.; *Chin. J. Polym. Sci.*, 26, 621, 2008.

SOUZA, R. L.; FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R.T.; FREITAS, L. DOS S.; DURO, M. A. I.; MATTEDI, S.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A. DOS A.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. *Enzyme and Microbial Technology*. In Press, Accepted Manuscript. 2012.

SOUZA, R.L.; RESENDE, W.C.; BARAO, C.E.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F.; SANTOS, O.A.A.; FRICKS, A.T.; FIGUEIREDO, R.T.; LIMA, A.S.; SOARES, C.M.F. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol–gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001. *J. Mol. Catal B- Enzym*. 84. 152– 159, 2012.

SOUZA, R. L.; FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R.T.; FREITAS, L. DOS S.; DURO, M. A. I.; MATTEDI, S.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A. DOS A.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. *Enzyme and Microbial Technology*, 52, 141–150, 2013.

SUDIPTO DAS, Immobilization of Enzymes in Sol-Gel Mesoporous Silica, Enzymatic Digestion of Biomass, and Silica-Curcumin Hybrid Materials, Thesis the Faculty of Drexel University, March 2011.

SUN, S. Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for whole-cell synthetic lipase production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. *Process Biochemistry*, v. 43, p.219–224, 2008.

TAN, T.; WANG, F.; ZHANG, H. Preparation of PVA/ chitosan lipase membrane reactor and its application in synthesis of monoglyceride. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.18, p.325–331, 2002.

TAN, T.; WANG, F.; ZHANG, H.; *J. Mol. Catal. B: Enzym*. 18, 325, 2002.

TOMIC, S.; RAMEK, M. “Quantum mechanical study of *Burkholderia cepacia* lipase enantioselectivity.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 38, n. 3-6, p. 139-147, 2006.

TORALLES, R.P., AUGUSTO-RUIZ, W. Produção e utilização de ácidos graxos. Óleos e Grãos. São Paulo, p. 20-32, jul./ago., 2001.

TORRES, R; ORTIZ, C; PESSELA, B.C.C; PALOMO, J.M; MATEO, C; GUISAN, J,M; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under diferente experimental conditions. *Enzyme Microbiol Technol*, 39:167–71, 2006.

TSUZUKI, W. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69,1256–1261, 2005.

TZAFRIRI, A. R.; EDELMAN, E. R. Quasi-steady-state kinetics at enzyme and substrate concentration in excess of the Michaelis-Menten constant. *Journal of Theoretical Biology*, v. 245, p. 737-748, 2007.

TZIALLA, A.A.; PAVLIDIS, I.V.; FELICISSIMO, M.P.; RUDOLF, P.; GOURNIS, D.; STAMATIS, H. Lipase immobilization on smectite nanoclays: characterization and application to the epoxidation of  $\alpha$ -pinene. *Bioresour. Technol.* 101, 1587–1594, 2010.

UYANIK, A.; SEN, N.; YILMAZ, M. Improvement of catalytic activity of lipase from *Candida rugosa* via sol-gel encapsulation in the presence of calix(aza)crown. *Bioresource Technology* 102 , 4313–4318, 2011.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HOSS, M. J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 9, 113, 2000.

WANG, Y.; HSIEH, Y.-L. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. *Journal of Membrane Science*, v. 309, p. 73–81, 2008.

WEI Y.; XU, J; DONG, H; DONG, J.H; QIU, K; JANSEN-VARNUM, S.A. Preparation and physisorption characterization of D-glucose-templated mesoporous silica materials via base-catalyzed sol-gel process. *Chem. Mater.* 11: 2023-2029, 1999

WILLIS, W. M.; MARAGONI, A. G.; *Biotechnol. Genetic Eng. Rev.*, 16, 141, 1999.

XIE, K.; YU, Y.; SHI, Y.; *Carbohydr. Polym.* 78, 799, 2009.

YANG, G.; WU, J.; XU, G.; YANG, L. Enhancement of the activity and enantioselectivity of lipase in organic systems by immobilization onto low-cost support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 57, p. 96–103, 2009.

YANG, G.; WU, J.; XU, G. ; YANG, L. Comparative study of properties of immobilized lipase onto glutaraldehyde-activated amino-silica gel via different methods, *Colloid Surface B* v.78, 351–356, 2010.

YANG, Z.; SI, S.; DAI, H.; ZHANG, C. Piezoelectric urea biosensor based on immobilization of urease onto nanoporous alumina membranes. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, p. 3283-3287, 2007.

YE, P.; XU, Z.-K.; CHE, A.-F.; WU, J.; SETA, P. Chitosan-tethered poly(acrylonitrile-co-maleic acid) hollow fiber membrane for lipase immobilization. *Biomaterials*, v. 26, p. 6394-6403, 2005.

YESILOGLU, Y. Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2155-2159, 2005.

YI, M.; LIU, Q. Michaelis-Menten mechanism for single-enzymes and mult-enzymes system under stochastic noise and spatial diffusion. *Physica A: statistical mechanics and its applications*, v. 389, p. 3791-3803, 2010.

YILMAZ, E.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Immobilized copper-ion affinity adsorbent based on a cross-linked  $\beta$ -cyclodextrin polymer for adsorption of *Candida rugosa* lipase. *Biocatal. Biotransform.* 27, 360–366, 2009.

YILMAZ, E.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic sol–gel composite supports for enzymatic resolution of (R,S)-Naproxen methyl ester. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 69, 35–41, 2011.

YONG-XIAO B, YAN-FENG L, YONG Y, LIU-XIANG Y. Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized novel mesoporous silica supports. *J. Biotechnol.* 125: 547–82, 2006.

YUJUN, W.; XU JIAN, X.; GUANGSHENG, L.; YOUYUAN, D. Immobilization of lipase by ultrafiltration and cross-linking onto the polysulfone membrane surface. *Bioresource Technology*, v. 99, p.2299–2303, 2008.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Em *Enzimas como Agentes Biotecnológicos*; Saiad, S.; Pietro, R. C. L. R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, Cap. 4, p. 35-85, 2004.

ZHENG , MING-MING; YONG LU , LING DONG , PING-MEI GUO , QIAN-CHUN DENG , WEN-LIN LI , YU-QI FENG,FENG-HONG HUANG . Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. *Bioresource Technology* 115, 141–146, 2012.