UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Produção e imobilização de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* para aplicações biotecnológicas

Tales Alexandre da Costa e Silva

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Produção e imobilização de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* para aplicações biotecnológicas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientado: Tales Alexandre da Costa e Silva

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Suraia Said

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Costa-Silva, Tales Alexandre
Produção e imobilização de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* para aplicações biotecnológicas, 2014.
231 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.
Orientador: Oliveira, Wanderley Pereira.
Co-orientadora: Said, Suraia.

1. Lipase. 2. Imobilização de enzimas. 3. Secagem. 4. Subprodutos agroindustriais. 5. Quitosana.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tales Alexandre Costa e Silva

Produção e imobilização de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* para aplicações biotecnológicas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira
Co-orientadora: Profa. Dra. Suraia Said

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Trabalho realizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Processos Farmacêuticos (LAPROFAR).

Apoio Financeiro
FAPESP

Aos meus pais, *Claudionor* e *Neuza*,

Que dedicaram uma vida inteira em prol da educação e felicidade dos filhos..... Por serem exemplo de honestidade, caráter e humanismo. Vocês são o estimulo e a razão que necessito para continuar trilhando meu caminho.

Meu amor e minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. *Wanderley Pereira de Oliveira* que, assim como no Mestrado, continuou contribuindo para minha formação profissional. Agradeço pela orientação, conhecimentos transmitidos e o exemplo constante de profissional competente e dedicado.

À Profa. Dra. *Suraia Said* por ter me acompanhado desde 2008, contribuindo de forma marcante para meu crescimento profissional. A sua postura e engajamento como educadora serão sempre referências para mim.

Agradecimentos especiais à Dra. *Cláudia Regina Fernandes de Souza* pelo exemplo de dedicação à pesquisa e empenho na formação dos alunos do LAPROFAR. Seus ensinamentos, busca pela excelência, e amizade foram imprescindíveis para concretização desse trabalho.

Aos técnicos *Marcelo Luis Lombardi Martinez* e *Maria Angélica dos Santos Cunha Chellegatti* pelo auxílio constante, apoio e amizade. O trabalho e comprometimento de Vocês foram de grande importância para a realização deste estudo.

Ao grupo do LAPROFAR, *Diego Cortes-Rojas, Lucimara Benelli e Vanessa Secolin* pela equipe que formamos baseada em trabalho conjunto e companheirismo.

Aos alunos de Iniciação Científica: *Lara Buffoni, Nicolle Miranda, Paulo Silva, Polyana Marques e Renan Cognette* pela confiança e grande auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Às Professoras: *Dra. Niege A. J. C. Furtado, Dra. Carmem Lúcia Cardoso* e *Dra. Rosa Furriel* pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

Aos Professores, *Dra. Meuris Gurgel C.da Silva* (Faculdade de Engenharia Química – Unicamp) e *Dr. Luciano Bachmann* (Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP), pela contribuição na etapa de caracterização dos materiais estudados.

Ao Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena - USP, pela realização da etapa de aplicação biotecnológica e pelo convívio agradável e ao mesmo tempo sério e consistente com os objetivos acadêmicos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP pela oportunidade de realização deste projeto de pesquisa.

Aos funcionários e coordenação do Curso de Pós-graduação pela atenção, dedicação e competência.

Aos órgãos de incentivo à pesquisa e desenvolvimento CAPES, CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro.

À todas as pessoas de minha família, por serem incentivadores e compreensivos nos momentos difíceis ou de ausência. Amo todos Vocês.

Aos meus primos, *Maíra Fernandes* e *Marlon Fernandes*, pelas longas horas de conversa e momentos únicos compartilhados. Vocês são especiais.

Aos meus sobrinhos, *Gabriel e Lara,* por toda alegria e momentos de diversão.

Aos amigos que encontrei nessa jornada: *Ana Paula Alves, Dário Freitas, Diogo Souza, Luana Silva, Fernanda Rachel, Flávio Lorente, Giovanna Longato, Henrique Ramos, Juninho Bony, Mateus Terceti, Murilo Nucci, Natália Scatena, Patrícia Nacarato, Procópio Filho, Rafael Fávero, Thiago DallaValle e Thiago Miranda* por todo companheirismo, amizade e apoio.

À amiga *Maurette Fernandes* pela amizade e exemplo de uma profissional dedicada e um ser humano incomparável.

À minha grande amiga *Mariana Benício* por seu companheirismo, carinho e linda amizade construída. Levarei lembranças felizes de todos os momentos compartilhados.

Por fim, um agradecimento a todas as pessoas aqui não mencionadas, mas que nas quais pude encontrar solidariedade, afeto, compreensão e sorrisos no rosto.

A todos Vocês, meus sinceros agradecimentos!

“Que nada nos defina. Que nada nos sujeite. Que a liberdade seja a nossa própria substância.”

RESUMO

COSTA-SILVA, T. A. **Produção e imobilização de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* para aplicações biotecnológicas**. 2014. 231f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O objetivo desse trabalho foi avaliar estratégias de imobilização de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* através do uso de suportes não convencionais (subprodutos agroindustriais e quitosana). Investigou-se o uso de equipamentos de secagem (estufa, leito de jorro, leito fluidizado, liofilizador e "spray dryer") para desidratação dos derivados imobilizados obtidos. A imobilização por ligação covalente, usando glutaraldeído, epicloridrina e metaperiodato de sódio como agentes ligantes, apresentou valores para retenção da atividade enzimática superiores à imobilização por adsorção e encapsulação. Nos ensaios de imobilização utilizando glutaraldeído e secagem em leito de jorro, os melhores valores obtidos foram para a celulose microcristalina com retenção da atividade enzimática de 179,1%, seguido da casca de arroz 173,9%. A palha de milho foi o melhor suporte na imobilização covalente e secagem em estufa, com retenção de mais de 100% da atividade enzimática inicial. Na secagem por liofilização houve destaque para a casca de arroz (163,6%) seguida de palha de milho (157,2%) e cana de açúcar (154,6%). Utilizando quitosana como suporte e secagem em leito fluidizado, o valor para a retenção da atividade enzimática foi de 93,9% empregando-se o glutaraldeído como agente ligante. Na secagem do sistema quitosana-lipase em estufa a retenção da atividade enzimática foi de 68,2% e para secagem por liofilização esse valor foi superior a 80,0%. Realizou-se a caracterização dos materiais utilizados como suportes e estes apresentaram área superficial relativamente alta, elevada porosidade e estrutura constituída de macroporos. Estas características foram importantes por proporcionar a obtenção da enzima imobilizada com alta retenção da atividade catalítica. Alguns parâmetros bioquímicos e cinéticos da lipase na forma livre foram diferentes da lipase imobilizada. A alteração mais evidente foi a afinidade ao substrato (K_m), que se mostrou dependente do protocolo de imobilização utilizado. Avaliou-se o potencial de aplicação biotecnológica dos derivados imobilizados que apresentaram maior retenção da atividade enzimática. Para a lipase imobilizada em casca de arroz o rendimento de transesterificação (produção de biodiesel) foi superior a 96,0% após 72 horas de reação enquanto que para as microesferas de quitosana esse valor foi atingido após 120 horas. Os produtos obtidos da transesterificação do óleo de coco estão de acordo com a especificação da Agência Nacional de Petróleo (ANP). Na avaliação da atividade de esterificação, a máxima concentração de butirato de butila foi obtida após 6 horas de reação, correspondendo a uma taxa de conversão de aproximadamente 99,0%, quando utilizou-se quitosana como suporte. Para o uso da casca de arroz, a máxima concentração de butirato de butila foi obtida também após 6 horas de reação, correspondendo a uma taxa de conversão de 92,5%. Este trabalho demonstrou que suportes de baixo custo permitiram a obtenção de derivados imobilizados com características semelhantes àqueles obtidos com o uso de polímeros sintéticos, os quais apresentaram excelente potencial para síntese de biodiesel e de butirato butila.

Palavras-chave: Lipase; Imobilização de enzimas, Secagem, Subprodutos agroindustriais, Quitosana.

ABSTRACT

COSTA-SILVA, T.A. **Production and immobilization of lipases produced by the endophytic fungus *Cercospora kikuchii* for biotechnological applications**. 2014. 231f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The objective of this study was to evaluate strategies for immobilization of lipases produced by the endophytic fungus *Cercospora kikuchii* through the use of unconventional supports (agroindustrial by-products and chitosan). The use of different drying process (oven, spouted bed, fluidized bed, freeze drying and spray drying) for dehydration of immobilized derivatives obtained by adsorption, covalent binding and encapsulation was investigated. The covalent immobilization (using glutaraldehyde, epichlorohydrin and sodium metaperiodate as crosslinking agents) was the best process for the enzymatic activity retention. For covalent immobilization using glutaraldehyde and spouted bed drying, the best values were obtained for microcrystalline cellulose with enzymatic activity retention of 179.1%, followed by rice husk and corn straw with 173.9% and 169.8%, respectively. Corn stover was the best support in the covalent immobilization and oven drying, with retention 100.0% of the initial enzyme activity. For freeze-drying rice husk was the best support (163.6%) followed by corn stover (157.2%), sugar cane bagasse (154.6%) and corn cob (129.5%). Utilizing chitosan as support and fluidized bed drying, the value for the retention of enzymatic activity was 93.9% employing glutaraldehyde as activating agent. For chitosan-lipase drying using oven, the enzymatic activity retention was 68.2% and using freeze-drying the retention of enzymatic activity was higher than 80.0%. The support characterization was carried out and showed high surface area, high porosity and macropore structure. These characteristics were important for providing immobilized derivatives with high catalytic activity retention. Some biochemical and kinetic parameters of lipase in free form were different from the immobilized lipase. The most important changes was the substrate affinity (K_m) which was dependent of immobilization protocol used. The last experimental part of this study was the biotechnological applications of the best immobilized derivatives produced. For the immobilized lipase onto rice husk the transesterification yield (biodiesel production) was above 96.0% after 72 hours of reaction while for the use of chitosan microspheres this value was reached after 120 hours. The viscosity values for the biodiesel samples are in accordance with specifications recommended by Brazilian Petroleum Agency (ANP) to be used as biofuel. The immobilized derivatives catalytic power was measured in terms of esterification activity too. The maximum concentration for butyl butyrate was obtained after 6 hours, corresponding to conversion rate of 99.0% when chitosan was used as support. Using rice husk, the maximum butyl butyrate concentration was obtained after 6 hours of reaction, corresponding to conversion rate of 92.5%. This work demonstrated that cheap supports are biocompatible with lipases, rendering immobilized derivatives with characteristics similar to or better than those previously obtained with synthetic polymers. The immobilized derivatives showed excelente potential for biodiesel production and butyl butyrate synthesis.

Keywords: Lipase, Enzyme immobilization, Drying, Agroindustrial by-products, Chitosan.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura geral de uma lipase do fungo *Rhizomucor miehei*: A) tríade catalítica: serina, histidina e ácido aspártico; B) Conformação aberta (lid na posição laranja) e conformação fechada (lid na posição verde); C) Região hidrolítica da forma fechada – área vermelha; D) Região hidrofóbica da forma aberta – área azul..... 7

FIGURA 2 - Girassol mexicano, *Tithonia diversifolia*. Vista parcial da planta (A) e suas flores (B)..... 16

FIGURA 3 - Doenças causadas pela infecção do fungo *Cercospora kikuchii* em soja. Crestamento foliar (A) e Mancha púrpura nas sementes (B)..... 16

FIGURA 4 - Métodos de imobilização de enzimas..... 18

FIGURA 5 - Representação esquemática do processo de secagem sobre a superfície de partículas inertes em leito de jorro. 46

FIGURA 6 - Esquema geral de produção, imobilização e secagem das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*..... 56

FIGURA 7 - Fungo endofítico *Cercospora kikuchii*, isolado da planta *Tithonia diversifolia* (Girassol mexicano), utilizado para produção das lipases..... 61

FIGURA 8 - Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila por lipases, com liberação de *p*-nitrofenol e ácido palmítico..... 64

FIGURA 9 - Subprodutos agroindustriais utilizados como suportes para imobilização enzimática..... 66

FIGURA 10 - Fluxograma das etapas realizadas no estudo de imobilização com os subprodutos agroindustriais..... 69

FIGURA 11 - Fotografia do liofilizador Thermo Fischer Scientific SNL 108B..... 70

FIGURA 12 - Equipamento “spray dryer” utilizado - (A) Diagrama esquemático e (B) Unidade experimental: 1- reservatório, 2- bomba peristáltica, 3- sistema de atomização, 4- câmara de secagem, 5- ciclone, 6- coletor do produto seco, 7- painel de controle..... 72

FIGURA 13 - Equipamento de leito de jorro utilizado: (A) unidade experimental e (B) Diagrama esquemático..... 74

FIGURA 14 - Fluxograma das etapas realizadas no estudo de imobilização com as microesferas de acetato de quitosana (Glu: glutaraldeído; MP: metaperiodato de sódio; EP: epicloridrina; CF: estufa de convecção forçada; Lio: liofilizador; LF: leito fluidizado)..... 76

FIGURA 15 - (A) Esquema do sistema de preparação das microesferas: 1 - funil com solução de quitosana, 2 - bomba de ar comprimido; 3 - gotejador, 4 - agitador; 5 - cuba de vidro; 6 - solução coagulante e 7 - rotâmetro. (B) Sistema para neutralização das microesferas por lavagem com tampão em fluxo ascendente..... 77

FIGURA 16 - Microesferas de acetato de quitosana: A) Forma não ativada utilizada como suporte na imobilização por adsorção. B) Forma ativada com agente ligante (glutaraldeído) para imobilização covalente..... 78

FIGURA 17 - Equipamento de leito fluidizado utilizado: (A) unidade experimental e (B) diagrama esquemático..... 80

FIGURA 18 - Ilustração do aparato experimental utilizado nas reações de transesterificação do óleo de coco empregando lipase imobilizada em quitosana (A) e casca de arroz (B)..... 86

FIGURA 19 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. Coluna 1: padrões de massa molecular: fosfolipase B (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa); coluna 2: fluido de cultura, dialisado e concentrado (100 µg); coluna 3: Pool I Butyl-Sepharose Fast Flow (57 µg); coluna 4: Pool II gel filtração (30 µg)..... 96

FIGURA 20 - Distribuição granulométrica acumulativa dos suportes utilizados para imobilização: (A) bagaço de cana, (B) casca de coco verde, (C) celulose microcristalina, (D) casca de arroz, (E) palha de milho e (F) sabugo de milho..... 97

FIGURA 21 - Retenção da atividade enzimática (R_{AE}) das lipases imobilizadas por adsorção e secas em estufa no período de armazenamento de 6 meses a 5°C (a) e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b)..... 103

FIGURA 22 - Retenção da atividade enzimática (R_{AE}) das lipases imobilizadas por adsorção e secas em liofilizador no período de armazenamento de 3 meses a 5°C (a) e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b)..... 105

FIGURA 23 - Retenção da atividade enzimática (R_{AE}) das lipases imobilizadas por adsorção utilizando “spray dryer” como método de secagem no período de armazenamento de 6 meses a 5°C (a) e após cinco ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b)..... 108

FIGURA 24 A) Imagem representativa de um suporte poroso; B) Descreve a situação em que a enzima é muito grande para encaixar dentro dos poros; C) Retrata a situação em que o tamanho da enzima e o diâmetro dos poros são correspondentes; D) Situação em que o diâmetro dos poros é muito do que a enzima..... 110

FIGURA 25 - Retenção da atividade enzimática das lipases imobilizadas por ligação covalente e utilizando leito de jorro como método de secagem no período de armazenamento de 6 meses a 5°C (a) e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b)..... 113

FIGURA 26 - Retenção da atividade enzimática das lipases imobilizadas por ligação covalente e utilizando leito de jorro como método de secagem no período de armazenamento de 6 meses a 5 °C (a) e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b)..... 115

FIGURA 27 - Retenção da atividade enzimática das lipases imobilizadas com glutaraldeído e utilizando leito de jorro como método de secagem no período de armazenamento por 6 meses a 5 °C (a) e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b)..... 119

FIGURA 28 - Retenção da atividade enzimática (R_{AE}) das lipases imobilizadas por ligação covalente e utilizando estufa como método de secagem no período de armazenamento de 6 meses a 5°C (a) e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b)..... 122

FIGURA 29 - Retenção da atividade enzimática (R_{AE}) das lipases imobilizadas por ligação covalente e utilizando liofilização como método de secagem no período de armazenamento de 6 meses a 5°C (a) e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b)..... 125

FIGURA 30 - Fotomicrografias dos suportes: (A) casca de arroz; (B) bagaço de cana; (C) celulose microcristalina; (D) casca de coco; (E) sabugo de milho; (F) palha de milho..... 126

FIGURA 31 - Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para lipase livre, suporte pré-ativado e derivado imobilizado obtido: casca de coco verde e bagaço de cana..... 128

FIGURA 32 - Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para lipase livre, suporte pré-ativado e derivado imobilizado obtido: celulose microcristalina e casca de arroz..... 129

FIGURA 33 - Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para lipase livre, suporte pré-ativado e derivado imobilizado obtido: palha de milho e sabugo de milho..... 130

FIGURA 34 - Possíveis mecanismos que podem ocorrer para estabilização e hiper-ativação da lipase..... 136

FIGURA 35 - Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica..... 139

FIGURA 36 - Possível mecanismo de reação entre os suportes ligninolíticos e o glutaraldeído..... 142

FIGURA 37 - Ligação covalente da enzima com suporte quimicamente modificado com metaperiodato de sódio... 143

FIGURA 38 - Mecanismo de reticulação do suporte ativado com epicloridrina..... 144

FIGURA 39 - Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) suportes puros e pré-ativados: bagaço de cana e palha de milho..... 145

FIGURA 40 - Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) suportes puros e pré-ativados: celulose microcristalina e palha de arroz..... 146

FIGURA 41 - Fotomicrografias do sistema enzima-suporte obtido através do processo de secagem por liofilização..... 151

FIGURA 42 - Fotomicrografias do sistema enzima-suporte obtido através do processo de secagem por estufa..... 151

FIGURA 43 - Espectrometria de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para lipase livre, suporte pré-ativado e derivado imobilizado obtido..... 152

FIGURA 44 - Fotomicrografias do sistema enzima-suporte obtido através do processo de imobilização e secagem em leito fluidizado..... 154

FIGURA 45 - Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para lipase livre, suporte pré-ativado com glutaraldeído e derivado imobilizado obtido após secagem em leito fluidizado..... 155

FIGURA 46 - Estrutura dos biopolímeros quitosana (a), quitina (b) e celulose (c)..... 157

FIGURA 47 - Mecanismos de reticulação e/ou oxidação da quitosana por diferentes agentes ligantes..... 158

FIGURA 48 - Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para suportes puros e pré-ativados: quitosana..... 159

FIGURA 49 - Lipase imobilizada em micropartículas de quitosana magnetizada. A, B e C) Pós produzidos após a secagem por "spray drying" D) Micropartículas produzidas pela reticulação utilizando tripolifosfato de sódio..... 160

FIGURA 50 - Microfotografias obtidas por MEV das micropartículas: (A), (B) e (C) – Pós produzidos por "spray dryer": Formulação A, B e C. D) micropartículas produzidas por "cross-linking"..... 164

FIGURA 51 - Dipersão e efeito magnético nos derivados imobilizados produzidos: (A), (B) e (C) – Pós produzidos por "spray dryer": Formulação A, B e C. D) micropartículas produzidas por "cross-linking"..... 165

FIGURA 52 - Perfil de formação de ésteres de etila em função do tempo de reação da transesterificação do óleo de coco catalisada pela lipase de *C. kikuchii* imobilizada em casca de arroz..... 171

FIGURA 53 - Perfil de formação de ésteres de etila em função do tempo de reação da transesterificação do óleo de coco catalisada pela lipase de *C. kikuchii* imobilizada quitosana..... 172

FIGURA 54 - Espectro de RMN ^{1}H integrado do biodiesel e triglicerídeo. (Fonte: Rosset et al., 2011 adaptado)..... 175

FIGURA 55 - Espectro de RMN ^{1}H integrado das regiões de formação de mono-, di-, triglicerídeo e ésteres etílicos..... 175

FIGURA 56 - Espectro de RMN ^{1}H integrado dos ésteres etílicos obtidos a partir da etanólise do óleo de coco: a) lipase imobilizada em quitosana b) lipase imobilizada em casca de arroz..... 176

FIGURA 57 - Formação do butirato de butila (▲) a partir do consumo de butanol (■), ácido butírico (●) catalisada por lipase pura de *Cercospora kikuchii* imobilizada em quitosana.... 178

FIGURA 58 - Formação do butirato de butila (▲) a partir do consumo de butanol (■), ácido butírico (●) catalisada por lipase pura de *Cercospora kikuchii* imobilizada em casca de arroz..... 179

FIGURA 59 - Supefície de resposta gerada pelo modelo ajustado aos dados experimentais..... 183

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Propriedades bioquímicas e cinéticas de lipases nas formas livre (EL) e imobilizada (EI) e estabilidade operacional (reuso) dos derivados imobilizados produzidos..... 25

TABELA 2 - Diferentes técnicas de imobilização de lipases e aplicação industrial dos derivados imobilizados produzidos..... 33

TABELA 3 - Microrganismos utilizados para produção de lipases e técnicas usadas para caracterização dos derivados imobilizados produzidos..... 40

TABELA 4 - Parâmetros operacionais fixados para a secagem em leito de jorro..... 73

TABELA 5 - Parâmetros operacionais fixados para a secagem em leito fluidizado..... 81

TABELA 6 - Formulação usada para imobilização da lipase utilizando a secagem por “spray drying”..... 82

TABELA 7 - Fornecedor da matéria-prima lipídica e agente acilante..... 85

TABELA 8 - Condições de operação para a determinação dos ésteres etílicos purificados..... 89

TABELA 9 - Variáveis independentes do planejamento experimental 2^2..... 91

TABELA 10 - Produção e caracterização bioquímica da lipase produzida pelo fungo *Cercospora kikuchii*..... 95

TABELA 11 Resumo do processo final de purificação de uma lipase produzida por *C. kikuchii*..... 96

TABELA 12 - Resultado da umidade relativa dos suportes utilizados para a imobilização das lipases de *Cercospora kikuchii* após a secagem em estufa a 105 °C..... 98

TABELA 13 - Características físicas dos subprodutos agroindustriais utilizados como suportes..... 99

TABELA 14 - Retenção da atividade enzimática das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* imobilizadas por adsorção em subprodutos agroindustriais utilizando estufa como método de secagem..... 101

TABELA 15 - Resultados da eficiência de imobilização, retenção da atividade enzimática, umidade e atividade de água das lipases imobilizadas por adsorção em subprodutos agroindustriais utilizando a liofilização como método de secagem..... 104

TABELA 16 - Resultado da imobilização de lipases em diferentes suportes (subprodutos agroindustriais) utilizando o "spray dryer" como equipamento de secagem..... 106

TABELA 17 - Resultado da imobilização das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* em subprodutos agroindustriais utilizando metaperiodato de sódio como agente ligante..... 112

TABELA 18 - Resultado da imobilização das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* em subprodutos agroindustriais utilizando epicloridrina como agente ligante..... 114

TABELA 19 - Retenção da atividade enzimática das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* imobilizadas em subprodutos agroindustriais utilizando leito de jorro como método de secagem..... 117

TABELA 20 - Caracterização do sistema enzima-suporte (glutaraldeído 1,5%) obtidos durante a secagem em leito de jorro no que se refere à umidade (base seca), determinada por estufa, Karl Fischer e atividade de água..... 118

TABELA 21 - Retenção da atividade enzimática e eficiência da imobilização das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* imobilizadas em subprodutos agroindustriais utilizando a estufa como método de secagem..... 120

TABELA 22 - Caracterização do sistema enzima-suporte (glutaraldeído 1,5% v/v) obtidos durante a secagem por estufa no que se refere à umidade (base seca) por estufa, Karl Fischer e atividade de água..... 121

TABELA 23 - Retenção da atividade enzimática (R_{AE}) e eficiência de imobilização (EI) das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* imobilizadas em subprodutos agroindustriais utilizando liofilização como método de secagem..... 123

TABELA 24 - Caracterização do sistema enzima-suporte (glutaraldeído 1,5%) obtidos durante a secagem em liofilizador no que se refere à umidade (base seca) e atividade de água..... 124

TABELA 25 - Resultado da análise elemental realizada para os suportes puros, suportes ativados e para os derivados imobilizados obtidos pelo uso do glutaraldeído (1,5% v/v) como agente ligante e leito de jorro como equipamento de secagem..... 131

TABELA 26 - Parâmetros bioquímicos e cinéticos da lipase livre e imobilizada nos subprodutos agrícolas ativados com glutaraldeído, epicloridrina e metaperiodato de sódio..... 134

TABELA 27 - Estabilidade à temperatura da atividade enzimática da lipase livre e imobilizada nos subprodutos agrícolas utilizando diferentes agentes ligantes..... 134

TABELA 28 - Composição química de biomassas lignocelulósicas utilizadas como suportes para imobilização da lipase..... 139

TABELA 29 - Resultados do processo de imobilização em microesferas de acetato de quitosana da lipase do fungo *C. kikuchii*: secagem em estufa e por liofilização..... 149

TABELA 30 - Retenção da atividade enzimática das lipases imobilizadas em quitosana e no período de armazenamento durante 6 meses a 5°C e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato..... 150

TABELA 31 - Resultados da imobilização e secagem do sistema enzima-suporte utilizando o leito fluidizado..... 153

TABELA 32 - Resultado da análise elemental realizada para quitosana pura, quitosana ativada e para os derivados imobilizados obtidos pelo uso do glutaraldeído (1,5% v/v) como agente ligante e leito fluidizado como equipamento de imobilização e secagem..... 154

TABELA 33 - Parâmetros bioquímicos e cinéticos da lipase livre e imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, epicloridrina e metaperiodato de sódio..... 156

TABELA 34 - Estabilidade à temperatura da atividade enzimática da lipase livre e imobilizada em quitosana utilizando diferentes agentes ligantes..... 156

TABELA 35 - Resultados da microencapsulação e secagem em “spray dryer” de lipase produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*..... 161

TABELA 36 - Resultados da microencapsulação e secagem em “spray dryer” de lipase produzidas pela levedura *Candida rugosa* (sigma)..... 162

TABELA 37 - Resultados da microencapsulação de lipases de origem fúngica em acetato de quitosana utilizando tripolifosfato como agente reticulante..... 162

TABELA 38 - Retenção da atividade enzimática das lipases imobilizadas em quitosana magnetizada no período de armazenamento e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato... 163

TABELA 39 - Resultado da imobilização das lipases produzidas pela levedura *Candida rugosa* em subprodutos agroindustriais utilizando diferentes agentes ligantes..... 166

TABELA 40 - Resultado da imobilização de lipase purificada produzida pelo fungo *C. kikuchii* em casca de arroz utilizando diferentes agentes ligantes..... 167

TABELA 41 - Resultado da imobilização de lipase purificada produzida pelo fungo *C. kikuchii* em quitosana utilizando diferentes agentes ligantes..... 167

TABELA 42 - Parâmetros bioquímicos e cinéticos da lipase purificada livre e imobilizada em casca de arroz e quitosana..... 168

TABELA 43 - Estabilidade à temperatura da atividade enzimática da lipase purificada livre e imobilizada em casca de arroz e quitosana..... 169

TABELA 44 - Propriedades físico-químicas do óleo de coco utilizado para a produção de biodiesel..... 170

TABELA 45 - Composição em ácidos graxos do óleo de coco utilizado para a produção de biodiesel..... 170

TABELA 46 - Perfil dos ésteres de etila nas amostras de biodiesel obtidas pela catalise lipase de *Cercospora kikuchii* imobilizada em casca de arroz..... 172

TABELA 47 - Perfil dos ésteres de etila nas amostras de biodiesel obtidas pela catalise lipase de *Cercospora kikuchii* imobilizada em quitosana..... 173

TABELA 48 - Rendimento de conversão pela analise em HPLC e propriedades do biodiesel..... 173

TABELA 49 - Composição em ésteres etilícos das amostras de biodiesel obtidas a partir de óleo de coco..... 177

TABELA 50 - Síntese de butirato de butila pela lipase purificada de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em quitosana usando leito de jorro para secagem..... 178

TABELA 51 - Síntese de butirato de butila pela lipase purificada de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em casca de arroz usando leito fluidizado na etapa de imobilização e secagem..... 179

TABELA 52 - Matriz do planejamento e resultados experimentais obtidos para a síntese do butirato de butila pela lipase de *C. kikuchii* imobilizada em Quitosana..... 180

TABELA 53 - Coeficientes de regressão, erro padrão e *p*-valor obtidos para o modelo de regressão ajustado aos resultados experimentais apresentados na Tabela 49..... 181

TABELA 54 - Análise estatística paa o modelo de regressão ajustado aos dados experimentais de produção de butirato de butila..... 182

TABELA A-1 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada em subprodutos agroindustriais por adsorção e secagem em estufa de convecção forçada de ar..... 218

TABELA A-2 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada em subprodutos agroindustriais por adsorção e secagem em liofilizador..... 219

TABELA A-3 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada em subprodutos agroindustriais por adsorção e secagem em "spray dryer"..... 220

TABELA A-4 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada em subprodutos agroindustriais por adsorção: comparação da secagem em liofilizador, "spray dryer" e estufa..... 221

TABELA A-5 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em subprodutos agroindustriais utilizando metaperiodato de sódio e secagem em leito de jorro..... 222

TABELA A-6 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em subprodutos agroindustriais utilizando epicloridrina e secagem em leito de jorro..... 223

TABELA A-7 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em subprodutos agroindustriais utilizando glutaraldeído e secagem em leito de jorro..... 224

TABELA A-8 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em subprodutos agroindustriais utilizando glutaraldeído e secagem em estufa..... 225

TABELA A-9 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em subprodutos agroindustriais utilizando glutaraldeído e secagem em liofilizador..... 226

TABELA A-10 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada em quitosana: secagem em estufa e liofilizador..... 227

TABELA A-11 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em quitosana e secagem em leito fluidizado..... 227

TABELA A-12 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em quitosana utilizando glutaraldeído: comparação dos secadores..... 228

TABELA A-13 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada em quitosana magnetizada e secagem em "spray dryer": comparação das formulações de secagem..... 228

TABELA A-14 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. rugosa* imobilizada em quitosana magnetizada e secagem em "spray dryer": comparação das formulações de secagem..... 229

TABELA A-15 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. rugosa* imobilizada em subprodutos agroindustriais e secagem em leito de jorro.... 229

TABELA A-16 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase purificada de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em casca de arroz e secagem em leito de jorro..... 230

TABELA A-17 - Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase purificada de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em quitosana e secagem em leito fluidizado..... 230

SUMÁRIO

RESUMO..... i
ABSTRACT..... ii
LISTA DE FIGURAS..... iii
LISTA DE TABELAS..... VIII
1. INTRODUÇÃO..... 1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 5
2.1 Lipase: definição e classificação..... 6
2.1.1 Aplicação de lipases..... 8
2.1.2 Origem das lipases..... 14
2.1.3 *Cercospora kikuchii*..... 15
2.1.4 Imobilização de enzimas..... 17
2.1.5 Propriedades das enzimas imobilizadas..... 22
2.1.6 Lipases imobilizadas..... 31
2.1.7 Secagem de enzimas em processos de imobilização..... 43
2.1.7.1 Influência do conteúdo de água na aplicabilidade dobiocatalisador..... 46
2.2 Relevância do tema..... 48
3. OBJETIVOS..... 52
3.1 Objetivo geral..... 53
3.2 Objetivos específicos..... 53
4. MATERIAL E MÉTODOS..... 54
4.1 Etapas envolvidas na preparação dos suportes e imobilização da lipase 55
4.2 Reagentes e equipamentos..... 59
4.3 Produção, recuperação e avaliação da atividade da lipase..... 61
4.3.1 Microrganismo, manutenção da cepa e condições de cultivo..... 61
4.3.2 Separação e purificação..... 62
4.3.2.1 Recuperação, concentração e diálise do fluido de cultura.... 62
4.3.2.2 Cromatografia em coluna de interação hidrofóbica..... 62
4.3.2.3 Cromatografia de gel filtração..... 63
4.3.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS..... 63
4.3.3 Avaliação da atividade enzimática..... 63
4.3.3.1 Substrato: *p*-NPP..... 63
4.3.3.2 Substrato: azeite de oliva..... 64
4.3.3.3 Retenção da atividade enzimática (R_{AE})..... 65
4.3.4 Determinação de proteínas totais..... 65
4.4 Avaliação de protocolos para imobilização da lipase 66
4.4.1 Suporte: Subprodutos agroindustriais..... 66

4.4.1.1 Caracterização física dos suportes agroindustriais..... 67
4.4.1.1.1 Distribuição de tamanho de partículas..... 67
4.4.1.1.2 Determinação da umidade residual (base seca)... 67
4.4.1.1.3 Determinação da área superficial, volume e tamanho dos poros..... 67
4.4.1.1.4 Caracterização química dos suportes agroindustriais..... 68
4.4.2 Protocolos de imobilização da lipase em subprodutos agroindustriais..... 68
4.4.2.1 Imobilização por adsorção..... 69
4.4.2.1.1 Secagem em estufa com convecção forçada..... 69
4.4.2.1.2 Secagem por liofilização (“freeze drying”)..... 70
4.4.2.1.3 Secagem por nebulização (“spray drying”)..... 71
4.4.2.2 Imobilização por ligação covalente..... 72
4.4.2.2.1 Ativação dos suportes e imobilização das lipases 72
4.4.2.2.2 Secagem por leito de jorro..... 73
4.4.2.2.3 Secagem em estufa com convecção forçada..... 74
4.4.2.2.4 Secagem por liofilização (“freeze drying”)..... 75
4.5 Protocolo para imobilização da lipase em microesferas de Quitosana..... 75
4.5.1 Preparo das microesferas de acetato de quitosana..... 76
4.5.1.1 Secagem e Imobilização da lipase..... 78
4.5.1.1.1 Estufa com convecção forçada..... 78
4.5.1.1.2 Liofilização..... 79
4.5.1.1.3 Leito fluidizado..... 80
4.5.1.1.4 Imobilização por encapsulação..... 81
4.5.1.1.4.1 Síntese das partículas magnéticas..... 81
4.5.1.1.4.2 Imobilização em acetato de quitosana magnetizada – “Cross-linking”..... 81
4.5.1.1.4.3 Imobilização em quitosana magnetizada por “spray drying”..... 82
4.5.2 Caracterização física dos derivados imobilizados obtidos..... 82
4.5.2.1 Determinação da umidade residual (base seca)..... 82
4.5.2.2 Determinação da atividade de água (A_w)..... 83
4.5.2.3 Análise morfológica dos derivados imobilizados por MEV.... 83
4.5.2.4 Análise elemental CHN..... 83
4.5.2.5 Análise de infravermelho por transformada de Fourier..... 84
4.5.3 Caracterização das propriedades bioquímicas e cinética dos derivados imobilizados obtidos..... 84
4.5.3.1 Determinação dos parâmetros cinéticos e de estabilidade: lipase livre X lipase imobilizada..... 84

4.5.3.1.1 Determinação da temperatura ótima e termoestabilidade..... 84
4.5.3.1.2 Determinação do pH ótimo..... 85
4.5.3.1.3 Determinação dos parâmetros cinéticos – K_m e V_{max}..... 85
4.6 Avaliação do potencial de aplicação biotecnológica dos derivados imobilizados produzidos..... 85
4.6.1 Matéria-prima lipídica e agente acilante..... 85
4.6.2 Síntese do biodiesel..... 86
4.6.2.1 Separação do biocatalisador e purificação dos ésteres de etila..... 87
4.6.2.2 Métodos analíticos..... 87
4.6.2.2.1 Caracterização das propriedades das matérias-primas lipídicas..... 87
4.6.2.2.2 Determinação do perfil em ácidos graxos da matéria lipídica..... 88
4.6.2.2.3 Determinação dos ésteres etílicos por cromatografia de fase gasosa..... 88
4.6.2.2.4 Quantificação de monoglicerídeo e diglicerídeo..... 89
4.6.2.2.5 Ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^{1}H)..... 90
4.6.3 Síntese de butirato de butila..... 90
6.6.3.1 Influência da massa de enzima imobilizada e da temperatura..... 91
6.6.3.2 Métodos analíticos..... 91
6.6.3.2.1 Teor de ácido graxo..... 91
6.6.3.2.2 Teor de álcool e éster..... 91
4.7 Tratamento dos dados obtidos a partir dos protocolos de imobilização.. 92
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 93
5.1 Produção, purificação e caracterização bioquímica das lipases produzidas pelo fungo *Cercospora kikuchii*..... 94
5.2. Caracterização física dos suportes agroindustriais 96
5.2.1 Distribuição granulométrica..... 97
5.2.2 Umidade residual..... 98
5.2.3 Determinação da área superficial, porosidade e densidade..... 98
5.3 Imobilização por adsorção..... 100
5.3.1 Secagem em estufa..... 100
5.3.2 Secagem por liofilização..... 103
5.3.3 Secagem por “spray drying”..... 105
5.4 Imobilização por ligação covalente..... 111
5.4.1 Secagem em leito de jorro..... 111
5.4.1.1 Agente ligante: metaperiodato de sódio..... 111

5.4.1.2 Agente ligante: epicloridrina..... 113
5.4.1.3 Agente ligante: glutaraldeído..... 116
5.4.2 Secagem em estufa de convecção forçada..... 119
5.4.3 Secagem por liofilização (“freeze drying”) 122
5.5 Caracterização do sistema enzima-suporte..... 125
5.5.1 Análise por microscopia eletrônica de varredura..... 125
5.5.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier..... 127
5.5.3 Análise elemental (CHN) 131
5.5.4 Determinação dos parâmetros cinéticos..... 132
5.6 Suporte: quitosana..... 148
5.6.1 Imobilização por encapsulação: quitosana magnetizada..... 160
5.7 Imobilização de lipases purificadas..... 165
5.7.1 Determinação dos parâmetros cinéticos e de estabilidade..... 168
5.8 Avaliação do potencial de aplicação industrial..... 169
5.8.1 Síntese de biodiesel..... 169
5.8.1.1 Composição química em ácidos graxos da matéria-prima lipídica..... 169
5.8.1.2 Etanólise dos óleos vegetais..... 170
5.8.2 Síntese de aromas: butirato de butila..... 177
6. CONCLUSÕES..... 184
6.1 Caracterização dos suportes agroindustriais..... 186
6.2 Protocolos para imobilização de lipase em subprodutos agroindustriais.. 186
6.2.1 Imobilização por adsorção..... 186
6.2.2 Imobilização por ligação covalente..... 187
6.3 Protocolos para imobilização de lipases em microesferas de quitosana.. 188
6.4 Protocolos para imobilização de lipases em quitosana magnetizada..... 189
6.5 Protocolo de imobilização de lipases purificadas..... 189
6.6 Caracterização físico-química dos derivados imobilizados..... 190
6.7 Avaliação do potencial de aplicação biotecnológica..... 191
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 192
APÊNDICE..... 217

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Desde que o homem se organizou e passou a viver em sociedade, o uso das enzimas tornou-se uma prática constante, mesmo que de modo empírico, para produção de bebidas e alimentos. Somente com o desenvolvimento do interesse científico, estimulado pela ânsia do conhecimento, que ocorreu a identificação e caracterização dessas biomoléculas. Foram vários os cientistas que deram os passos iniciais para o esclarecimento da natureza das enzimas, destacando já naquela época o caráter inter e pluridisciplinar desse tipo de estudo. Trabalhos como o desenvolvimento do microscópio pelo holandês Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723), do fisiologista Wilheln Friedrich Kühne (1837-1900) com sucos gástricos (tripsina) que digeriam proteínas e do pai da microbiologia Louis Pasteur (1822-1895) que identificou os microrganismos responsáveis pelas fermentações, tiveram forte peso para o desenvolvimento da enzimologia. Entretanto, até os trabalhos desses renomados cientistas acreditava-se, por exemplo, que as leveduras eram responsáveis pela fermentação do açúcar a álcool e que essa transformação era catalisada por fermentos, cuja ação dependia exclusivamente da existência de células vivas. Essa ideia mudou com o trabalho de Eduard Büchner (1860-1917) o qual mostrou que extratos fermentados eram capazes de transformar açúcar a álcool independentemente dos microrganismos produtores. Esse trabalho foi um marco para a bioquímica e abriu portas para outros cientistas isolarem diferentes enzimas e estudarem suas propriedades.

A partir dos estudos das enzimas, a enzimologia, foi possível chegar ao desenvolvimento da Tecnologia Enzimática. Um fato que exemplifica o elo existente entre a geração de conhecimento e sua aplicação tecnológica foi que a tripsina estudada por Kühne em 1876 foi utilizada por Otton Röhn em 1913 em formulação de biodetergentes.

A utilização de enzimas como catalisador evoluiu expressivamente nos últimos anos. Isso é uma decorrência direta do desafio imposto a nós de termos uma sociedade moderna baseada na combinação do desenvolvimento econômico e a preservação do meio ambiente. Assim a tecnologia enzimática pode caminhar de forma paralela com a bioeconomia, a qual se apresenta como uma economia ecológica e socialmente sustentável. Desta forma, a utilização da inovação, através do uso de tecnologias limpas, deve ser a ligação entre a economia e o meio

ambiente, diminuindo os impactos ambientais sem o comprometimento da competitividade das empresas. O Brasil é um dos países que mais pode se beneficiar com o desenvolvimento da tecnologia enzimática nacional. Isso se deve a enorme quantidade de matérias-primas renováveis que podem ser transformadas, por via enzimática, em produtos com alto valor agregado e úteis para setores estratégicos da economia.

A alta eficiência catalítica, alto grau de especificidade e a capacidade de acelerar reações químicas específicas sem a formação de subprodutos indesejáveis são aspectos que contribuem para o emprego acelerado destes biocatalisadores em vários ramos da indústria. Dentre as enzimas de interesse industrial, destacam-se as lipases que atuam tanto em processos de síntese como de hidrólise. Além disso, as lipases possuem especificidade comprovada, fornecendo produtos que não poderiam ser obtidos por processos químicos convencionais. Esta habilidade catalítica tem sido aplicada na modificação de óleos e gorduras, síntese de compostos orgânicos, em formulações de detergentes, procedimentos analíticos, tratamento de resíduos ricos em gordura, entre outras (SAXENA et al., 1999).

As lipases podem ser obtidas principalmente de glândulas de animais, de sementes, látex e tecidos vegetais. Entretanto, as lipases mais utilizadas industrialmente são em sua maioria de origem microbiana, com destaque para aquelas produzidas por leveduras.

A nova era da biocatálise, atualmente amparada pela biossustentabilidade coloca, sem dúvida, as lipases como biocatalisadores do futuro e a grande biodiversidade brasileira, principalmente de microrganismos, justifica a busca por novos produtores de enzimas com características especiais, que possam ser aplicadas nos segmentos industriais que necessitam dessa tecnologia. Este trabalho tem como foco a utilização de um fungo endofítico, *Cercospora kikuchii*, como produtor da enzima em estudo. É importante ressaltar, que até o presente momento, nosso grupo de pesquisa destaca-se como um dos poucos que utiliza microrganismo endofítico como fonte produtora de lipases.

O uso de enzimas tem muitas aplicações industriais sendo, no entanto, limitado por sua relativa instabilidade em solução, custos elevados de isolamento e purificação e a dificuldade técnico-econômica de recuperação para reutilização da

enzima ativa após término do processo catalítico. A imobilização de enzimas permite a reutilização em conversões repetidas e possibilita o desenvolvimento de processos tecnológicos contínuos. Logo, o uso de enzima imobilizada pode aumentar o volume de produção e reduzir o preço dos produtos.

Diante do que foi apresentado, este trabalho teve como objetivo geral o estudo da utilização de suportes não convencionais, dentre estes incluem-se subprodutos agroindustriais, para imobilizar lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*, investigando-se também a viabilidade de diferentes métodos de secagem como estufa por convecção forçada, liofilização, “spray drying”, leito de jorro e leito fluidizado nas operações de imobilização.

2. Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipase: definição e classificação

Enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, significativamente superiores aos catalisadores produzidos pelo homem. Praticamente todas as reações metabólicas são catalisadas por enzimas (CAMPBELL, 2000).

Neste contexto destacam-se as lipases, enzimas que catalisam reações de substratos insolúveis em água (ALVAREZ-MACARIE et al., 1999) e a hidrólise de acilgliceróis para ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (MAHADIK et al., 2002). Sob certas condições, as lipases também catalisam reações de esterificações, transesterificações (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade (CHOWDARY et al., 2001; ZHANG et al., 2001). As lipases (E.C.3.1.1.3) têm sido definidas como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila constituída por mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são denominadas genericamente como esterases (PANDEY et al., 2000). O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), pode ser controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional (PANDEY et al., 1999; GANDHI, 1997).

As lipases são enzimas que apresentam um mecanismo de atuação chamado de ativação interfacial que pode diferir do clássico Michaelis-Menten. A ativação interfacial pode ser explicada pela estrutura tridimensional e o sítio ativo da enzima. O sítio ativo da lipase é caracterizado pela tríade composta de serina, histidina e ácido glutâmico/aspártico (Figura 1A). Em meios aquosos e na ausência de solventes orgânicos e interface hidrofóbica, os sítios ativos das lipases apresentam uma conformação fechada e possuem baixa atividade (Figura 1B - “lid” na posição verde). Por outro lado, no meio reacional acessível ao substrato, o sítio ativo esta aberto expondo a sua zona hidrofóbica que interage com a interface lipídica e apresenta a conformação aberta com alta atividade (DEREWENDA et al.,1992)

(Figura 1B - “lid” na posição laranja). Quando está na conformação fechada a superfície da tampa que cobre o sítio ativo apresenta uma grande área hidrofílica, ilustrado na Figura 1C como a região vermelha. Na presença da interface óleo/água a lipase encontra-se na conformação aberta expondo assim uma maior região hidrofófica ao redor do sítio ativo, como mostrado na região azul da Figura 1D. Esse aumento da região hidrofóbica auxilia na atividade catalítica da enzima uma vez que facilita o acesso ao substrato.

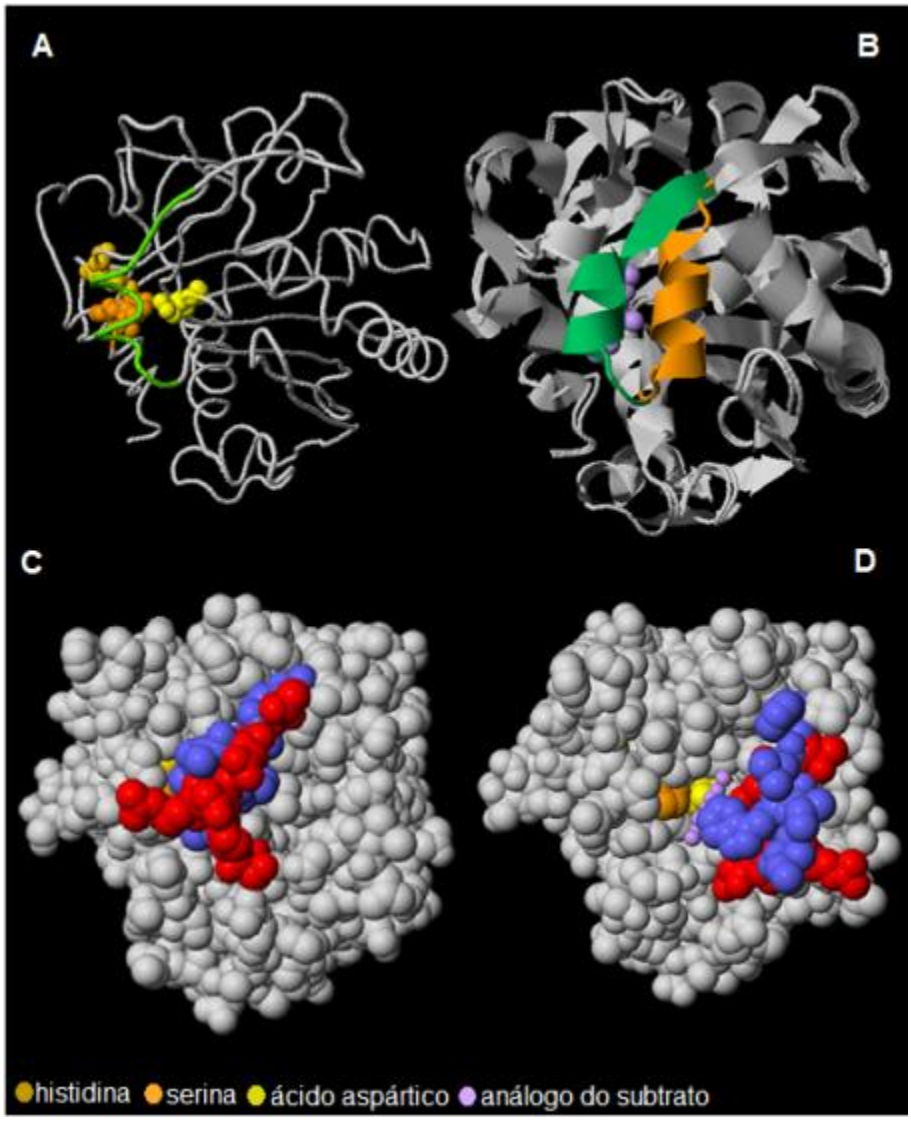


Figura 1. Estrutura geral de uma lipase do fungo *Rhizomucor miehei*: A) tríade catalítica: serina, histidina e ácido aspártico; B) Conformação aberta (lid na posição laranja) e conformação fechada (lid na posição verde); C) Região hidrolítica da forma fechada – área vermelha; D) Região hidrofóbica da forma aberta – área azul. (Disponível em: www.biochem.arizona.edu/classes/bioc463a/molecular_graphics_gallery/jmol/Lipase_kenneth_A/lipase.html)

2.1.1 Aplicação de lipases

Recentemente, as lipases assumiram um lugar de destaque no mercado mundial de enzimas, evidenciado pelo aumento da quantidade de informação reportada na literatura, que registra uma média de 1000 publicações por ano. Depois das proteases e amilases, as lipases são consideradas o terceiro grande grupo em volume de vendas, movimentando bilhões de dólares. Essa posição se deve tanto à sua versatilidade de aplicação quanto à relativa facilidade de produção em larga escala, tornando-as especialmente atrativas para aplicações industriais (HASAN et al., 2006; JAEGER, REETZ, 1998; TAIPA et al., 1992).

As lipases possuem grande potencial de aplicações em diversos segmentos industriais, destacando-se:

Indústria de alimentos

As lipases microbianas têm sido extensivamente utilizadas para a obtenção de ácidos graxos livres a partir da hidrólise seletiva de óleos e gorduras presentes em diversos alimentos. Os ácidos graxos livres podem ou não sofrer modificações químicas e, dependendo do tamanho da cadeia carbônica e do grau de insaturação, conferem um peculiar sabor e aroma para os alimentos, representando um importante papel nas propriedades físico-químicas, organolépticas e nutricionais de diversos produtos (JAEGER, REETZ, 1998).

A literatura reporta a hidrólise do óleo de fígado de bacalhau para a produção de ácidos graxos ômega 3 – insaturados, destinados às dietas de grupos clínicos especiais (PANDEY et al., 1999). O enriquecimento de óleos com ácidos graxos poliinsaturados, como por exemplo, ácido linolênico, confere a estes atividades anti-carcinogênicas e anti-escleróticas, sendo chamados atualmente de alimentos funcionais ou nutracêuticos (MARTINS, 2007).

Na indústria de laticínios, as lipases são empregadas para a hidrólise da gordura do leite. As aplicações incluem a melhoria do sabor e a aceleração do processo de cura de queijos, manufatura de produtos similares ao queijo e lipólise da manteiga e creme de leite. As fontes tradicionais de lipases para a indústria de queijos são os tecidos animais, principalmente glândulas (pâncreas e fígado) e

tecidos pré-gástricos de ruminantes jovens. Atualmente são utilizados vários preparados microbianos de lipases, desenvolvidos especialmente para a manufatura de queijos, como por exemplo, aquelas produzidas por *Aspergillus niger, A. oryzae* e *Mucor miehei* (SAID; PIETRO, 2004).

Indústria de papel e celulose

As lipases encontram forte aplicação na indústria de papel e celulose. Os componentes hidrofóbicos denominados “Pitch” (triglicerídeos e ceras encontradas na madeira), causam grandes problemas na manufatura do papel, tais como redução da produção, aumento do custo de manutenção e operação e redução da qualidade. Estas enzimas têm sido utilizadas na remoção destes componentes da polpa, sendo que lipases de *C. rugosa*, empregadas em uma indústria japonesa, chegam a hidrolisar 90,0% dos triglicerídeos encontrados na madeira (JAEGER; REETZ, 1998).

Indústria de detergentes

Em termos comerciais, o setor de maior importância para as aplicações das lipases é a indústria de detergentes. Aproximadamente 1000 toneladas de lipases são adicionadas a 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos a cada ano. Competem diretamente com os tensoativos normalmente empregados, por sua maior eficiência na remoção de manchas em superfícies e em tecidos, pela menor temperatura necessária à lavagem e por ser biodegradável (MARTINS, 2007; MENDES et al., 2005).

A história da utilização de enzimas em formulações de detergentes começou no início do século XX quando Röhm (1913) desenvolveu o primeiro método de lavagem de tecidos com detergentes que continham enzimas, fabricando a primeira formulação desses detergentes. A empresa de Röhm patenteou o produto em 1913 e a preparação foi comercializada até os anos sessenta. A formulação do produto baseava-se na tripsina, uma enzima digestiva produzida no pâncreas de mamíferos. O produto não obteve grande sucesso, pois a tripsina não era suficientemente ativa em líquidos fortemente alcalinos (pH maior que 9,0), obtidos pela diluição do detergente. Em 1959, ocorreu um desenvolvimento marcante na indústria de

detergentes. O químico suíço Jaag, que trabalhou para a companhia de detergentes Gebrüder Schnyder, em Biel na Suíça, desenvolveu um produto novo denominado Bio 40, que continha uma protease bacteriana em substituição à tripsina. Embora a protease bacteriana fosse mais adequada ao propósito industrial, esse ainda não era o produto ideal. Em 1962, a empresa Novo Nordisk lançou no mercado um produto denominado Alcalase®. A ação dessa protease alcalina obtida de microrganismos não era afetada por outros componentes do detergente e era eficaz nas temperaturas desejadas. O primeiro grande sucesso de marketing de um detergente formulado com enzimas foi o Biotex, que continha Alcalase® e foi produzido pela Kortman& Schulte (atualmente Kortman Intradal) em colaboração com Gebrüder Schnyder. O sucesso desse produto marcou uma real inovação na utilização de enzimas em detergentes.

Síntese orgânica

Recentemente foi evidenciado o esforço da indústria farmacêutica em produzir compostos opticamente puros, em detrimento da produção das misturas racêmicas, que por sua vez pode produzir uma série de implicações, como a ocorrência de efeitos colaterais indesejados ou mesmo baixa eficácia do produto. Isto ocorre porque grande parte dos fármacos sintetizados possui um ou mais centros quirais, sendo comercializados em sua grande maioria na forma de misturas racêmicas (ALONSO, 2007; XIN et al., 2001; HUTT et al., 1984).

Usando a estereosseletividade das lipases, ácidos e álcoois racêmicos podem ser resolvidos através de reação de esterificação e transesterificação. Esta crescente consciência da importância da quiralidade na atividade biológica tem estimulado a busca por métodos de síntese industrial de enantiômeros puros, como anti-inflamatórios, agentes anti-hipertensivos inibidores de enzimas conversoras de angiostensina e bloqueadores de canais de cálcio (TREVISAN, 2004; GHOSH et al., 1996; CARVALHO et al., 2005; RUBINI et al., 2005).

Reações de transesterificação e produção de biodiesel

As fontes limitadas de combustíveis fósseis, o aumento do preço do petróleoe a crescente preocupação ambiental têm sido as principais razões para a exploração

de óleos vegetais para a produção de combustíveis alternativos (HASAN; SHAH;HAMEED, 2006).

O biodiesel é definido como o derivado mono-alquil éster deácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ciclo diesel. Apresentam potencial promissor no mundo inteiro, não só pela sua enorme contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental, mas também pela geração de energia renovável em substituição ao óleo diesel e outros derivados do petróleo.

A Lei número 11.097 de 13 de janeiro de 2005 regulamenta que, em 2013, todos os veículos de transporte de cargas do Brasil serão obrigados a usar o combustível conhecido como B5, ou seja, uma composição de 95% de óleo diesel e 5% de biodiesel. No início de 2010, a produção de biodiesel atingiu 231 milhões de litros, considerada um recorde brasileiro. As matérias-primas utilizadas na produção deste biocombustível são óleo de soja (82,9 %), gordura bovina (12,1 %), óleo de algodão (2,4 %) e outros materiais graxos (2,6 %). O centro-oeste é a região que concentra a maior produção de biodiesel (42,6 %), seguido pela região sul (23,2 %), sudeste (18,5 %), nordeste (11,1 %) e norte (4,6 %) (BRASIL, 2010).

A quantidade de matéria-prima para o biodiesel brasileiro é extremamente grande. As regiões mais quentes do País são propicias para o cultivo de mamona, dendê (palma), babaçu, amendoim, coco, pinhão manso, girassol, algodão e soja.

O processo de produção do biodiesel requer passos adicionais de neutralização e lavagem para redução do teor de substâncias indesejáveis no produto final, além de não permitir a recuperação do catalisador utilizado. Entre os processos testados para contornar estes problemas, a utilização de enzimas, mais precisamente lipases, é um dos mais promissores na produção do biodiesel por transesterificação (MOREAU et al.,2008). A lipase, quando em meio alcoólico não promove a hidrólise dos lipídios, mas a alcoólise (transesterificação). Ou seja, quando na ausência de água, usa o álcool presente no meio para promover sua reação. A catálise enzimática abole a necessidade de neutralização e lavagem do biodiesel, além de facilitar a recuperação da glicerina. Adicionalmente, as enzimas utilizadas como catalisadores podem ser recuperadas, desde que, na maioria dos

processos propostos, elas sejam imobilizadas em suportes adequados, permitindo a insolubilização do catalisador. Além disso, o procedimento gera outro produto de grande valor comercial, o glicerol.

Os álcoois mais frequentemente utilizados como aceptores de grupamentos acila são, particularmente o metanol e, em menor extensão o etanol. O metanol é mais utilizado por ser mais barato e mais reativo. Por outro lado, o etanol é menos tóxico e é renovável, ao contrário do metanol, que é atualmente produzido principalmente de fontes fósseis não-renováveis, como o gás natural. Destaca-se ainda que, no Brasil, existe uma maior disponibilidade do álcool de cana (maior produtor mundial de etanol), tornando importante a sua aplicação na produção de biodiesel.

Assim, o biodiesel é considerado um possível substituto para o diesel convencional, visto que é composto por metil ou etil éster que podem ser produzidos a partir de triacilglicerol presentes em óleos vegetais por reações de transesterificação com metanol ou etanol (MEHER et al., 2006; LARA et al., 2004; VILLENEUVE et al., 2000; SCHUCHARDT et al., 1998). Assim, o crescimento do setor de produção de biocombustíveis acarretará um considerável aumento no consumo de lipases.

Produção de aromas

Embora sua função natural seja a de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ésteres a partir de álcoois e ácidos carboxílicos. Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para efetuar reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes empregados.

O mercado mundial para compostos de aroma está avaliado em 3 bilhões de dólares, aproximadamente um quarto do valor total do mercado de aditivos alimentares (VULFSON, 1993). Devido à complexidade de muitos aromas naturais, tanto em relação à composição como estrutura química individual, a aplicação de métodos biotecnológicos, particularmente enzimáticos, na produção destes produtos

tem atraído muita atenção nas últimas décadas. Adicionalmente, aromas produzidos biotecnologicamente podem ser caracterizados como "naturais" ou "idênticos ao natural" e portanto, são preferidos pelo mercado consumidor (MACEDO; PASTORE, 1997). Síntese de diferentes aromas por lipases é bem conhecida, mas até agora todas as reações realizadas para escala industrial foram através do uso de lipases produzidas por *Mucor miehei* e *Candida rugosa* (ABBAS; COMEAU, 2003.)

A presença de aromas agrega valor ao produto, o que significa que o custo da biocatálise passa a ser menos impactante. Processos biotecnológicos têm-se estabelecido nas indústrias de aroma para produção de aromatizantes naturais, destacando-se o emprego das lipases nesse processo (GATFIELD, HOLZMINDEN, 1995).

Aplicação na área ambiental

A adoção de um maior rigor nos padrões de descarte de águas residuárias tem motivado a realização de pesquisas, cujo objetivo central é a redução do impacto ambiental, especialmente em efluentes contendo elevados teores de lipídeos, como os provenientes de laticínios, matadouros e avícolas, enlatados, extração de óleos e gorduras, entre outros. A Política Nacional de Recursos Hídricos, instituída pela Lei Federal nº 9.433 de 8 de janeiro de 1997 trata da cobrança pelo uso dos corpos d'água para o lançamento de despejos líquidos (MENDES et al., 2005). Os lipídeos contidos nesses efluentes, além de representarem uma perda industrial importante, interferem negativamente nos Sistemas de Tratamento de Efluentes. Elevadas concentrações de lipídeos resultam na formação de lodos com diferentes características físicas e reduzida atividade hidrolítica devido à flotação dessa biomassa, aumento do tempo de retenção hidráulica desses efluentes nas lagoas de estabilização, redução da capacidade de aeradores e elevada demanda de agentes floculantes (MENDES et al., 2005).

Dentro deste contexto, processos alternativos vêm sendo utilizados na redução da concentração de lipídeos contidos nesses efluentes por meio de ação de enzimas, particularmente lipases. Essas enzimas apresentam uma importância particular, pelo fato de hidrolisarem especificamente óleos e gorduras, o que pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor destes compostos.

Além disso, também podem ser utilizadas na remoção de depósitos de gorduras que se formam em tubulação de água quente, bebidas e outros alimentos líquidos. A aplicação de microrganismos produtores de lipases na degradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo também é sugerida como uma alternativa de biorremediação (HASAN, et al., 2006; PANDEY et al., 1999).

É importante ressaltar que muitas das aplicações das lipases citadas anteriormente estão em fase de desenvolvimento, e se encontram em número bastante reduzido em relação às possibilidades de utilização destas enzimas no futuro. A sua plena utilização ainda esbarra na necessidade de redução dos custos dos processos de produção e purificação, na busca por novas cepas produtoras, no melhoramento genético destas cepas, além da mutagênese sítio dirigida ou da modificação química das lipases afim de serem produzidas maiores quantidades destas enzimas em menor intervalo de tempo e com propriedades adequadas para o processamento industrial (MARTINS, 2007).

2.1.2 Origem das lipases

Tradicionalmente, as lipases eram obtidas a partir do pâncreas de animais. A descoberta foi feita por Claude Bernard em 1856, e anos mais tarde, o interesse pelas lipases microbianas cresceu significativamente, principalmente devido às dificuldades de acesso ao material de origem animal (HASAN et al., 2006). As lipases são originárias de grande número de bactérias, fungos, plantas e animais, sendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência (SAXENA, 2003).

As lipases provenientes de microrganismos, constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, e facilidade de produção em larga escala, sendo um dos grupos de enzimas mais utilizados no segmento industrial (ALONSO, 2007). Além disto, diferentemente das enzimas vegetais e animais, as de origem microbiana não sofrem influência das intempéries climáticas, uma vez que são produzidas em fermentadores onde as condições de cultivo são controladas (BURKERT, 2002; BURKERT et al., 2004).

Do ponto de vista industrial, os fungos são os preferidos como fontes de lipases, por geralmente produzirem enzimas extracelulares, o que facilita sua extração do meio fermentado, além de serem considerados, em alguns casos, microrganismos seguros para aplicação nas indústrias de alimentos, bebidas e farmacêutica (MAHADIK et al., 2002). Dentre os fungos, destacam-se aqueles que vivem no interior de plantas, denominados fungos endofíticos, que vêm despertando bastante interesse em aplicações biotecnológicas (ARNOLD et al., 2000; CANNON, SIMMONS, 2002; STROBEL et al., 2004; DREYFUSS, CHAPELA, 1994).

A existência de fungos no interior de tecidos vegetais sadios já é conhecida há muito tempo. Porém somente a partir da década de 70, com os estudos de Berstein e Carroll (1977) e Carroll e Carroll (1978), nos quais várias espécies de fungos endofíticos foram recuperadas de acículas sadias de várias coníferas, ocorreu o despertar para estudos com endófitos. O interesse em estudar fungos endofíticos vem aumentando nos últimos anos, com destaque para a avaliação de seu potencial como produtores de metabólitos tanto primários quanto secundários com atividade biológica, para aproveitamento em vários segmentos industriais (SCHULZ et al., 2002; STROBEL, 2002; AZEVEDO et al., 2000; OSBOURN, 2001).

2.1.3 *Cercospora kikuchii*

Algumas das fontes fúngicas mais importantes para a produção comercial de lipase pertencem aos gêneros *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp., *e Rhizomucor* sp. A produção de lipase por fungos varia de acordo com a cepa, composição do meio de cultura, pH, temperatura, e tipo de fontes de carbono e nitrogênio usadas (CIHANGIR, SARIKAYA, 2004).

A demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características catalíticas estimula o isolamento e seleção de novas cepas. Microrganismos produtores de lipase têm sido encontrados em diferentes habitats, tais como os resíduos industriais, fábricas de processamento de óleos vegetais, fábricas de laticínios e solo contaminado com óleo de sementes de oleaginosas, entre outros (SHARMA et al., 2001).

O fungo utilizado neste trabalho foi o *Cercospora kikuchii*. Este fungo é isolado na maioria das vezes como um fitopatógeno, principalmente plantações de soja.

Entretanto, a cepa utilizada neste trabalho foi isolada como sendo endofítico da planta *Tithonia diversifolia* (Figura 2), conhecida também como girassol mexicano. Este é o primeiro relato de isolamento desse fungo como endofítico e a sua associação com plantas oleaginosas pode explicar a sua capacidade de produzir lipases (COSTA-SILVA, 2010).

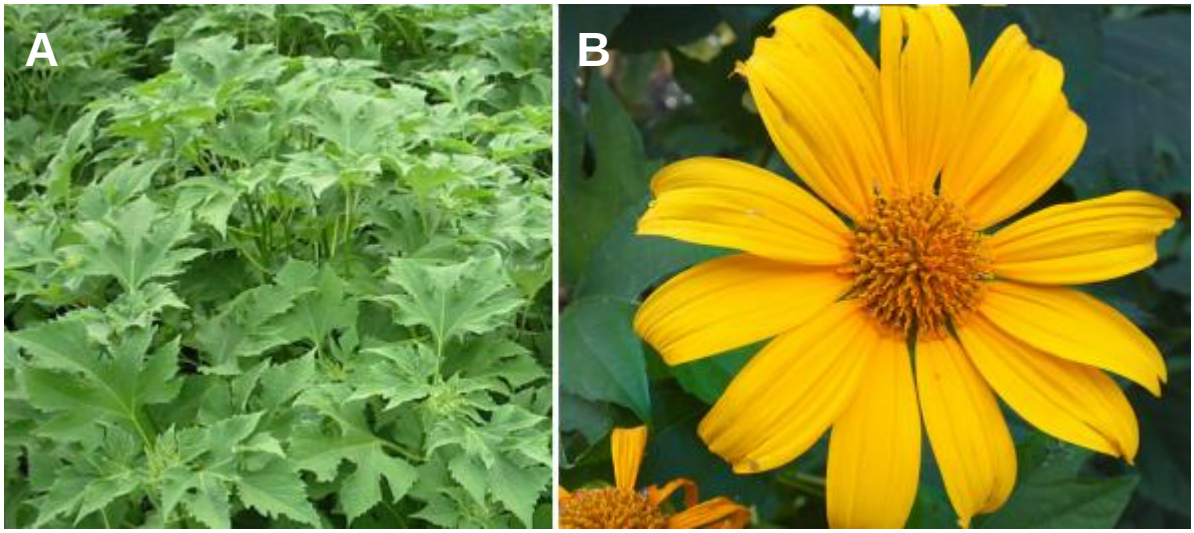


Figura 2. Girassol mexicano, *Tithonia diversifolia.* Vista parcial da planta (A) e suas flores (B) (Fonte: LUSTOSA, 2005).

Este fungo causa a doença denominada mancha púrpura em sementes de soja e penetra no tegumento da semente pelo funículo (Figura 3). O patógeno ataca todas as partes da planta e pode ser responsável por severas reduções no rendimento e na qualidade da semente (ALMEIDA et al*.,* 1997).

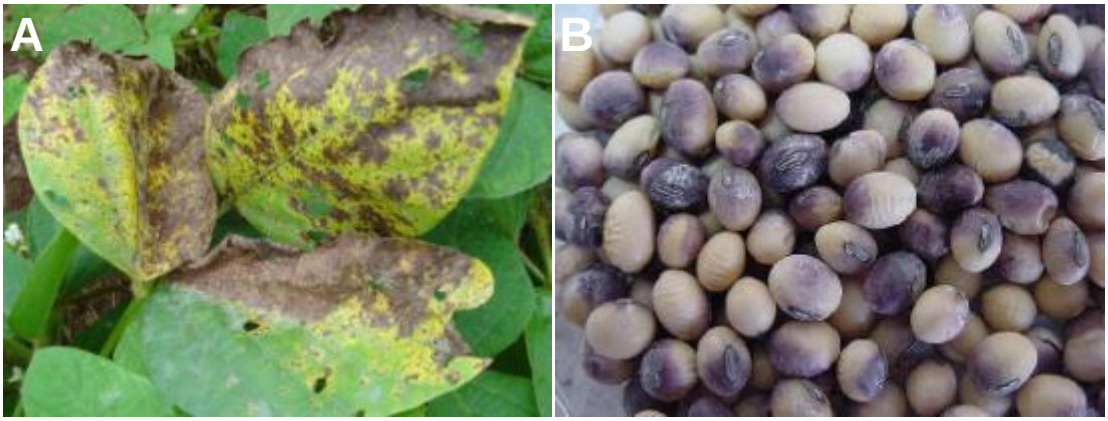


Figura 3. Doenças causadas pela infecção do fungo *Cercospora kikuchii* em soja. Crestamento foliar (A) e mancha púrpura nas sementes (B) (Fonte: GIESLER, 2013).

2.1.4 Imobilização de enzimas

Apesar das inúmeras vantagens catalíticas das enzimas, principalmente quando comparadas com os catalisadores químicos, a utilização em processos industriais muitas vezes tem sido limitada. Isso acontece principalmente devido a fatores como: à baixa estabilidade nas condições de operação, elevado custo de obtenção (desde o isolamento até a etapa de purificação) e da dificuldade técnica e elevado custo da recuperação/separação do catalisador ao término da reação. Isso restringe o uso de enzimas solúveis principalmente em processos de batelada (CAO, 2005).

Desde a segunda metade do século passado, numerosos esforços têm sido dedicados ao desenvolvimento de enzimas imobilizadas para uma variedade de aplicações (SOARES, 1999). Estas aplicações podem ser beneficiadas pela utilização das enzimas imobilizadas em comparação às contrapartes solúveis, como por exemplo, na redução dos custos de produção e maior controle do processo.

Assim, qualquer que seja a natureza de uma enzima imobilizada e não importa como é preparada, por definição, é constituída por duas funções essenciais: as funções não-catalíticas, que são concebidas para auxiliar na separação dos catalisadores a partir do ambiente de aplicação, e as funções catalíticas que são responsáveis por converter os compostos alvo (ou substratos), dentro do tempo e espaço desejados (GANDHI, 1997; SOARES, 1999).

Em geral, as funções não-catalíticas e as funções catalíticas de uma enzima imobilizada são os dois lados de uma moeda e são a base que define o âmbito de aplicação final. Por outro lado, as peculiaridades de cada aplicação também ditam o projeto e seleção do biocatalisador imobilizado. Diante disso, não é de se surpreender que a tarefa mais complicada do processo de imobilização de enzimas é selecionar um método adequado (suportes, condições e tipo de enzima) para projetar um biocatalisador insolúvel que possa atender não só as necessidades catalíticas (produtividade, estabilidade e seletividade), mas também as necessidades não catalíticas para uma determinada aplicação (CAO, 2005).

Embora os métodos básicos de imobilização de enzimas sejam categorizados em apenas alguns tipos diferentes, por exemplo, adsorção, ligação covalente e

encapsulação, centenas de variações, com base em combinações destes métodos originais, têm sido desenvolvidas (KATZBAUER et al., 1995; FABER, 1997). Paralelamente, muitos suportes de natureza física-química diferente ou de ocorrência diferente foram projetados para uma variedade de técnicas de imobilização. Os principais métodos utilizados para a imobilização de enzimas são: adsorção, ligação covalente e encapsulação (Figura 4).

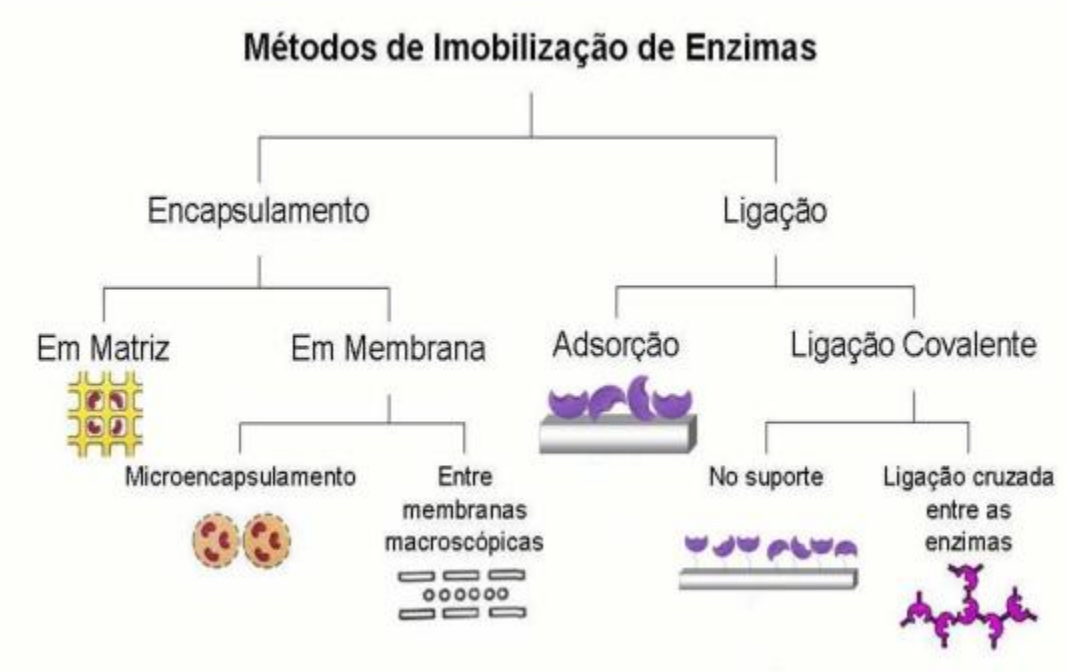


Figura 4. Métodos de imobilização de enzimas (Fonte: BICKERSTAFF, 1997).

Imobilização por adsorção

O procedimento de adsorção de uma proteína é muito simples, e é um dos métodos mais utilizados. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por 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 para este propósito 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 eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, dependem de vários parâmetros, tais como tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da

porosidade e distribuição de tamanho de poros (VILLENEUVE et al., 2000). O uso de suportes porosos é vantajoso porque a enzima é adsorvida no interior dos poros. A eficiência depende também da concentração da enzima. A quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação ou de equilíbrio.

Imobilização de lipase por adsorção tem sido muito útil em sistemas não-aquosos, nos quais a dessorção da enzima pode ser negligenciada devido à baixa solubilidade de lipases em solventes orgânicos. Por essa razão e devido a simplicidade no método, o uso de lipases imobilizadas por adsorção é amplamente utilizada em solventes imiscíveis em água em escala industrial (MALCATA et al., 2009). Um grande número de protocolos de imobilização de lipases por adsorção foi extensivamente revisado por Malcata et al. (2009). Uma variedade enorme de suportes (naturais e sintéticos) com diferentes formas, tamanhos, estruturas porosas e não-porosas, diferentes capacidade de carreamento tem sido utilizados nesses protocolos. Entre os suportes mais utilizados para adsorção são: alumina, sílica, celite, cerâmica, vidro, celulose, nylon, entre outros. A maioria destes materiais é disponível comercialmente e possuem propriedades operacionais conhecidas.

É importante ressaltar que em um suporte poroso, a distribuição das moléculas da proteína adsorvida não é uniforme ao longo de sua superfície. Em todo o caso, o suporte escolhido deverá ser tal que as moléculas de enzima fiquem o mais próximo possível da superfície do suporte, mas internalizadas em seu interior o suficiente para serem preservadas contra os agentes desnaturantes.

As quantidades relativas de enzima e suporte para o máximo de adsorção devem ser analisadas. Em princípio, seria razoável supor que quanto maior fosse a quantidade de enzima maior deveria ser a saturação do suporte, se sua quantidade fosse mantida constante. Isto geralmente se observa. Contudo, se o suporte estiver saturado de enzima, a quantidade do catalisador disponível para interagir com o substrato pode depender da difusão deste até o sítio ativo, já que a reação se dá preferencialmente com as moléculas de proteína nas camadas superficiais. Portanto, a eficiência catalítica da enzima diminui.

Modificação por ligação covalente no suporte ou por ligação cruzada

A utilização de proteínas modificadas quimicamente teve início no final da década de 50, sendo que a técnica foi originalmente desenvolvida para auxiliar na elucidação da estrutura de proteínas. Desde o final da década de 70, muitos trabalhos de modificação de proteínas para uso em síntese têm sido apresentados com o objetivo de alterar e melhorar as propriedades da lipase nativa (MATSUSHIMA et al., 1996). O procedimento envolve a modificação química de um resíduo de aminoácido, através da formação de uma ligação covalente da enzima com um material insolúvel em água, usando vários agentes bifuncionais como glutaraldeído, glicidol e tripolifosfato de sódio.

O glutaraldeído (GA) é um agente reticulante normalmente usado na formação de redes de polipeptídios e proteínas devido à reatividade dos grupos aldeídos, que prontamente formam bases de Schiff com os grupos amino das proteínas. Outros grupos funcionais da enzima como grupos carboxílicos (β-COOH do ácido aspártico, *γ*-COOH do ácido glutâmico e o α-carboxílico), grupo fenólico da tirosina, grupo sulfídrico da cisteína, grupo hidroxílico da serina, treonina e tirosina, grupo imidazol da histidina e grupo indol do triptofano também podem se ligar covalentemente aos grupos reativos do suporte. Além dos grupos amina, o glutaraldeído pode também reagir com outros grupos funcionais da enzima, tais como hidroxilas, tiol, fenol e imidazol. A reatividade do glutaraldeído em relação aos grupos funcionais das proteínas pode ser classificada em ordem decrescente, do seguinte modo: ε-amino, α-amino, guanidinas, aminas secundárias e grupos hidroxilas (MIGNEAULT et al., 2004; MANRICH et al., 2008).

O glutaraldeído está disponível comercialmente em forma de solução aquosa ácidas, com concentrações variáveis de 2% a 70% (m/v). Em soluções aquosas, a estrutura química do glutaraldeído não está limitada à forma monomérica, podendo se apresentar na forma de hemiacetais cíclicos monoméricos e oligomérico e polímeros de glutaraldeído (MIGNEAULT et al., 2004). Assim, dependendo das condições de concentração, pH e temperatura da solução de glutaraldeído, esse pode apresentar-se em até 13 diferentes formas (MIGNEAULT et al., 2004).

A natureza química da reação entre o glutaraldeído e as proteínas não está totalmente elucidada e os mecanismos responsáveis pela ligação entre o

glutaraldeído com proteínas não atuam de forma singular. Devido ao glutaraldeído estar presente em diferentes formas, em solução aquosa, mesmo em condições controladas, vários mecanismos de reação podem atuar simultaneamente no processo de reticulação de proteínas (MIGNEAULT et al., 2004).

O mecanismo de reação da epicloridrina é bastante similar ao do glutaraldeído, no entanto, este agente de reticulação reage preferencialmente com os grupos hidroxilas dos suportes. A epicloridrina pode ser usada para a insolubilização (reticulação) da quitosana através da formação de uma rede tridimensional polimérica. Na reação com a matriz da quitosana, a epicloridrina reage somente com os grupos hidroxila sob condições alcalinas, ocorrendo abertura do anel epóxido.

Quando o metaperiodato de sódio é empregado na ativação do suporte, os grupos hidroxilas da superfície são oxidados, resultando em grupos aldeídos que podem se ligar à molécula protéica durante a imobilização (SANTOS et al., 2008c). O processo por oxidação corresponde a uma das metodologias para alteração da reatividade da fibra celulósica por exemplo. A oxidação da celulose é um processo complexo, resultando em vários produtos de oxidação, uma vez que a celulose apresenta em cada unidade de glicose três grupos hidroxilas, com reatividades distintas. Além destes, os grupos terminais da cadeia podem também ser oxidados. No entanto, o metaperiodato de sódio, é o agente oxidante de maior interesse nos processos de oxidação, uma vez que a oxidação ocorre nos grupos diol vicinais, e não se confina às regiões mais acessíveis das fibras. Após oxidação das unidades de glicose a unidades dialdeídicas, o reagente penetra lentamente nas regiões cristalinas. A reação de oxidação da celulose com o metaperiodato de sódio deve ser realizada à temperatura ambiente e na ausência de luz, (para evitar a ocorrência de reações laterais) a pH entre 2 e 7.

Confinamento em matriz polimérica ou em cápsulas

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 o que pode evita sua 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.

Apesar do grande número de trabalhos publicados na literatura sobre imobilização de enzimas, os processos que utilizam enzimas na forma insolúvel em escala industrial ainda são reduzidos. Isso se deve a fatores como o alto custo dos suportes e reagentes para imobilização, relativa baixa estabilidade operacional das enzimas imobilizadas, baixa versatilidade dos equipamentos que utilizam operação continua e enzimas imobilizadas não são eficientes para produtos com alto peso molecular.

Para contornar esses problemas, e viabilizar o aumento da aplicação industrial das enzimas imobilizadas, é necessário o aperfeiçoamento dos seguintes parâmetros: custo da imobilização, retenção da atividade enzimática, estabilidade frente a temperatura e pH, estabilidade operacional, projeto do biorreator e aquisição de suportes mais resistentes e de baixo custo (SAID; PIETRO, 2004).

2.1.5 Propriedades das enzimas imobilizadas

É importante compreender as alterações nas propriedades físicas e químicas de uma enzima, quando submetidas ao processo de imobilização e consequentemente de insolubilização. As principais alterações são observadas na estabilidade das enzimas e nas suas propriedades cinéticas causadas pelo novo microambiente imposto sobre elas, seja pela matriz do suporte ou pelos produtos da sua própria ação.

Estabilidade

A estabilidade de uma enzima nativa (isto é, uma enzima solúvel ou não modificada) é principalmente determinada pela sua estrutura intrínseca ao passo que a estabilidade de uma enzima imobilizada é altamente dependente de muitos fatores, incluindo: as propriedades de sua interação com o suporte, a posição de ligação e o número de ligações, a liberdade da mudança conformacional na matriz, o microambiente no qual a molécula de enzima está localizada, a estrutura química e física do suporte, as propriedades do agente ligante (por exemplo, carregados ou neutros, hidrofílicos ou hidrofóbicos, tamanho, comprimento), que liga as moléculas de enzima ao suporte e as condições em que as moléculas de enzima foram imobilizadas (CAO, 2005).

Seja qual for a razão, o aumento da estabilidade resultante do processo de insolubilização pode muitas vezes ser atribuído às características intrínsecas dos processos de imobilização, por exemplo: confinamento molecular (o que ocorre muitas vezes no processo de encapsulação, particularmente o processo de sol-gel), microambiente favorável (conseguido pela seleção de suportes apropriados), efeito da modificação química por ligação covalente (tais como a formação de um ligação de hidrogênio extra) e enrijecimento da conformação da enzima como resultado da ligação multiponto (SHELDON et al., 2007).

Entretanto, é muito difícil determinar qual o método de imobilização pode fornecer enzimas mais estáveis, porque até o mesmo método (por exemplo, imobilização covalente) pode levar a estabilidade de enzimas em diferentes graus, dependendo do suporte selecionado, das condições de imobilização (temperatura, pH, carga, temperatura, força iónica, aditivos) ou subsequente tratamentos após a imobilização (CAO, 2005).

Aumento da atividade

Muitos tipos de enzimas imobilizadas, por diferentes técnicas, apresentam atividade maior do que as enzimas nativas (URSINI et al., 1999). Por exemplo, hidrolase epóxida adsorvida sobre DEAE-celulose por ligação iônica foi duas vezes mais ativa do que a enzima nativa; lipase aprisionada numa matriz de gel de pirrolidona foi 50 vezes mais ativa do que sua correspondente solúvel (SHELDON et al., 2007).

Ativação por imobilização é, no entanto, muitas vezes considerado como um benefício extra ao invés de uma meta racional da imobilização de enzimas. A retenção de atividade de enzimas imobilizadas é geralmente em torno de 50%. No caso de elevada carga de enzima, a limitação de difusão pode ocorrer em decorrência de uma distribuição desigual da enzima dentro de um suporte poroso, conduzindo a uma redução da atividade. As condições para elevada retenção de atividade são muitas vezes desconhecidas, exigindo assim, laboriosos rastreios de condições de imobilização, tais como a carga de enzima, pH, suporte e da química de ligação (SHELDON et al., 2007).

Juntamente com o efeito do microambiente mencionado anteriormente, foi demonstrado que as enzimas imobilizadas podem ser mais ativas do que as correspondentes nativas, em que o efeito de inibição do substrato foi reduzido. Por exemplo, a imobilização da invertase de *Candida utilis* em grânulos porosos de celulose levou à redução da inibição pelo substrato e aumento da atividade (DICKENSHEETet al., 1977). Um efeito positivo da partição (aumento da concentração de substrato nas proximidades da enzima) pode também aumentar a atividade enzimática, tal como foi observado para a síntese cineticamente controlada de ampicilina com penicilina G acilase imobilizada sobre um suporte positivamente carregado ou álcool-desidrogenase de fígado de cavalo imobilizado em matriz de acrilamida (KASCHE et al., 1984). Maior retenção da atividade enzimática pode ser conseguida, em especial para enzimas alostéricas como algumas lipases, que têm tampas que cobrem o sítio ativo, e através de uma mudança conformacional aumenta a acessibilidade do substrato ao centro ativo (CAO, 2005).

A Tabela 1 apresenta uma copilação de resultados referentes a diferentes protocolos de imobilização de lipases reportados na literatura e as mudanças nas propriedades das enzimas. Uma das principais conclusões que pode-se obter ao analisar a Tabela 1 é a diversidade de resultados obtidos para as respostas estudas. A retenção da atividade enzimática, por exemplo, variou de 7,1% a 540,7%. Isso se deve às diferenças em todos os pontos que norteiam o processo de imobilização enzimática: enzima, suportes, tipo de imobilização, pH, temperatura, força iônica, tipo de agentes ligantes, presença de aditivos estabilizantes entre outros. Também pode-se concluir que as enzimas imobilizadas apresentaram quase sempre modificações em suas propriedades bioquímicas e cinéticas, independente destas serem negativas ou não. Portanto, fica claro a necessidade de se estudar protocolos de imobilização específicos para cada nova enzima que se trabalha.

Tabela 1. Propriedades bioquímicas e cinéticas de lipases nas formas livre (EL) e imobilizada (EI) e estabilidade operacional (reuso) dos derivados imobilizados produzidos.

R_{AE} (%)	Reuso		K_m (mM)		V_{max} (U mg^{-1})		pH (-)		Temperatura (°C)		Referências
	Ciclos	R_{AE} (%)	EL	EI	EL	EI	EL	EI	EL	EI	
82,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Castro et al. (2001)
382,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Menoncin et al. (2009)
30,0	-	-	-	-	-	-	7,0	7,0	30,0	30,0	Abbas; Comeau (2003)
26,4	-	-	4018	5267	56,4	6323,0	7,5	6,5	50,0	60,0	Rós et al. (2010)
29,7	-	-	4018	1882	56,4	3873,0	7,5	8,5	50,0	60,0	Rós et al. (2010)
23,9	-	-	-	-	-	-	7,0	8,0	40,0	57,0	Santos et al. (2007)
40,0	10	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Bhushan et al. (2008)
79,6	3	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Castro et al. (1999)
50,5	-	-	0,170	0,14	1928,6	148,8	7,0	8,0	37,0	40,0	Perez et al. (2007)
62,6	-	-	0,170	0,27	1928,6	162,3	7,0	7,5	37,0	50,0	Perez et al. (2007)
70,0	-	-	0,170	0,16	1928,6	250,6	7,0	8,5	37,0	50,0	Perez et al. (2007)
24,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gomes et al. (2005)
50,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gomes et al. (2005)
62,6	7	34,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Gomes et al. (2005)
27,0	12	72,0	-	-	-	-	7,0	7,5	37,0	45,0	Gomes et al. (2004)
14,7	-		0,42	0,15	38,4	51,0	7,0	6,0	37,0	45,0	Pereira et al. (2001)
89,0	7	17,0	-	-		-	-	-	-	-	Pereira et al. (2002)
18,2	7	17,0	499,5	288,5	3800,0	54,5	7,0	6,0	40,0	45,0	Pereira et al. (2003)
59,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Soares et al. (2001)
32,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Soares et al. (2003)
88,7	5	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Mendes et al. (2006)

Continua

Continuação da Tabela 1

31,0	-		-						-		Palomo et al. (2007)
181,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Palomo et al. (2007)
12,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Soares et al. (2004)
7,93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Soares et al. (2004)
31,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Soares et al. (2004)
135,0	-	-	-	-	-	-	-	-	50,0	70,0	Wilson et al. (2006)
20,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Wilson et al. (2006)
0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Wilson et al. (2006)
65,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Palomo et al. (2005)
53,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Bruno et al. (2008)
61,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mendes et al. (2011)
70,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mendes et al. (2011)
18,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mendes et al. (2011)
56,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Miranda et al. (2006)
65,0	3	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Bruno et al. (2004)
59,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Soares et al. (2003)
96,5	-	-	170,0	409,0	1929,0	635,0	7,5	7,5	37,0	40,0	Paula et al. (2008)
81,5	-	-	170,0	210,0	1929,0	551,0	7,0	8,0	37,0	45,0	Paula et al. (2008)
11,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Paula et al. (2008)
39,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Santos et al. (2008a)
81,7	-	-	-	-	-	-	7,0	8,0	37,0	55,0	Santos et al. (2008b)
31,2	-	-	-	-	-	-	7,0	7,5	37,0	50,0	Santos et al. (2008b)
100,0	-	-	-	-	-	-	7,0	8,0	37,0	55,0	Santos et al. (2008b)
32,0	-	-	-	-	-	-	8,3	8,9	58,0	58,0	Santos et al. (2008c)

Continua

Continuação da Tabela 1

16,0	-	-	-	-	-	-	8,3	8,8	58,0	65,0	Santos et al. (2008c)
59,9	-	-	-	-	-	-	-			-	Soares et al. (2002)
18,3	20	70,0	-		-		7,5	8,5	40,0	50,0	Soares et al. (1999)
7,1	-	-	-	-	-	-	7,5	7,5	40,0	50,0	Aguiar et al. (2010)
76,0	20	80,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Lee et al. (2006)
67,0	-	-	0,056	0,14	1469,5	1,31	7,8	8,0	37,0	55,0	Soares et al. (2005)
40,7	-	-	534,0	851,0	12050,0	1409,0	7,0	8,4	45,0	50,0	Simoes et al. (2011)
31,9	-	-	0,247	0,084	1,290	0,005	6,7	7,8	36,0	65,0	Soares et al. (2006)
44,5	4	50,0	-	-	-	-	8,0	7,5	40,0	50,0	Oliveira et al. (2000b)
65,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Fernandez-Lorente et al. (2008)
34,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cunha et al. (2008)
50,0	-	-	-	-	-	-	-		-	-	Cunha et al. (2008)
61,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cunha et al. (2008)
92,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Bautista et al. (1998)
50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pinheiro et al. (2005)
94,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Kumar; Kanwar (2011)
98,5	10	74,0	1,67	18,0	92,5	96,1	8,0	9,0	30,0	30,0	Hung et al. (2003)
55,0	4	47,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Amorim et al. (2003)
81,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Rodrigues et al. (2008)
56,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gunnlaugsdottir et al. (1998)
137,0	10	90,0	-	-	-	-	-		-	-	Gupta et al. (2009)
34,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Vaidya et al. (2008a)
65,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Alloue et al. (2008)
55,5	5	88,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Wu et al. (2009)

Continua

Continuação da Tabela 1

166,8	-	-	-	-	-	-	7,0	6,0	35,0	50,0	Yilmaz et al. (2011)
87,0	3	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Brígida et al. (2008)
540,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Nieto et al. (2005)
45,0	5	80,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Yan et al. (2011)
89,0	-	-	-	-	-	-	7,0	8,0	37,0	40,0	Guo et al. (2003)
34,0	5	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Castro et al. (2000)
97,0	6	60,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Wang et al. (2011)
76,0	10	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Dizge et al. (2009)
84,8	10	79,0	22,7	34,3	23,4	20,3	7,5	8,0	40,0	45,0	Karagoz et al. (2010)
90,1	10	80,5	-	-	-	-	-	-	-	-	Yucel (2011)
96,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Braga et al. (2005)
175,9	-	-	-	-	-	-	-		-	-	Chang et al. (2008)
120,0	8	85,0	3,8	4,0	0,72	10,0	-	-	-	-	Pahujani et al. (2008)
475,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Kang et al. (2007)
88,9	20	90,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Park et al. (2006)
234,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Yang et al. (2009)
33,0	7	10,5	8,2	8,1	1,3	0,5	-	-	-	-	Knezevic et al. (1998)
70,0	-	-	0,56	1,18	325,0	1469,6	7,5	8,0	37,0	50,0	Mendes et al. (2007)
133,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Hwang et al. (2004)
75,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Lopez-Serrano et al. (2002)
192,4	-	-	-	-	-	-	-		-	-	Bryjak et al. (2006)
125,0	10	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Brandy et al. (2008)
99,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Kamori et al. (2000)
33,0	10	60,0	-	-	-	-	7,0	7,5	40,0	45,0	Tang et al. (2007)

Continua

Continuação da Tabela 1

76,0	10	80,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Romdhane et al. (2011)
389,0	10	85,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Chiou et. al (2004)
127,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Brem et al. (2012)
88,0	5	60,0	8,30	1,50	0,78	3,41	7,0	7,0	50,0	50,0	Mondal et al. (2006)
22,5	8	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Schultz et al. (2007)
45,0	10	80,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Abrol et al. (2007)
78,0	-	-	-	-	-	-	-		-	-	Vaidya et al. (2008b)
127,5	7	90,0	-	-	-			-	-		Mahmood et al. (2008)
58,2	9	60,0	0,81	0,22	12,43	3,69	-	-	-	-	Cui et al. (2010)
56,0	6	80,5	-	-	-	-	-	-	-	-	Gao et al. (2010)
161,0	30	95,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Meng et al. (2013)
94,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pospiskovaa; Safarikb, (2013)
300,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Lima et al. (2013)
78,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Siódmiak et al. (2013)
22,5	20	14,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Schultz et al. (2013)
100,0	20	97,0	-	-	-	-	7,0	6,0	30,0	50,0	Elnashar et al. (2013)
58,2	10	60,0	0,81	0,22	12,43	3,69	-	-	-	-	Cui et al. (2010)
28,0	8	30,0	-	-	-	-	5,5	6,1	30,0	40,0	Huang et al. (2011)
53,8	12	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Shu et al. (2011)
94,0	3	79,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Dhake et al. (2011)
73,9	21	70,0	-	-	-	-	-		-	-	Ren et al. (2011)
200,0	5	30,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Yilmaz et al. (2011)
160,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ruiz et al. (2013)
80,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ruiz et al. (2013)

Continua

Continuação da Tabela 1

76,0	8	79,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Safarik et al. (2012)
41,4	2	95,9	-	-	-	-	-	-	-	-	Kim et al. (2012)
63,0	20	83,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Kuo et al. (2012)
50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Jenjob et al. (2012)
80,0	22	100,0	-	-	-	-	7,0	8,5	37,0	40,0	Chattopadhyay et al. (2012)
43,0	16	100,0	-	-	-	-	7,0	8,0	37,0	40,0	Chattopadhyay et al. (2012)
97,1	10	97,0	1,98	3,59	59,4	57,8	-	-	-	-	Chen et al. (2012)
90,0	6	64,0	0,31	0,12	0,02	0,56	-	-	-	-	Ranjbakhsh et al. (2012)
63,0	10	80,2	-	-	-	-	7,5	8,0	40,0	50,0	Lei et al. (2009)
82,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Horchani et al. (2012)
19,4	10	80,0	-	-	-	-	8,0	8,0	30,0	30,0	Kim et al. (2013)
96,0	-	-	0,09	3,65	133,3	131,4	9,0	9,0	55,0	55,0	Tran et al. (2012)
62,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Peng et al. (2013)
103,7	21	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Ramani et al. (2012)
495,1	-	-	-	-	-	-	7,0	8,0	35,0	60,0	Wu et al. (2012)
99,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Poppe et al. (2013)
78,02	10	75,0	0,94	1,3	99,0	108,0	8,0	9,0	30,0	37,0	Kumar et al. (2013)
97,0	4	20,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Dhake et al. (2013)
27,0	4	80,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Kartal et al. (2011)
10,0	-	-	3,4	4,1	555,6	270,0	7,0	8,0	30,0	45,0	Wang et al. (2012)

R_{AE}: retenção da atividade enzimática; EL: enzima livre; EI: enzima imobilizada.

2.1.6 Lipases imobilizadas

Considerando as condições adversas para o uso da lipase livre em algumas reações de interesse industrial, como as de síntese em meio orgânico, bem como visando à otimização do processo através do desenvolvimento de processos contínuos, o uso de lipases imobilizadas tornou-se uma necessidade. Dentre os benefícios do emprego deste biocatalisador imobilizado estão, a redução do potencial de contaminação do produto com lipase residual; reuso do biocatalisador; melhor controle e qualidade do processo diante de biocatalisadores mais estáveis e resistentes; e praticidade na separação do biocatalisador do sistema de reação para posterior reutilização (MALCATA et al., 2009; FORESTI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2000a; PARK et al., 2006; DALLA-VECCHIA et al., 2004; AMORIM et al., 2003; STAMAKIS; XANAKIS, 1999).

É notória a dificuldade de se comparar a influência que o processo de imobilização exerce sobre as propriedades cinéticas e bioquímicas das lipases estudadas. Existe uma grande variação nos protocolos de imobilização como: fonte da enzima, suportes utilizados, tipos de imobilização, agentes ligantes e estabilizantes, substratos utilizados e técnicas de caracterização. Todos esses parâmetros afetam o desempenho final dos derivados imobilizados produzidos. Apesar disso, foi realizado um rigoroso levantamento bibliográfico com a finalidade de se conhecer o atual desenvolvimento da tecnologia de imobilização de enzimas. As Tabelas 2 e 3 apresentam inúmeros trabalhos científicos voltados para essa área.

Analisando os dados apresentados nestas tabelas observa-se que as fontes produtoras de lipases mais utilizadas foram bacteriana (17,0%) e fúngica (75,0%). Entre as lipases de origem fúngica destacam-se as produzidas pelas leveduras do gênero *Candida sp.* responsável por 83,0% da produção. É interessante ressaltar que 84,0% das lipases estudadas foram obtidas comercialmente sendo o restante produzido por fermentação nas próprias instituições de pesquisa. Isso demonstra a importância de pesquisas que visam a obtenção de novas fontes produtoras de enzimas para diminuição da dependência do mercado frente as grandes empresas multinacionais que monopolizam o setor. Além disso, surge a possibilidade de

descoberta de enzimas com novas propriedades que viabilizam o seu uso na escala industrial.

Entre os suportes mais utilizados destacam-se aqueles produzidos pela técnica de sol-gel (24,0%) seguido pela quitosana (15,0%), agarose (8,0%) e por fim resíduos agroindustriais (3,0%). Mais da metade dos processos de imobilização seguiu a técnica de ligação covalente (54,0%). A adsorção foi o segundo tipo de imobilização utilizada, responsável por 31,0% dos processos, seguido pela encapsulação (15,0%). Para a realização da imobilização por ligação covalente o glutaraldeído foi o agente ligante mais utilizado. O metaperiodato de sódio e epicloridrina foram outros agentes ligantes também utilizados para ativação do suporte. Um grande número de trabalhos utilizou aditivos estabilizantes durante o processo de imobilização, como destaque para polietilenoglicol e Triton-X 100.

A grande maioria dos trabalhos, cerca de 64,0%, avaliou o potencial de aplicação biotecnológica dos derivados imobilizados obtidos. A produção de aromas foi a aplicação industrial mais avaliada seguido pelos processos de resolução de mistura racêmica e produção de biodiesel.

Como ressaltado anteriormente, há uma diversidade enorme nas técnicas utilizadas para caracterização dos derivados imobilizados. Somando a isso tem-se o fato de que, apenas 54,0% dos trabalhos realizaram estudos que comparavam as propriedades da enzima na forma livre com aquelas obtidas após o processo de imobilização. Estudos como a química de imobilização foram realizados em menos de 10,0% dos trabalhos catalogados. A análise desse relatos científicos ajuda a reforçar a ideia de que não existe um protocolo universal para imobilização de enzimas. Para cada nova enzima, novo suporte ou nova aplicação industrial terá que se realizar a avaliação de um novo processo de imobilização. Levando em consideração a peculiaridade da cada uma destas variáveis afim de que seja obtido um derivado com viabilidade técnica e funcional para um determinado emprego catalítico.

Tabela 2. Diferentes técnicas de imobilização de lipases e aplicação industrial dos derivados imobilizados produzidos.

Suportes	Tipo de imobilização	Agente ligante	Aditivo	Aplicação industrial	Referência
Palha de arroz	Covalente	Glutaraldeído	PEG	Butirato de butila	Castro et al. (2001)
Sepabeads	Covalente	Glutaraldeído	Triton-X	Diacetina	Hernandez et al. (2011)
Oxido de nióbio	Covalente	Glutaraldeído	PEG	Biodiesel	Rós et al. (2010)
Celulignina	Covalente	Glutaraldeído	PEG	-	Perez et al. (2007)
Celulignina	Covalente	Glutaraldeído	PEG	Butirato de butila	Gomes et al. (2005)
Quitina	Covalente	Glutaraldeído	-	Síntese se ésteres	Gomes et al. (2004)
Quitosana (pó)	Covalente	Glutaraldeído	-	Oleato de etila	Foresti et al. (2007)
Sílica	Covalente	Glutaraldeído	PEG	Butirato de butila	Soares et al. (2001)
Sílica	Covalente	Glutaraldeído	Lecitina	Butirato de butila	Soares et al. (2003)
Fosfato de zircônio	Covalente	Glutaraldeído	PEG	Butirato de butila	Mendes et al. (2006)
Agarose	Covalente	Glutaraldeído	-	Enantiosseletividade	Palomo et al. (2007)
Sílica (matrizes)	Covalente	Glutaraldeído	PEG	-	Soares et al. (2004)
Agarose	Covalente	Glutaraldeído	Triton-X	Enantiosseletividade	Wilson et al. (2006)
Glioxil-agarose	Covalente	Glutaraldeído	-	Enantiosseletividade	Palomo et al. (2005)
SiO_2–PVA	Covalente	Glutaraldeído	-	Butirato de butila	Bruno et al. (2008)
Oxido de nióbio	Covalente	Glutaraldeido	-	Butirato de butila	Miranda et al. (2006)
Nylon-PVA	Covalente	Glutaraldeído	-	-	Bruno et al. (2004)
Glioxil-agarose	Covalente	Glutaraldeído	-	Enantiosseletividade	Palomo et al. (2005)
Sílica	Covalente	Glutaraldeído	PEG	Butirato de butila	Soares et al. (2003)
SiO_2–PVA	Covalente	Glutaraldeído	PEG	Butirato de butila	Paula et al. (2008)
SiO_2–PVA	Covalente	Glutaraldeído	PEG	-	Santos et al. (2008c)
Sílica	Covalente	Glutaraldeído	PEG	Butirato de butila	Soares et al. (2002)

Continua

Continuação Tabela 2

Sílica	Covalente	Glutaraldeído	-	Butirato de butila	Soares et al. (1999)
Sílica gel	Covalente	Glutaraldeído	-	-	Lee et al. (2006)
Celite	Covalente	Glutaraldeído	-	-	Kumar; Kanwar, (2011)
Quitosana	Covalente	Glutaraldeído	-	-	Hung et al. (2003)
Quitosana	Covalente	Glutaraldeído	-	-	Amorim et al. (2003)
Quitosana	Covalente	Glutaraldeído		-	Rodrigues et al. (2008)
Fe_3O_4-Quitosana	Covalente	Glutaraldeído	-	-	Wu et al. (2009)
Vidro	Covalente	Glutaraldeído	-	Enantiosseletividade	Yilmaz et al. (2011)
Vidro	Covalente	Glutaraldeído	-	Enantiosseletividade	Yilmaz et al. (2011)
CLEAs	Covalente	Glutaraldeído	Triton-X	-	Gupta et al. (2009)
Eupergit C	Covalente	Glutaraldeído	-	Síntese de ésteres	Nieto et al. (2005)
PCMCs - K_2SO_4	Covalente	Glutaraldeído	-	Biodiesel	Yan et al. (2011)
Oxido de nióbio	Covalente	Glutaraldeido	-	Butirato de butila	Castro et al. (2000)
Resinas meso-porosas	Covalente	Glutaraldeído	-	-	Wang et al. (2011)
Polímero micro-poroso	Covalente	Glutaraldeído	-	Biodiesel	Dizge et al. (2009)
Poliestireno	Covalente	Glutaraldeido	-	Ésteres aromáticos	Karagoz et al. (2010)
SiO_2–PVA	Covalente	Glutaraldeído	PEG	Butirato de butila	Braga et al. (2005)
Oxido de alumínio	Covalente	Glutaraldeído	-	Esterificação	Kumar et al. (2013)
CLEAs	Covalente	Glutaraldeído	Triton-X	-	Lopez-serrano et al. (2002)
Suportes acrílicos	Covalente	Glutaraldeido	-	-	Bryjak et al. (2006)
Sílica gel	Covalente	Glutaraldeido	-	-	Ozyilmaz et al., (2009)
CLEAs	Covalente	Glutaraldeido	-	Esterificação	Brady et al. (2008)
Quitosana	Covalente	Glutaraldeido	-	Esterificação	Romdhane et al. (2011)
Quitosana	Covalente	Glutaraldeido	-	-	Chiou et al. (2004)
Quitosana	Covalente	Glutaraldeído	-	Hidrólise	Collins et al. (2011)

Continua

Continuação Tabela 2

CLEAs	Covalente	Glutaraldeído	-	Enantiosseletividade	Brem et al. (2012)
Nylon-6	Covalente	Glutaraldeido	-	-	Pahujani et al. (2008)
Quitosana	Covalente	Glutaraldeido	-	Biodiesel	Cruz Jr et al. (2007)
SiO_2–PVA	Covalente	Glutaraldeido	-	Biodiesel	Moreira et al. (2007)
Fosfato de zircônio	Covalente	Glutaraldeido	-	Butirato de butila	Mendes et al. (2007)
Fe_3O_4	Covalente	Glutaraldeído	-	-	Cui et al. (2010)
Quitosana	Covalente	Glutaraldeído	-	-	Gao et al. (2010)
Quitosana	Covalente	Glutaraldeído	-	Esterificação	Orrego et al. (2010)
Quitosana magnética	Covalente	Glutaraldeído	-	-	Pospiskovaa; Safarikb, (2013)
Agarose	Covalente	Glutaraldeído	Triton-X	Enantiosseletividade	Barbosa et al. (2012)
Metacrilato	Covalente	Glutaraldeído	-	Esterificação	Kim et al. (2013)
CLEAs	Covalente	Glutaraldeído	-	Esterificação	Kartal et al. (2011)
Carbono	Covalente	Glutaraldeído	-	Hidrólise	Ramani et al. (2012)
Alginato-carragenana	Covalente	Glutaraldeído	-	-	Elnashar et al. (2013)
Partículas magnéticas	Covalente	Glutaraldeído	-	-	Cui et al. (2010)
Pó de chá preto	Covalente	Glutaraldeído	-	-	Safarik et al. (2012)
Algodão	Covalente	Glutaraldeído	-	Esterificação	Shu et al. (2011)
SiO_2–PVA	Covalente	Epicloridrina	PEG	Biodiesel	Silva et al. (2011)
SiO_2-Quitosana	Covalente	Epicloridrina	PEG	-	Simões et al. (2011)
Agarose	Covalente	Epicloridrina		-	Rodrigues et al. (2008)
Sepharose HiTrapTM	Covalente	Epicloridrina	-	-	Alloue et al. (2008)
SiO_2–PVA	Covalente	Epicloridrina	PEG	Biodiesel	Rós et al. (2010)
SiO_2–PVA	Covalente	Epicloridrina	PEG	Monoglicerídeos	Freitas et al. (2010)
Quitosana magnética	Covalente	Epicloridrina	-	Enantiosseletividade	Siódmiak et al. (2013)
polyvinylidene fluoride	Covalente	Epicloridrina	-	-	Chen et al. (2012)

Continua

Continuação Tabela 2

Celulignina	Covalente	Metaperiodato	PEG	-	Perez et al. (2007)
Dextrana	Covalente	Metaperiodato	-	Ibuprofeno	Casa et al. (2002)
Toyopearl AF-amino	Covalente	Metaperiodato	Triton-X	Biodiesel	Mendes et al. (2011)
SiO_2–PVA	Covalente	Metaperiodato	PEG	-	Santos et al. (2008a)
SiO_2–PVA	Covalente	Metaperiodato	PEG	Butirato de butila	Santos et al. (2008b)
SiO_2–PVA	Covalente	Metaperiodato	PEG	↑ valor nutricional	Paula et al. (2010)
SiO_2–PVA	Covalente	Metaperiodato	PEG	Interesterificação	Paula et al. (2010)
Quitosana	Covalente	metaperiodato	-	Ácidos graxos	Agnes et al. (2003)
Quitosana	Covalente	Metaperiodato	-	↑ valor nutricional	Aguiar et al. (2010)
Celulose	Covalente	Metaperiodato	-	-	Huang et al. (2011)
Immobead	Covalente	Metaperiodato	-	Transesterificação	Poppe et al. (2013)
$AlPO_4$/sepiolite	Covalente	Benzaldeído	-	-	Bautista et al. (1998)
Casca de coco verde	Covalente	GPTMS	-	Butirato de butila	Brígida et al. (2007)
Acido poliglutâmico	Covalente	Carbodiimida	-	-	Chang et al. (2008)
Sílica	Covalente	Tricloro triazina	-	Esterificação	Arroyo et al. (1999)
Agarose e sílica-gel	Covalente	Tricloro triazina	-	-	Sanches et al. (1996)
hollow fiber	Covalente	Epoxy groups	-	-	Abrol et al. (2007)
Polietilenoglicol	Covalente	Epoxy groups	-	-	Vaidya et al. (2008)
Sepabeads	Covalente	Glyoxyl groups	Triton-X	-	Lima et al. (2013)
Esferas magnéticas	Covalente	Epoxy groups	-	Esterificação	Lei et al. (2009)
Eupergit C	Covalente	Epoxy groups	Triton-X	Enantiosseletividade	Ruiz et al. (2013)
Celulignina	Covalente	Carbonildiimidazol	PEG	-	Perez et al. (2007)
Partículas magnéticas	Covalente	polydopamine	-	-	Ren et al. (2011)
Glioxil-agarose	Covalente	Aminação	-	Síntese	Fernandez-Lorente et al. (2008)
Quitosana magnética	Covalente	Etilcarbodiimida	-	-	Kuo et al. (2012)

Continua

Continuação Tabela 2

Celite	Covalente	-	-	Butirato de butila	Castro et al. (1999)
CNBr-agarose	Covalente	-	Triton X	-	Cunha et al. (2008)
Sílica magnética	Covalente	-	-	-	Ranjbakhsh et al. (2012)
Accurel EP 1000	Adsorção	-	-	-	Menoncin et al. (2009)
Carvão ativo	Adsorção	-	-	-	Menoncin et al. (2009)
Accurel EP700	Adsorção	-	-	Ester	Oliveira et al. (2000)
Sepabeads	Adsorção	-	-	Diacetina	Hernandez et al. (2011)
Amberlite IRC 50	Adsorção	-	-	Butirato de butila	Abbas; Comeau, (2003)
Estireno-divinilbenzeno	Adsorção	-	-	Butirato de butila	Oliveira et al. (2000)
Polimetilacrilamida	Adsorção	-	-	Butirato de butila	Santos et al. (2007)
Celulignina	Adsorção	-	-	Butirato de butila	Gomes et al. (2005)
Quitosana (grânulos)	Adsorção	-	-	-	Pereira et al. (2001)
Quitosana (grânulos)	Adsorção	-	-	Butirato de butila	Pereira et al. (2002)
Quitosana (flocos)	Adsorção	-	-	Butirato de butila	Pereira et al. (2003)
Quitosana (grânulos)	Adsorção	-	-	Butirato de butila	Pereira et al. (2003)
Agarose	Adsorção	-	-	Enantiosseletividade	Palomo et al. (2007)
Sílica (matrizes)	Adsorção	-	-	-	Soares et al. (2004)
Sepabeads	Adsorção	-		Enantiosseletividade	Wilson et al. (2006)
Agarose	Adsorção	-	-	Enantiosseletividade	Wilson et al. (2006)
Estireno-divinilbenzeno	Adsorção	-	-	Butirato de butila	Oliveira et al. (2000b)
Amberlite	Adsorção	-	-	Ésteres de nitrato	Roy; Chawla, (2001)
Accurel	Adsorção	-	-	Oleato de butila	Severac et al. (2011)
Octyl-agarose	Adsorção	-	-	-	Cunha et al. (2008)
Octadecyl-sepabeads	Adsorção	-	-	-	Cunha et al. (2008)
MANAE-agarose	Adsorção	-	-	-	Cunha et al. (2008)

Continua

Continuação Tabela 2

Coco verde	Adsorção	-	-	-	Pinheiro et al. (2005)
Vidro	Adsorção	-	-	Síntese	Gunnlaugsdottir et al. (1998)
Silica	Adsorção	-	-	Esterificação	Vaidya et al. (2008)
Quitosana	Adsorção	-	-	↑ valor nutricional	Aguiar et al. (2010)
Celite	Adsorção	-	-	-	Alloue et al. (2008)
Casca de coco verde	Adsorção	-	-	Butirato de butila	Brígida et al. (2008)
Sepabeads	Adsorção	-	-	Síntese de ésteres	Nieto et al. (2005)
Microesferas	Adsorção	-	-	-	Guo et al. (2003)
Óxido de nióbio	Adsorção	-	-	Butirato de butila	Castro et al. (2000)
SiO_2–PVA	Adsorção	-	PEG	Butirato de butila	Paula et al. (2008)
Polipropileno (pó)	Adsorção	-	-	Enantiosseletividade	López et al. (2002)
Celulose e sílica gel	Adsorção	-	-	-	Hwang et al. (2004)
Sílica	Adsorção	-	-	-	Kang et al. (2007)
Sílica	Adsorção	-	-	Esterificação	Park et al. (2006)
Argila	Adsorção	-	-	Transesterificação	Tzialla et al. (2010)
Zeólito	Adsorção	-	-	-	Knezevic et al. (1998)
Cerâmica	Adsorção	-	-	Enantiosseletividade	Kamori et al. (2000)
Quitosana	Adsorção	-	-	Esterificação	Romdhane et al. (2011)
Celite	Adsorção	-	-	Enantiosseletividade	Brem et al. (2012)
Alginate	Adsorção	-		-	Mondal et al. (2006)
PVA magnético	Adsorção	-	-	-	Schultz et al. (2007)
Espuma	Adsorção	-	-	Transesterificação	Shakeri; Kawakami, (2010)
PVAmagnético	Adsorção	-	-	-	Schultz et al. (2013)
Sílica	Adsorção	-	-	Transesterificação	Kramer et al. (2010)
Octyl Sepharose	Adsorção		Triton-X	Enantiosseletividade	Ruiz et al. (2013)

Continua

Continuação Tabela 2

Celulose-PVA	Adsorção	-	-	Esterificação	Dhake et al. (2011)
Quitosana	Adsorção	-	-	-	Jenjob et al. (2012)
Membrana polimérica	Adsorção	-	-	Enantiosseletividade	Giorno et al. (2007)
Junta	Adsorção	-	-	-	Chattopadhyay et al. (2012)
Casca de ovo	Adsorção	-	-	-	Chattopadhyay et al. (2012)
$CaCO_3$	Adsorção	-	-	Esterificação	Horchani et al. (2012)
Poliuretano	Adsorção	-	-	-	Dhake et al. (2013)
Partículas Magnéticas	Encapsulação	-	-	-	Mahmood et al. (2008)
Suporte magnético	Encapsulação	-	-	Esterificação	Meng et al. (2013)
Celulose	Encapsulação	-	-	-	Kim et al. (2012)
Sílica gel magnética	Encapsulação	-	-	Enantiosseletividade	Yilmaz et al. (2011)
Silica-gel	Encapsulação	-	-	Enantiosseletividade	Brem et al. (2012)
Pectina	Encapsulação	-	-	-	Costas et al. (2008)
Sílica gel	Encapsulação	-	PEG	Esterificação	Yang et al. (2010)
Sílica gel	Encapsulação	-	-	Enantiosseletividade	Yang et al. (2009)
Quitosana	Encapsulação	-	-	-	Tang et al. (2007)
Quitosana	Encapsulação	Glutaraldeido	-	Esterificação	Romdhane et al. (2011)
Polivinil (resina)	Encapsulação	-	-	Ésteres aromáticos	Chen et al. (2003)
Organo-gel	Encapsulação	-	-	Esterificação	Jesus et al. (1997)
Sílica (matrizes)	Encapsulação	-	PEG	-	Soares et al. (2004)
SiO_2–PVA	Encapsulação	-	-	Butirato de butila	Paula et al. (2008)
Sílica gel	Encapsulação	-	PEG	Butirato de butila	Soares et al. (2005)
Sílica-gel	Encapsulação	-	PEG	-	Pinheiro et al. (2008)
Sílica-gel	Encapsulação	-	PEG	-	Pinheiro et al. (2008b)
Sílica-gel-Fe_3O_4	Encapsulação	-	PVA	Butirato de etila	Chen et al. (2003)
Caseinato de sódio	Encapsulação	-	-	Síntese de ésteres	Sebrão et al. (2007)

Tabela 3. Microrganismos utilizados para produção de lipases e técnicas usadas para caracterização dos derivados imobilizados produzidos.

Fonte da lipase	Procedência	Caracterização	Referencia
Alcaligenes sp.	Meito Sangyo	Temperatura	Wilson et al. (2006)
Alcaligenes sp.	Meito Sangyo	MEV	Park et al. (2006)
Arthobacter sp.	Laboratório	MEV	Abrol et al. (2007)
Arthrobacter sp.	Laboratório	Diâmetro; reuso	Bhushan et al. (2008)
Arthrobacter sp.	Laboratório	MEV	Yang et al. (2009)
Aspergillus niger	Novozymes	-	Lopez-serrano et al. (2002)
Aspergilus niger	Amano	-	Sebrão et al. (2007)
Bacillus coagulans	Laboratório	-	Pahujani et al. (2008)
Bacillus sp.	Laboratório	K_m/V_{max}	Kumar et al. (2013)
Bacillus stearothermophilus	Laboratório	-	Hwang et al. (2004)
Brevibacillus agri	Laboratório	MEV	Costas et al. (2008)
Burkholderia cepacia	Amano	K_m/V_{max}; FTIR	Da Rós et al. (2010)
Burkholderia cepacia	Amano	-	Palomo et al. (2005)
Burkholderia cepacia	Amano	-	Moreira et al. (2007)
Burkholderia cepacia	Laboratório	MEV; Poros	Yang et al. (2010)
Burkholderia cepacia	Wako	K_m/V_{max}	Wang et al. (2012)
Burkholderia sp	Laboratório	MEV; reuso	Tran et al. (2012)
Candida antarctica	Novozymes	-	Hernandez et al. (2011b)
Candida antarctica	Laboratório	-	Casa et al. (2002)
Candida antarctica	Novozymes	-	Severac et al. (2011)
Candida antarctica	Novozymes	-	Pinheiro et al. (2005)
Candida antarctica	Novozymes	-	Rodrigues et al. (2008)
Candida antarctica	Novozymes	-	Vaidya et al. (2008)
Candida antarctica	Novozymes	-	Brígida et al. (2008)
Candida antarctica	Novozymes	SEM	Brígida et al. (2007)
Candida antarctica	Novozymes	-	Cruz Jr et al. (2007)
Candida antarctica	Novo Nordisk	MEV	Arroyo et al., (1999)
Candida antarctica	Fluka	FTIR; Raio-X	Tzialla et al. (2010)
Candida antarctica	Novozymes	Reuso	Schultzet al. (2013)
Candida antarctica	Novozymes	-	Kramer et al. (2010)
Candida antarctica	Novozymes	-	Schultz et al. (2013)
Candida antarctica	Novozymes	pH; Temperatura	Barbosa et al. (2012)
Candida cylindracea	Sigma	MEV	Chen et al. (2003)
Candida cylindracea	Sigma	-	Jesus et al. (1997)
Candida cylindracea	Sigma	-	Knezevic et al. (1998
Candida cylindracea	Sigma	-	Sanches et al. (1996)
Candida cylindraceae	Sigma	-	Amorim et al. (2003)
Candida cylindraceae	Sigma	MEV	Guo et al. (2003)
Candida cylindraceae	Sigma	Raio-X; reuso	Mahmood et al. (2008)
Candida rugosa	Sigma	-	Castro et al. (2001)
Candida rugosa	Sigma	-	Oliveira et al. (2000)
Candida rugosa	Sigma	pH; Temperatura	Santos et al. (2007)
Candida rugosa	Sigma	K_m/V_{max}	Perez et al. (2007)

Continua

Continuação Tabela 3

Candida rugosa	Sigma	Análise elemental	Gomes et al. 2005)
Candida rugosa	Sigma	pH; Temperatura	Gomes et al. (2004)
Candida rugosa	Sigma	K_m/V_{max}	Pereira et al. (2001)
Candida rugosa	Sigma	-	Pereira et al. (2002)
Candida rugosa	Sigma	K_m/V_{max}; reuso	Pereira et al. (2003)
Candida rugosa	Sigma	-	Soares et al. (2001)
Candida rugosa	Sigma	-	Soares et al. (2003)
Candida rugosa	Sigma	-	Mendes et al. (2006)
Candida rugosa	Sigma	Área; FTIR	Soares et al. (2004)
Candida rugosa	Sigma	FTIR	Miranda et al. (2006)
Candida rugosa	Sigma	-	Soares et al. (2003)
Candida rugosa	Sigma	K_m/V_{max}; FTIR	Paula et al. (2008)
Candida rugosa	Biocatalysts	FTIR; Área; poros	Santos et al. (2008a)
Candida rugosa	Sigma	MEV; Raio-X; FTIR	Santos et al. (2008b)
Candida rugosa	Sigma	-	Soares et al. (2002)
Candida rugosa	Sigma	Análise elemental	Soares et al. (1999)
Candida rugosa	Sigma	MEV; área e poros	Soares et al. (2005)
Candida rugosa	Sigma	K_m/V_{max}	Simoes et al. (2011)
Candida rugosa	Sigma	-	Soares et al. (2006)
Candida rugosa	Sigma	MEV; FTIR; poros	Pinheiro et al. (2008a)
Candida rugosa	Sigma	-	Pinheiro et al. (2008b)
Candida rugosa	Sigma	Poros; Raio-X;	Chen et al. (2003)
Candida rugosa	Sigma	pH; Temperatura;	Oliveira et al. (2000b)
Candida rugosa	Sigma	-	Hung et al. (2003)
Candida rugosa	Sigma	TGA; TEM	Wu et al. (2009)
Candida rugosa	Sigma	TGA	Yilmaz et al. (2011)
Candida rugosa	Sigma	TGA	Castro et al. (2000)
Candida rugosa	Sigma	-	Braga et al. (2005)
Candida rugosa	Amano	-	Chang et al. (2008)
Candida rugosa	Sigma	-	López et al. (2002)
Candida rugosa	Sigma	TGA; FTIR; MEV	Mendes et al. (2007)
Candida rugosa	Sigma	-	Bryjak et al. (2006)
Candida rugosa	Sigma	-	Ozyilmaz et al. (2009)
Candida rugosa	Laboratório	Diâmetro; MEV	Brandy et al. (2008)
Candida rugosa	Wuxi Enzyme	MEV	Tang et al. (2007)
Candida rugosa	Amino Inc.	Análise elemental	Chiou et al. (2004)
Candida rugosa	-	MEV; Poros	Vaidya et al. (2008)
Candida rugosa	Sigma	K_m/V_{max}; reuso	Cui et al. (2010)
Candida rugosa	Sigma	Porosidade	Gao et al. (2010)
Candida rugosa	Sigma	-	Orrego et al. (2010)
Candida rugosa	Sigma	-	Pospiskova; Safarik, (2013)
Candida rugosa	Meito Sangyo	FTIR; MEV	Siódmiak et al. (2013)
Candida rugosa	Sigma	K_m/V_{max}; reuso	Cui et al. (2010)
Candida rugosa	Sigma	Reuso; MEV	Huang et al. (2011)
Candida rugosa	Sigma	K_m/V_{max}; reuso	Shu et al. (2011)
Candida rugosa	Sigma	pH; Temperatura	Ren et al. (2011)

Continua

Continuação Tabela 3

Candida rugosa	Sigma	pH; Temperatura	Yilmaz et al. (2011)
Candida rugosa	Novozymes	-	Ruiz et al. (2013)
Candida rugosa	Sigma	-	Safarik et al. (2012)
Candida rugosa	Sigma	Reuso	Kim et al. (2012)
Candida rugosa	Amano	pH; Temperatura	Kuo et al. (2012)
Candida rugosa	Amano	-	Jenjob et al. (2012)
Candida rugosa	Sigma	-	Giorno et al. (2007)
Candida rugosa	Amano	pH; Temperatura;	Chen et al. (2012)
Candida rugosa	Sigma	-	Peng et al. (2013)
Candida rugosa	Sigma	pH; Temperatura	Wu et al. (2012)
Candida rugosa	Biocatalysts	Reuso	Kartal et al. (2011)
Candida sp.	CTA Biotech.	Area; poros	Wang et al. (2011)
Escherichia coli	Laboratório	-	Fernandez-Lorente et al. (2008)
Geotrichum sp.	Laboratório	-	Yan et al. (2011)
Humicola lanuginosa	Novo Nordisk	-	Gunnlaugsdottir et al. (1998)
Lipase pancreática	SRL (India)	FTIR; reuso	Chattopadhyay et al. (2012)
Lipase pancreática suína	Sigma	-	Castro et al. (1999)
Lipase pancreática suína	Sigma	-	Palomo et al. (2007)
Lipase pancreática suína	Kin Master	pH; Temperatura	Aguiar et al. (2010)
Lipase pancreática suína	Sigma	-	Bautista et al. (1998)
Lipase pancreática suína	Kin Master	-	Agnes et al. (2003)
Lipase pancreática suína	Sigma	FTIR; TEM; Raio-X	Kang et al. (2007)
Lipase pancreática suína	Sigma	K_m/V_{max}; reuso	Ranjbakhsh et al. (2012)
Lipase pancreática suína	Sigma	-	Lei et al. (2009)
Mucor javanicus	Amano	MEV	Meng et al. (2013)
Mucor miehei	Novozymes	FTIR; reuso	Bruno et al. (2008)
Mucor miehei	Novozymes	-	Bruno et al. (2004)
Mucor sp.	Laboratório	-	Abbas; Comeau, (2003)
Penicillium camembertii	Amano	-	Freitas et al. (2010)
Penicillium verrucosum	Laboratório*	-	Menoncin et al. (2009)
Pseudomonas cepacia	Amano	-	Kamori et al. (2000)
Pseudomonas cepacia	Amano	K_m/V_{max}; reuso	Mondal et al. (2006)
Pseudomonas cepacia	Amano	pH; Temperatura	Dhake et al. (2013)
Pseudomonas fluorescens	Novozymes	MEV; reuso	Foresti et al. (2007)
Pseudomonas fluorescens	Amano	FTRI; Raio-X; MEV	Santos et al. (2008c)
Pseudomonas fluorescens	Amano	-	Silva et al. (2011)
Pseudomonas fluorescens	Amano		Brem et al. (2012)
Pseudomonas fluorescens	Amano	-	Lima et al. (2013)
Pseudomonas gessardii	Laboratório	-	Ramani et al. (2012)
Pseudomonas sp.	Amano	-	Roy; Chawla, (2001)
Rhizomucor meihei	Novozymes	FTIR	Collins et al. (2011)
Rhizomucor miehei	Novo Nordisk	-	Oliveira et al. (2000)
Rhizomucor miehei	Roche	-	Nieto et al. (2005)
Rhizomucor miehei	Sigma	FTIR; MEV	Karagoz et al. (2010)
Rhizomucor miehei	Novozymes	-	Poppe et al. (2013)

Continua

Continuação Tabela 3

Rhizopus oryzae	Biocatalysts	-	Paula et al. (2010)
Rhizopus oryzae	Laboratório	-	Lee et al. (2006)
Rhizopus oryzae	Biocatalysts	-	Paula et al. (2010)
Rhizopus oryzae	Amano	-	Shakeri; Kawakami, (2010)
Rhizopus oryzae	Laboratório	pH; Temperatura	Elnashar et al. (2013)
Rhizopus oryzae	Sigma	Reuso	Dhake et al. (2011)
Staphylococcus haemolyticus	Laboratório	pH; Temperatura;	Kim et al. (2013)
Staphylococcus xylosus	Laboratório	-	Horchani et al. (2012)
Talaromyces thermophilus	Laboratório	SEM	Romdhane et al. (2011)
Thermomyces lanuginosa	Laboratório	MEV	Gupta et al. (2009)
Thermomyces lanuginosus	Novozymes	Bases de Schiff's	Mendes et al. (2011)
Thermomyces lanuginosus	Novo Nordisk	MEV	Dizge et al. (2009)
Thermomyces lanuginosus	Novo Nordisk	MEV	Yucel, (2011)
Yarrowia lipolytica	Laboratório	-	Cunha et al. (2008)
Yarrowia lipolytica	Laboratório	MEV	Alloue et al. (2008)

*Lipases produzidas na própria Instituição de Pesquisa. MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura; FTIR: Infravermelho por Transformada de Fourrier.

2.1.7 Secagem de enzimas em processos de imobilização

O conteúdo de água do produto desidratado é um importante parâmetro de qualidade que deve ser monitorado. Sabe-se que uma das grandes limitações na produção e utilização de enzimas e proteínas para fins comerciais reside na manutenção de sua estabilidade física e química quando estas se encontram em solução. Em termos estruturais, a estabilidade de uma proteína pode ser definida como a propriedade de manutenção da conformação nativa que apresenta atividade biológica. Instabilidade química está relacionada com a formação ou destruição de ligações covalentes, dentro de um polipeptídeo ou molécula de proteína, alterando sua estrutura primária. Exemplos comuns de instabilidade química incluem hidrólise, desamidação, oxidação, alteração da ponte dissulfeto, β-eliminação, racemização e reação de Maillard (JACOB et al., 2006). Instabilidades físicas geralmente envolvem alterações na estrutura secundária, terciária e quaternária da proteína como, por exemplo, agregação, precipitação e adsorção (JACOB et al., 2006).

Existem muitos métodos para determinar a umidade de uma amostra e, a escolha do método vai depender da forma como a água está presente na amostra, da natureza da amostra, da quantidade relativa de água, da rapidez desejada na determinação e do equipamento disponível. A água pode estar presente na amostra sob duas formas: (A) água livre: é a água que está simplesmente adsorvida no

material, é a mais abundante. É perdida facilmente à temperaturas em torno da ebulição e (B) água ligada: é a água da constituição, que faz parte da estrutura do material, ligada a proteínas, açúcares e adsorvida na superfície de partículas coloidais, e necessita de níveis elevados de temperatura para sua remoção. Dependendo da natureza da amostra, requer temperaturas diferentes para a sua remoção, que frequentemente não é total e em alguns casos não é eliminada nem a temperaturas que carbonizem parcialmente a amostra.

Devido à esta baixa estabilidade apresentadas pelas formas líquidas, composições sólidas (desidratadas), são frequentemente desenvolvidas de forma a proporcionar uma estabilidade física e química aceitável às enzimas principalmente a longo prazo. Diante disso, a secagem tornou-se um dos mais efetivos métodos de se preservar produtos biológicos.

A secagem, independente do equipamento utilizado, implica em fortes mudanças físico-químicas da composição líquida em um meio complexo. Essas transformações do produto não podem ser descritas de forma simples, e continuam ocorrendo durante o armazenamento (DUMOULIN; BIMBENET, 1998).

Existem diversos equipamentos que podem ser utilizados na desidratação de produtos biológicos, dentre os quais tem-se o liofilizador, “spray dryer”, leito de jorro, leito fluidizado entre outros. A seguir apresenta-se uma descrição dos principais equipamentos de secagem utilizados nesse trabalho.

Secagem por liofilização (“freeze drying”)

A liofilização é o método mais comumente utilizado para a preparação de proteínas desidratadas em pequena escala, as quais devem apresentar estabilidade adequada por longo período de armazenagem em temperatura ambiente. É um processo de secagem constituído de três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária. A finalidade do congelamento dentro do processo de liofilização consiste na imobilização do produto a ser liofilizado, interrompendo reações químicas e atividades biológicas. O material, previamente congelado, é desidratado por sublimação seguida pela dessorção, utilizando-se baixas temperaturas de secagem a pressões reduzidas. A estrutura e forma do produto,

assim como a taxa de sublimação, são determinadas pelo processo de congelamento. Esta é uma das etapas mais críticas do processo de liofilização uma vez que a estrutura da proteína não deve ser alterada durante o processo de secagem (TATTINI Jr et al., 2006). Entretanto, a ocorrência de danos irreversíveis é um problema muitas vezes relatado quando se utiliza a liofilização como processo de secagem de enzimas (MURGATROYD et al., 1997).

Secagem por nebulização(“spray drying”)

O processo de secagem por nebulização, também chamado de “spray drying”, é objeto de grande interesse em diversas áreas de conhecimento como nas ciências alimentícias, farmacêuticas e na área química. O processo de secagem por nebulização ocorre em quatro etapas: atomização do líquido de alimentação; contato do fluido aspergido com o ar quente na câmara de secagem; secagem do fluido aspergido (evaporação da umidade) e recuperação do produto seco. Com a utilização do “spray dryer” é possível a transformação de produtos líquidos e pastosos para a forma de pós secos em uma única etapa. Os pós produzidos por este equipamento reúnem padrões elevados de qualidade com relação à granulometria do produto, umidade final, homogeneidade, densidade e forma, sendo que estas características podem ser alteradas por modificações nos parâmetros do processo de secagem (SOUZA, 2003; ETZEL, 1996). Além disto, dada sua versatilidade e o pequeno tempo de residência dos produtos na câmara de secagem, tornou-se o principal equipamento para a secagem de materiais que apresentam sensibilidade ao calor, como alimentos e materiais de origem biológica. Dentre estes cabe citar os extratos e produtos oriundos de plantas como corantes e de microrganismos como enzimas e proteínas (COSTA-SILVA et al., 2010).

Secagem em leito de jorro

Na operação de secagem contínua em leito de jorro, o material a ser seco é normalmente alimentado ao sistema com o auxílio de uma bomba peristáltica e um sistema de atomização onde as gotículas recobrem a superfície das partículas inertes, previamente aquecidas por convecção pelo ar de jorro. A película úmida é seca por transferência de calor convectiva fornecido pelo ar aquecido de jorro e por

condução do calor absorvido pelas partículas de teflon por exemplo (partículas inertes). O processo de secagem continua até que o conteúdo de umidade da gota atinja um valor crítico, quando a camada se torna suficientemente seca para ser fraturada (SOUZA, 2007). A camada seca é então quebrada e removida da superfície do teflon devido a colisões partícula-partícula e colisões partícula-parede da câmara de secagem (abrasão e/ou atrito). A Figura 5 apresenta um esquema geral do processo de secagem sobre a superfície de partículas inertes em leito de jorro.

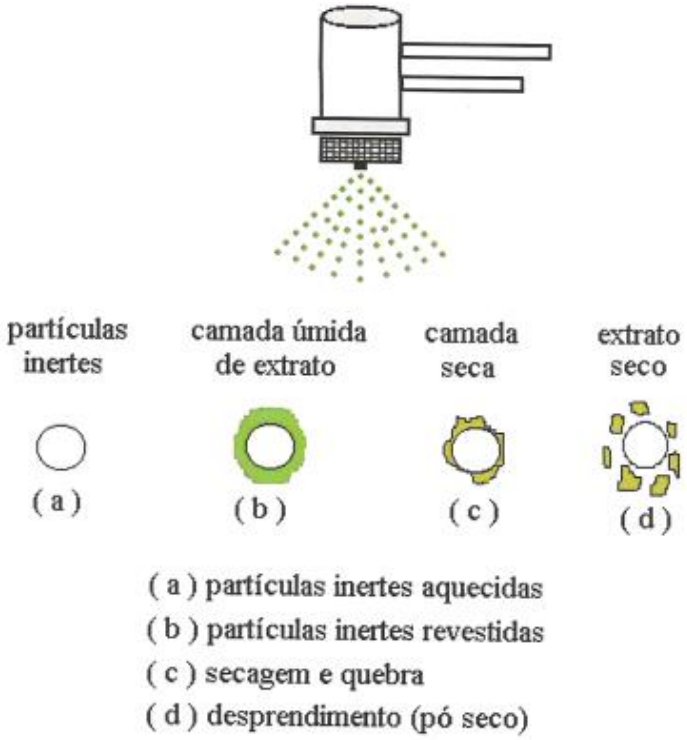


Figura 5. Representação esquemática do processo de secagem sobre a superfície de partículas inertes em leito de jorro (Adaptado de CANMET,1999 por SOUZA 2007).

2.1.7.1 Influência do conteúdo de água na aplicabilidade do biocatalisador

Além da influência do conteúdo de água na estabilidade enzimática existe outra questão importante que é a influência da água durante a própria catálise enzimática. Até pouco tempo, havia a concepção de que as enzimas tinham pouca utilidade em síntese orgânica, devido principalmente à ideia preconcebida de que somente o meio aquoso era propício para manter a conformação estrutural de uma enzima cataliticamente ativa. Entretanto, sabe-se atualmente que, muitas enzimas

são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos naturais com eficiência similar àquela encontrada em soluções aquosas, ou em certos casos, até superior (BRINK et al., 1988). Isto é importante uma vez que o equilíbrio termodinâmico em muitos processos de síntese, como na produção de ésteres a partir de ácidos carboxílicos e álcoois, são desfavoráveis em água (LEUENBERGER, 1990).

Em estudos recentes de biocatálise em solventes orgânicos foi observado que a atividade catalítica das enzimas esta bem correlacionada com a quantidade de água ligada à enzima (ADLERCREUTZ, 2013). Entretanto é difícil medir e ajustar a quantidade de água ligada ao biocatalisador. Foi proposto o uso da atividade de água para quantificar o conteúdo de água presente em uma mistura reacional orgânica para biocatálise. Esse parâmetro correlaciona bem a quantidade de água ligada a enzima em uma variedade de condições, especialmente em solventes orgânicos imiscíveis em água (HALLING, 1994). A atividade de água varia entre 0 (sistemas completamente secos) a 1 (sistemas saturados em água). Foi verificado que a capacidade do suporte utilizado para imobilização da enzima em absorver água tem grande influência na atividade catalítica do derivado imobilizado produzido (RESLOW et al., 1988). Alguns efeitos negativos da presença de água são: inibição pela interferência da ligação da enzima com o substrato; formação de uma barreira de difusão para o uso de substratos hidrofóbicos e favorecimento da hidrólise a qual compete com a reação desejada (esterificação ou transesterificação). A água é um substrato nas reações de hidrólise e é, portanto, natural que o aumento da atividade de água tenha um efeito positivo nesse tipo de reação. Por outro lado, quando a esterificação ou transesterificação são as reações principais, as moléculas de água podem interferir negativamente (WEHTJE; ADLERCREUTZ, 1997). Na reação de esterificação tem-se a forma de inibição pelo produto conduzindo a redução na taxa de reação. Um aumento na concentração de álcool favorece a esterificação no lugar da hidrólise. No caso da transesterificação, a competição pela hidrólise é que direciona a formação do produto.

Há muitos relatos na literatura sobre o efeito da atividade de água (A_w) na atividade catalítica de hidrolases em meios orgânicos. Estes estudos mostram que diferentes enzimas requerem diferentes valores de atividades de água. Os casos extremos são as glicosidases, que frequentemente requerem uma atividade de água mínima de 0,6 e as lipases que podem ser ativas em valores muito próximos a zero

(MA; PERSSON; ADLERCREUTZ, 2002). Os melhores resultados para a maioria das lipases, entretanto, são obtidos com valores de A_w entre 0,25 e 0,45 (VILLENEUVE, 2007).

Diante da influência do conteúdo de água no potencial catalítico das enzimas era de se esperar uma descrição mais detalhada dos métodos de desidratação nos protocolos de imobilização das enzimas. Entretanto, quando se faz uma busca na literatura especializada percebe-se que não há uma preocupação com esta questão. O problema fica ainda maior quando se usa lipase como modelo para desenvolvimento destes protocolos. Esta enzima possui uma alta versatilidade catalítica e esta é moldada pelo conteúdo de água presente no meio reacional. Assim, levando em consideração o papel do conteúdo de água tanto na questão da estabilidade enzimática, principalmente a longo prazo, quanto sua influência nas propriedades catalíticas das enzimas, este trabalho tem como um dos objetivos a avaliação de diferentes protocolos de secagem durante a imobilização da enzima em estudo.

2.2 Relevância do tema

A Tecnologia Enzimática apresenta relevância crescente, na academia e na indústria. Este interesse é motivado pela necessidade do desenvolvimento auto-sustentável, que pressupõe o uso de matérias primas renováveis por processos que gerem produtos de qualidade através de tecnologias limpas.

Existe um amplo consenso na comunidade científica de que a Avaliação do Ciclo de Vida (*Life-Cycle Assessment – LCA*) é um dos melhores métodos para avaliação dos encargos ambientais associados a processos industriais. Além de identificar energia e materiais utilizados, bem como resíduos e emissões liberadas para o meio ambiente, essa avaliação também permite a identificação de oportunidades de melhorias para o meio ambiente. Em um sentido mais geral, bioprocessos sustentáveis são processos que minimizem os impactos ambientais, são economicamente atraentes e socialmente responsáveis. O uso de enzimas em processos industriais é frequentemente associado à redução do consumo de energia, insumos químicos e produção de resíduos. Oxenbøll e Ernst (2008) examinaram várias enzimas utilizadas nas indústrias de alimentos e determinaram o

impacto sobre as emissões de gases de efeito estufa em relação aos processos não enzimáticos. Como exemplo, o uso de uma fosfolipase para degomagem de óleo vegetal resultou em uma redução de 44 toneladas de gases de efeito estufa (como o CO_2) por 1000 toneladas de óleo produzido. A maioria destas reduções foi realizada por meio de melhorias no rendimento do óleo, o que resultou na redução da intensidade agrícola, uma grande contribuinte da produção de gases de efeito estufa.

Embora estejam inseridos em uma pequena fração do mercado global de enzimas, sistemas de enzimas imobilizadas têm melhorado e habilitado muitos processos industriais e minimizado impactos indesejados (DEMARCHE et al., 2012). Por exemplo, as enzimas imobilizadas permitem processamento contínuo, que por sua vez pode levar a menores custos de produção e consumo de energia. Consumo de produtos químicos e geração de resíduos também podem ser substancialmente reduzidos através da utilização de enzimas imobilizadas. Também deve ser reconhecido que, apesar de importante, o benefício ambiental obtido a partir do uso de enzimas insolúveis não é o principal motivo para seu uso. Razões econômicas muitas vezes são levadas em consideração primariamente.

Holm e Cowan (2008) aplicaram o método LCA para comparar o processo de interesterificação de óleo pelas rotas químicas e enzimáticas (enzimas imobilizadas). A interesterificação usando biocatalisadores imobilizados apresentou impactos ambientais muito menores devido à menor geração de subprodutos, menor temperaturas de operação e redução do consumo de água. Ambos os impactos econômicos e ambientais de uma enzima imobilizada são uma função da produtividade global do biocatalisador. Um limiar de 5-10 toneladas de produto por cada quilo de biocatalisador imobilizado tem sido citado como necessário para uma relevância industrial (NIELSEN et al., 2008).

Além dos custos de produção da enzima, o impacto adicional tanto do preparo do suporte quanto do processo de imobilização em si devem ser levados em consideração. Por exemplo, um estudo de LCA realizado por Kim e colaboradores (2009) a produção de aldolase imobilizada teve um impacto ambiental maior do que outras enzimas avaliadas por causa de uma maior necessidade energética e menor produtividade da enzima. Foi identificado que o processo de produção de Sepabeads era a fonte primária de produção de gases de efeito estuda, cerca de 51-

83,0% do total. Grande parte desse impacto foi devido a matérias-primas utilizadas na produção do suporte. O processo de imobilização em si revelou-se também como o principal contribuinte para a acidificação e em dois em cada três casos, a eutrofização. Este estudo destacou o impacto da escolha do suporte sobre o perfil ambiental de um derivado imobilizado produzido. Assim, o uso de um suporte de imobilização com caráter ambientalmente benigno e condições de imobilização mais amenas são desejáveis.

O desenvolvimento da Tecnologia Enzimática reveste-se no Brasil de importância singular devido a sua disponibilidade única de recursos renováveis em quantidade e variedade e à necessidade vital da preservação ambiental e da qualidade da água. No entanto, o uso de enzimas industriais no Brasil ainda é pequeno. Estima-se que o mercado mundial de biocatalisadores seja superior a 4 bilhões de dólares, enquanto o mercado brasileiro está em torno de 200 milhões, prevalecendo as importações. Para tentar diminuir a dependência brasileira junto à tecnologia enzimática externa, o governo lançou algumas medidas para incentivar o desenvolvimento mais efetivo desta tecnologia no país. Uma dessas medidas foi a Lei da Inovação - nº 10.973 (2004) que estabelece o incentivo à inovação e à pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo, com vistas à capacitação e ao alcance da autonomia tecnológica e ao desenvolvimento industrial do País. A segunda medida foi a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia (PDB) através do Decreto 6.041 (08 de fevereiro de 2007), que inclui a produção e o uso de enzimas industriais e especiais no país e o seu uso em vários setores industriais.

Por suas características peculiares, as lipases possuem potencial para ampliar ainda mais sua gama de aplicações, o que gera uma forte pressão no sentido de identificar novas lipases produzidas por microrganismos que, por ventura, se revelem adequadas a um processo industrial específico. Entretanto, apesar das vantagens inquestionáveis, existe uma série de problemas práticos na utilização de enzimas. Dentre estes problemas, destaca-se: o elevado custo de isolamento e de purificação, a instabilidade das suas estruturas quando isoladas de seu ambiente natural e a dificuldade de detecção de substâncias inibidoras. Assim, vários métodos têm sido propostos para superar essas limitações, sendo que uma das mais bem sucedidas é a imobilização. O complexo enzima–suporte mantém as características físicas do suporte e ao mesmo tempo, retém a atividade biológica da enzima. O

sistema imobilizado permite a condução de reações em reatores contínuos, com fácil separação de catalisador–produto, e aumento da produtividade do processo (massa de substrato/massa de biocatalisador).

Diversos tipos de materiais podem ser empregados como suportes, como por exemplo, produtos naturais e até mesmo subprodutos agroindustriais. A possibilidade do uso destes materiais como suporte constitui uma alternativa versátil e economicamente favorável aos suportes poliméricos de origem sintética. Neste projeto investigou-se a viabilidade do emprego de vários produtos, incluindo-se subprodutos agroindustriais, como por exemplo, casca de arroz, palha e sabugo de milho, bagaço de cana, casca de coco verde entre outros. Assim, além dos benefícios obtidos pela imobilização da enzima, ter-se-ia vantagens ambientais e econômicas, já que o emprego destes materiais poderia reduzir o custo de produção.

A introdução de técnicas de imobilização de biocatalizadores suscita um interesse considerável em razão das vantagens apresentadas. Neste sentido, a utilização de lipase imobilizada tem se mostrado bastante promissora no que diz respeito à sua aplicabilidade e ao aumento do seu interesse comercial.

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliação de estratégias de imobilização de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* através do uso de suportes não convencionais (subprodutos agroindustriais e quitosana) e processos de secagem, caracterização do sistema enzima-suporte e avaliação de seu potencial biotecnológico.

3.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral proposto, as seguintes atividades específicas foram realizadas:

- Seleção de suportes que possibilitem a retenção da atividade enzimática, a reutilização e a estabilidade da enzima imobilizada;
- Caracterização das propriedades físico-químicas dos suportes utilizados: conteúdo de água, área superficial, porosidade e densidade etc.;
- Avaliação da encapsulação, adsorção e ligação covalente como métodos de imobilização da enzima;
- Avaliação de agentes químicos (glutaraldeído, metaperiodato de sódio e epicloridrina) para modificação e ativação da superfície dos suportes para realização da imobilização covalente;
- Avaliação de diferentes processos de secagem dos derivados imobilizados obtidos através do uso de “spray dryer”, leitos de jorro e fluidizado, liofilização e estufa;
- Caracterização físico-química dos derivados imobilizados obtidos: retenção da atividade enzimática, análise elemental, MEV, infravermelho, conteúdo de água, retenção da atividade enzimática após os ciclos de reação (reuso), ensaios de estabilidade;
- Comparação das propriedades bioquímicas e cinéticas da enzima livre com a forma imobilizada;
- Avaliação do potencial de aplicação biotecnológica dos derivados imobilizados através da produção de aroma e biodiesel.

4. Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

Visando uma melhor apresentação do estudo desenvolvido, será apresentada abaixo uma descrição das etapas envolvidas na produção, imobilização e secagem das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*.

4.1 Etapas envolvidas na preparação dos suportes e imobilização das lipases

A etapa deste projeto referente à produção, recuperação e purificação da lipase, estudos de retenção da atividade enzimática após os processos de imobilização e secagem, teste de estabilidade e reuso dos sistemas imobilizados foi realizada no Laboratório de Enzimologia Industrial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, sob orientação da Profa. Dra. Suraia Said. Os processos de preparo dos suportes agroindustriais e das partículas de quitosana, ensaios de imobilização, secagem e caracterização dos derivados imobilizados foram realizados no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Processos Farmacêuticos (LAPROFAR) desta mesma unidade, sob orientação do Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira. A Figura 6 apresenta um fluxograma descrevendo resumidamente as etapas envolvidas na produção, recuperação, purificação, imobilização e secagem da enzima, caracterização dos derivados imobilizados e aplicação biotecnológica.

O estudo teve início com o cultivo do fungo endofítico *Cercospora Kikuchii* em meio PDA (Potato Dextrose Agar) suplementado com farelo de soja. Após o crescimento fúngico, a massa micelial foi utilizada para a realização da fermentação submersa e produção da enzima de interesse, a lipase. O meio de cultura teve como agente indutor para produção da lipase o óleo de soja, o qual foi a principal fonte de carbono utilizada para o crescimento do fungo. Após o período de fermentação, o fluido de cultura contendo a lipase foi separado da massa micelial através da filtração a vácuo. O processo de imobilização foi realizado tanto com o uso do extrato bruto quanto com a lipase purificada. Para purificação da enzima foi utilizado colunas cromatográficas de interação hidrofóbica e exclusão.

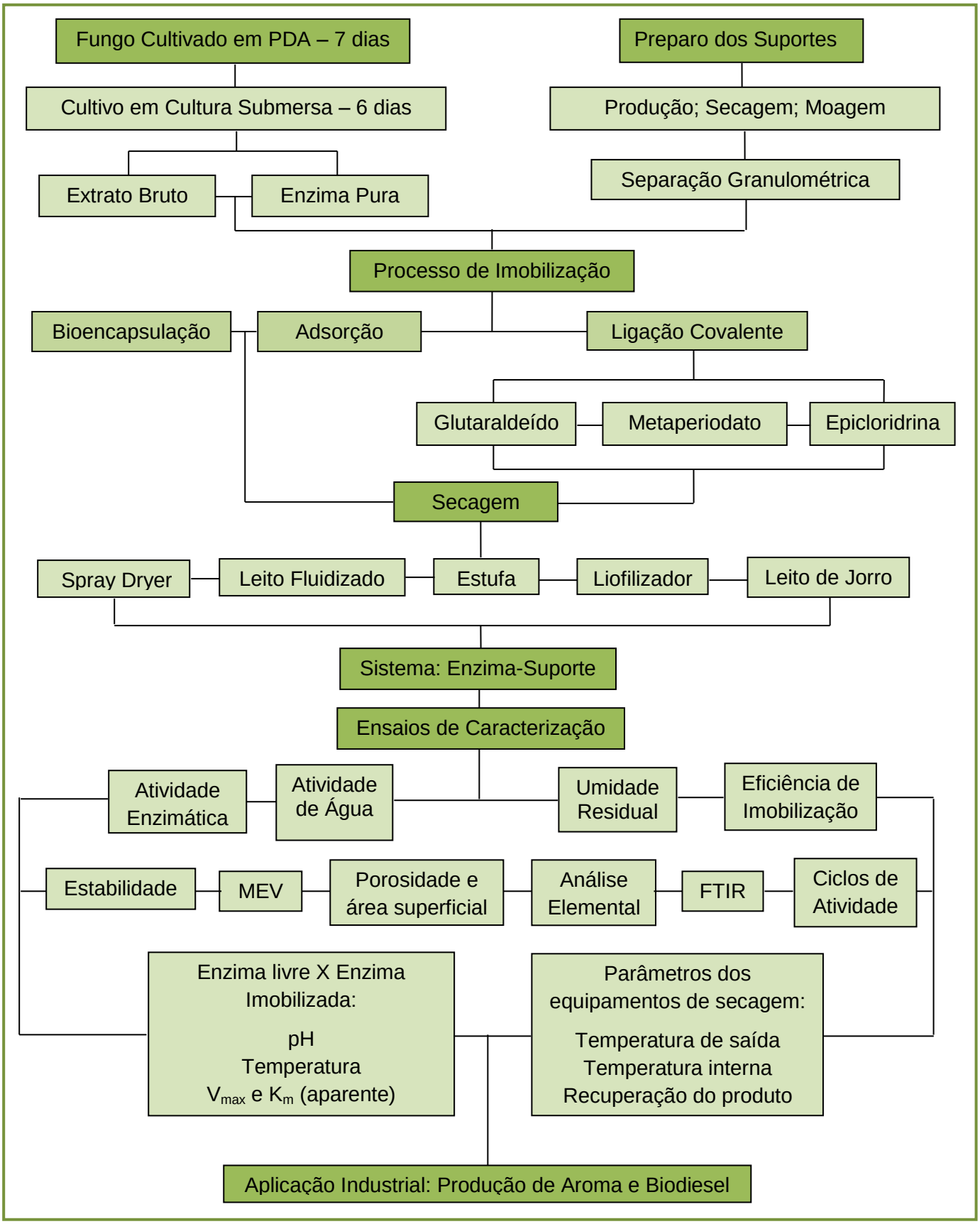


Figura 6. Esquema geral de produção, imobilização, secagem, caracterização e aplicação industrial das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*.

O método de secagem dos derivados imobilizados produzidos foi uma das inovações estudadas neste projeto, face à pouca informação disponível na literatura. Além disso, sabe-se do papel intrínseco que o conteúdo de água exerce sobre o potencial biotecnológico dos biocatalisadores produzidos. Os equipamentos de secagem avaliados foram: estufa de circulação de ar (secagem por convecção), liofilizador, “spray dryer”, leito de jorro e leito fluidizado.

Três tipos principais de imobilização foram estudados: a imobilização por adsorção, encapsulação e por ligação covalente. Para os estudos de ligação covalente, avaliou-se a utilização de agentes de ligação para a ativação da superfície do suporte preparando-os para o recebimento da enzima. Os agentes ligantes utilizados foram a epicloridrina, metaperiodato de sódio e o glutaraldeído.

Em paralelo à produção da enzima, foi realizada a seleção e preparo dos suportes a serem utilizados no processo de imobilização. Um dos critérios para seleção dos suportes, no caso dos subprodutos agroindustriais, foi a grande produção nacional dos mesmos juntamente com suas propriedades físico-químicas. O cultivo da cana de açúcar e do milho, por exemplo, geram toneladas de subprodutos como o bagaço de cana e sabugo/palha, respectivamente. Na preparação destes materiais realizou-se a lavagem, secagem em estufa seguida pela moagem para produção das partículas. Estas foram separadas na faixa granulométrica desejada antes do contato com a enzima. Foi realizada a caracterização desses materiais no que diz respeito ao conteúdo de água, tamanho das partículas, área superficial, volume e tamanho dos poros e composição química. Essas propriedades foram correlacionadas com a qualidade final dos derivados imobilizados obtidos.

Na imobilização por adsorção, a enzima foi colocada em contato com os subprodutos agroindustriais (suportes) para que ocorresse a imobilização por diferentes mecanismos de interação (interações iônicas, hidrofóbicas, forças de Van der Walls, etc). A solução foi filtrada e o derivado imobilizado obtido foi levado para secagem em estufa e liofilizador. Na utilização do “spray dryer” toda mistura (solução enzimática + suportes) foi levada para secagem. Na imobilização por ligação covalente, os suportes foram previamente ativados com diferentes agentes ligantes (glutaraldeído, metaperiodato de sódio e epicloridrina). Em seguida, os suportes já ativados foram colocados em contato com a enzima e o sistema enzima-suporte foi

submetido ao processo de secagem. Na imobilização covalente os equipamentos de secagem utilizados foram: estufa, liofilizador e leito de jorro.

A quitosana, a qual advém da quitina que é uma grande fonte de resíduo produzido pela indústria pesqueira, também foi utilizada como suporte. Esse material também foi selecionado devido à suas propriedades físico-quimicas e ao baixo valor econômico. A quitosana foi processada de forma a obter-se uma solução de acetato de quitosana, a qual foi empregada nos processos de imobilização. Através do uso desse suporte foram avaliados novamente três processos de imobilização: adsorção, encapsulação e ligação covalente. Para encapsulação foram utilizadas as técnicas de “cross-liking” e “spray drying”. Para ligação covalente os três agentes ligantes foram mais uma vez utilizados para ativação do suporte. Os suportes ativados foram utilizados como partículas sementes durante a imobilização e secagem da enzima em leito fluidizado. Por fim, foi realizada a imobilização por adsorção na qual a enzima ficou em contato com as microesferas de acetato de quitosana e o sistema enzima-suporte levado para secagem em estufa e liofilizador.

Após a obtenção dos derivados imobilizados, estes foram usados nos ensaios de caracterização do produto e avaliação dos processos de imobilização e secagem. Esses ensaios consistiram na avaliação da retenção da atividade enzimática, teste de estabilidade, avaliação do reuso da enzima imobilizada, determinação do conteúdo de água, análise da morfologia das partículas, recuperação do produto, análise elemental, análise por infravermelho, entre outros.

A última etapa experimental deste trabalho constou-se da avaliação do potencial de aplicação biotecnológica dos melhores derivados obtidos. Para isso dois processos biotecnológicos de grande importância industrial foram selecionados: produção de aroma e biodiesel.

Portanto, a proposta desta tese é estudar as modificações nas propriedades das lipases de *C. kikuchii*, empregando-se diferentes protocolos de imobilização e secagem, visando o aumento do potencial de aplicação biotecnológica da enzima. É importante ressaltar que muitos dos métodos de imobilização utilizados, como a operação concomitante dos processos de secagem e imobilização, foram utilizados pela primeira vez nesse trabalho.

4.2 Reagentes e equipamentos

Os principais reagentes e equipamentos utilizados no trabalho estão apresentados a seguir:

Reagentes:

- Acetona, Cromoline;
- Albumina Bovina (BSA), Sigma;
- Álcool polivinílico, AcrosOrganics;
- Etanol, Cinética Química;
- Fenolftaleína, Colleman;
- Fosfato de sódio monobásico, LabSynth;
- Glutaraldeído, Fluka;
- Goma arábica, LabSynth;
- Hexano, Cromoline;
- Hidróxido de sódio, LabSynth;
- Óleo de coco – Frescoco;
- Óleo de oliva – Carbonell;
- Óleo de soja, marca comercial;
- Padrões cromatográficos (ésteres etílicos), Sigma;
- Palmitato de p-nitrofenila, Sigma;
- Polietilenoglicol, LabSynth;
- Potato Agar Dextrose, Himedia;
- Propanol, Cinética Química;
- Reagente de Bradford, Sigma;
- Triton X-100, Sigma;
- Trizma Base, Merck.

Equipamentos:

- Agitador de peneiras Bertel, com jogos de tamises;
- Agitador magnético (Nova Ética mod. 119);
- Agitador mecânico (Fisatom Mod. 713D) ;
- Analisador elementar de CHN Perkin Elmer 2400;
- Autoclave vertical (Phoenix, mod. 44239);
- Balança determinadora de umidade (Sartorius, mod. MA 35);
- Balanças analíticas e semi-analíticas (Marte e Mettler Toledo);
- Banho Maria Dubnoff (Tecnal, mod. 553);
- Banho-maria (Fisaton, mod. 550);
- Bomba à vácuo (Prismatec - mod. 131);
- Bomba peristáltica (Cole-Parmer, mod. 7553-75);
- Bureta digital (Bürette HirschmannTechcolor);
- Capela de fluxo laminar (Veco, mod. 0001-28);
- Centrífuga Eppendorf (mod. 5810R Eppendorf Instruments INC);
- Centrífuga Excelsa II (Fanem, mod. 206-BL);
- Cromatógrafo a gás (GC-3800, Varian Inc. Corporate Headequarters);
- Densímetro (DMA 35N EX – AntonPaar);
- Espectrofotômetro FTIR Bomem MB-100;
- Espectrofotômetro UV-VIS HP 8453 operando o *software* HP Chem-station®;
- Estufa de cultura (Fanem, mod. 002.CB);
- Estufa de secagem e esterilização (Fanem, mod. 315 SE);
- Incubadora (Tecnal, mod.Te-420);
- Liofilizador (SNL 108 B – Thermo Fischer Scientific);
- Medidor de atividade de água (AquaLab 4TEV, DecagonDevices);
- pH-metro (Micronal, mod. B474);
- Potenciômetro (TEC2, Tecnal);
- Sistema de filtração à vácuo;
- Titulador Karl Fischer (Titrino Plus 870 Methrohm);
- Viscosímetro (LVDVIIICP – CP520, BROOKFIELD).

4.3 Produção, recuperação, purificação e avaliação da atividade da lipase

4.3.1 Microrganismo, manutenção da cepa e condições de cultivo

No presente trabalho utilizou-se o fungo endofítico *Cercospora kikuchii* (Figura 7), isolado da planta *Tithonia diversifolia* e identificado pela Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Mattos do Laboratório de Taxonomia e Sistemática de Fungos "Coleção de Culturas Micoteca URM", Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Figura 7. Fungo endofítico *Cercospora kikuchii,* isolado da planta *Tithonia diversifolia* (Girassol mexicano), utilizado para produção das lipases.

A cepa foi mantida por repiques sucessivos em meio inclinado PDA (potato agar dextrose), suplementado com 1,5% de farelo de soja, no Laboratório de Enzimologia Industrial da FCFRP/USP. Os repiques foram realizados utilizando alça de platina, transferindo pedaços de micélio para meio fresco. A cultura foi incubada por sete dias em estufa a 30°C e mantida sob refrigeração ou inoculada no meio de cultura para produção da enzima.

Para a produção da enzima foi utilizado o meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956), suplementado com 2% de óleo de soja, como única fonte de carbono, no qual foram inoculados com 2 cm^2 de micélio do fungo endofítico previamente crescido como descrito anteriormente. As culturas foram incubadas a 30°C sob agitação constante (120 rpm) por 6 dias. Após esse período, o micélio formado foi removido por filtração a vácuo e o fluido de cultura contendo a lipase foi dialisado contra

tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 sob agitação constante em câmara fria a 5ºC. O volume de tampão utilizado em cada troca foi 25 vezes maior do que o volume do filtrado e foram realizadas 3 trocas. Em seguida, o fluido de cultura dialisado, foi utilizado para avaliação da atividade enzimática, proteína total, processo de purificação e processos de imobilização (COSTA-SILVA et al., 2011).

4.3.2 Separação e purificação

4.3.2.1 Recuperação, concentração e diálise do fluido de cultura

O processo de purificação foi realizado de acordo com trabalho desenvolvido previamente por nosso grupo de pesquisa (COSTA-SILVA et al., 2010). O fluido da cultura foi separado do micélio por filtração a vácuo, através de funil de Buchnner acoplado a kitassato e bomba a vácuo. Em seguida, com o intuito de eliminar interferentes na etapa de purificação e nas análises enzimáticas, foram utilizados filtros Millipore® (0,45 µm). O filtrado foi então dialisado contra tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 sob agitação constante em câmara fria a 5ºC. O volume de tampão utilizado em cada troca foi 25 vezes maior do que o volume do filtrado e foram realizadas 3 trocas. Em seguida, o filtrado dialisado, foi concentrado com polietilenoglicol (PEG 6000).

4.3.2.2 Cromatografia em coluna de interação hidrofóbica

O extrato bruto (8,0 mg de proteína) de uma cultura incubada por 6 dias, após diálise e concentração com polietilenoglicol, foi aplicado em coluna Butyl-Sepharose Fast Flow (2,0 x 30,0 cm), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 acrescentado de 1M de sulfato de amônio. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min^{-1} a 25ºC. As lipases adsorvidas à resina foram eluídas com o mesmo tampão diminuindo gradativamente a concentração de $(NH_4)_2SO_4$. Frações de 3,0 mL foram coletadas e mantidas em banho de gelo. A atividade enzimática e o teor de proteína foram avaliados em cada amostra.

4.3.2.3Cromatografia de gel filtração

As frações coletadas da cromatografia de interação hidrofóbica, foram concentradas utilizando polietilenoglicol e 1,5 mL foi aplicado em coluna de 1,0 cm x 58 cm empacotada com a resina Sephacryl S-200HR, equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 contendo 150 mM de NaCl, a 25ºC. A amostra foi eluída no mesmo tampão de equilíbrio com fluxo de 9,6 $mL.h^{-1}$ e as frações foram coletadas em intervalos de 15 minutos.

O perfil de eluição das proteínas foi acompanhado a 280 nm e a atividade lipolítica foi determinada nas frações eluídas.

4.3.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

A placa para eletroforese foi preparada com gel de concentração a 4% e de separação a 12%. A eletroforese desenvolveu-se em tampão Tris-Glicina SDS 25 mM, pH 8,3 (LAEMMLI, 1970), à temperatura ambiente e com corrente de 20mA. As amostras foram diluídas antes da aplicação no gel na proporção de 1:1 em um sistema tampão SDS-descontínuo (HAMES, 1987) sendo constituído por tampão Tris-HCl62,5 mM, pH 6,8, 2% de SDS, 5% de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol e 0,002% de azul de bromofenol. O gel permaneceu sob corrente constante até a saída do corante. O gel foi corado com prata através do método de Blum (1987). As proteínas padrões utilizadas foram: fosforilase B (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa).

4.3.3 Avaliação da atividade enzimática

4.3.3.1 Substrato: *p*-NPP

O ensaio para a determinação da atividade enzimática da enzima livre foi realizado de acordo com Mayordomo et al. (2000), o qual baseia-se na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenol (*p*-NPP) pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100 (Figura 8).

A atividade enzimática da lipase imobilizada também foi realizada de acordo com Mayordomo et al. (2000), com algumas modificações. Amostra de 0,015 g de

suporte contendo as lipases ligadas foi adicionado a 450 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 contendo 45 µL de uma solução de *p*-NPP 1,5 mg/mL. Após 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de trisma base 2%. A mistura reacional foi centrifugada e o sobrenadante utilizado para determinar a densidade óptica em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade (U) de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera um µmol de *p*-nitrofenol/minuto nas condições expressas acima. O branco foi composto pelos mesmos constituintes da mistura de reação, substituindo-se a massa de suporte por uma amostra inativada por fervura durante 50 minutos (COSTA-SILVA, 2010).

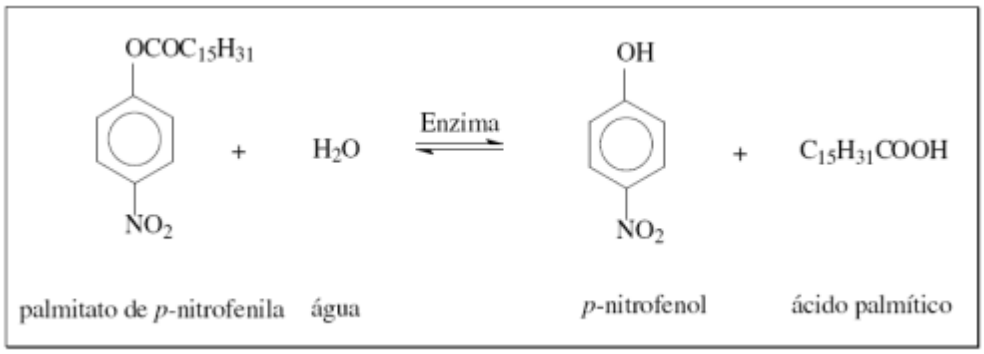


Figura 8. Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila por lipases, com liberação de *p*-nitrofenol e ácido palmítico.

4.3.3.2 Substrato: azeite de oliva

A atividade enzimática dos derivados imobilizados também foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 10 mL de azeite de oliva e 90 mL de goma arábica a 3% (m/v). Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 6,5) e 0,5 g de células imobilizadas (massa seca) ou 1,0 g do caldo fermentado. Os frascos foram incubados a 40°C por 30 min, em banho termostatizado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de acetona, etanol e água destilada (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,025 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela Equação 1 onde uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto

de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em µmoles/g.min (U/g).

$$\text{Atividade} \quad (\mu\text{mol/g} \cdot \text{min}) = \frac{(V_A - V_B) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot m} \qquad (1)$$

Onde:

V_A = *volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL)*

V_B =*volume do KOH gasto na titulação do branco (mL)*

M = *molaridade da solução de KOH (mol. L^{-1})*

t = *tempo de reação em min*

m = *massa em gramas*

4.3.3.3 Retenção da atividade enzimática (R_{AE})

A retenção da atividade enzimática (R_{AE}) foi calculada de acordo com a Equação (2) (MENONCIN et al., 2009) enquanto que a eficiência de imobilização (EI) foi determinada segundo a Equação (3), em que P_0 é a quantidade de proteína total no fluido de cultura dialisado e utilizado para imobilização e P_1 é a quantidade de proteína total ligada ao suporte após o processo de imobilização (KAEWTHONG et al., 2005):

$$R_{AE}\,(\%) = 100\ x \frac{\text{Atividade da enzima imobilizad a}\left(\frac{U}{mg}\right)}{\text{Atividade da enzima em solução}\left(\frac{U}{mg}\right)} \qquad (2)$$

$$\text{EI}\,(\%) = 100\,\text{x}\,\frac{P_1}{P_0} \qquad (3)$$

4.3.3.4 Determinação de proteínas totais

A quantidade de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976), baseado na interação entre Coomassie Brilliant Blue G-250 e regiões contendo grupos aromáticos das proteínas, formando um complexo colorido que possui máxima absorção de cor na faixa de 595 nm. O branco foi preparado com água destilada.

4.4 Avaliação de protocolos para imobilização da lipase

4.4.1 Suporte: Subprodutos agroindustriais

Nesta etapa foi avaliado o potencial de utilização de subprodutos agroindustriais como suportes para imobilização da enzima. Materiais ligninocelulósicos têm recebido significativa atenção como suportes para imobilização de enzimas em virtude da grande disponibilidade e baixo custo (MENDES, 2009; BRIGIDA et al., 2008; CASTRO et al., 2001; PEREZ et al., 2007). Exemplos de subprodutos que foram estudados para esse fim: bagaço de cana, casca de coco verde, sabugo de milho, palha de milho e casca de arroz.

A Figura 9 mostra os subprodutos após serem submetidos ao pré-processamento gerando os sistemas particulados que foram empregados como suportes para imobilização. Como material de referência para os estudos de imobilização foi utilizada a celulose microcristalina (MC 102 – Microcel, Blanver Farmoquímica Ltda) na faixa de tamanho de 150 µm.

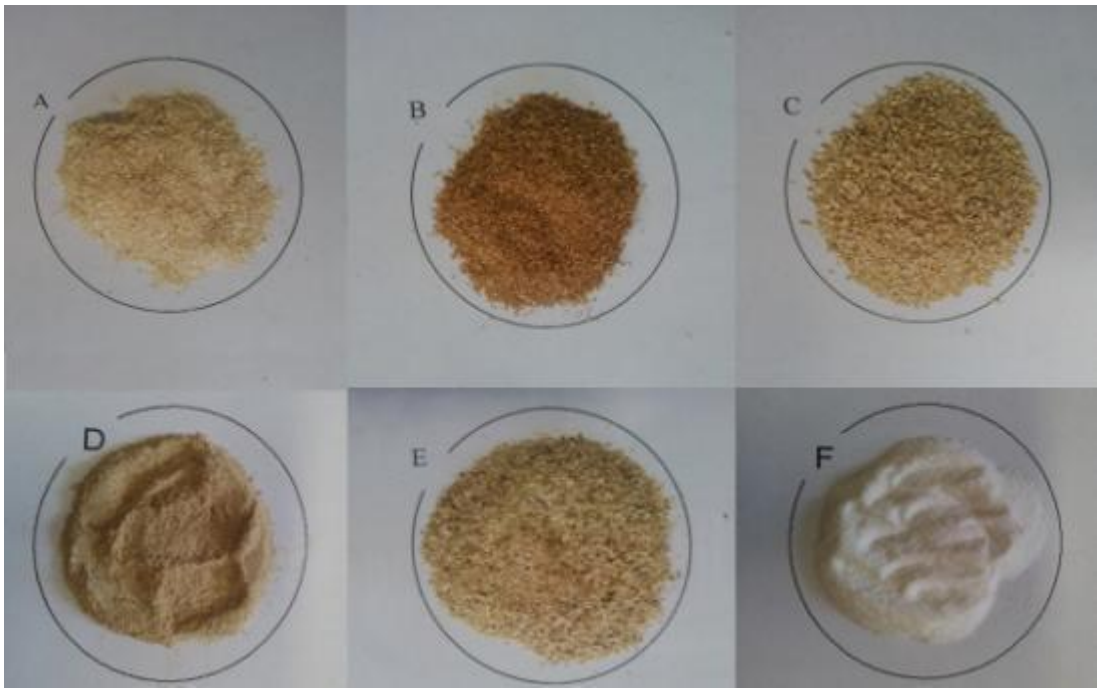


Figura 9. Subprodutos agroindustriais utilizados como suportes para imobilização enzimática: A) Bagaço de cana de açúcar; B) Casca de coco verde; C) Sabugo de milho; D) Casca de arroz; E) Palha de milho; F) Celulose microcristalina (controle).

4.4.1.1 Caracterização física dos suportes agroindustriais

4.4.1.1.1 Distribuição de tamanho de partículas

Após a secagem e moagem da matéria prima utilizada como suporte, uma amostra de 200 g foi adicionada em um agitador de peneiras Bertel, composto por sete tamises (malhas de 800, 700, 600, 500, 425, 300 e 150 µm) providos de tampa e recipiente de base. Após 20 minutos de agitação, pesou-se as frações remanescentes sobre cada tamis. O resultado foi determinado de acordo com a classificação adotada pela Farmacopéia Brasileira e expressos em porcentagem sobre a quantidade total de matéria prima, pela média de quatro determinações (SOUZA, 2007).

4.4.1.1.2 Determinação da umidade residual (base seca)

A umidade do produto seco foi determinada pelo método da secagem em estufa (utilizando uma estufa de secagem e esterilização, à temperatura de 102 ± 1 °C). Uma massa pré-determinada do produto foi colocada em placas de Petri e armazenada em estufa até atingir peso constante. O teor de umidade foi determinado através da Equação 4. Os ensaios foram realizados em triplicata.

$$X_p = \frac{M_{úmido} - M_{seca}}{M_{seca}} x100 \qquad (4)$$

onde:

$M_{úmido}$ = massa do material úmido (g);
M_{seca} = massa do material após secagem em estufa até massa constante (g)
X_p = umidade do produto em base seca (g.H_2O/g.material seco).

4.4.1.1.3 Determinação da área superficial, volume e tamanho dos poros

A determinação da área superficial das partículas foi realizada a partir da adsorção física de gás inerte, nesse caso nitrogênio, e calculada pela equação de BET (Brunauer-Emmett-Teller), utilizando-se o equipamento Micromeritics ASAP 2020 V3.2H. Os estudos de porosidade dos suportes foram efetuados em

porosímetro da marca Micromeritics, modelo 9400 no LCPP do DTF/FEQ/UNICAMP. Adotou-se nas fases de baixas e altas pressões, pressão de evacuação de 50 mmHg, tempo de evacuação de 30 min e tempo de equilíbrio de 10 segundos (ALMEIDA-NETO, 2011).

4.4.1.1.4 Caracterização química dos suportes agroindustriais

A composição química dos suportes foi determinada pela presença de fibras, ligninas, celulose, sendo os resultados copilados da literatura especializada (SANTOS et al., 2012; SALAZAR et al., 2005; CANILHA et al., 2007; RODRIGUES, 2007).

4.4.2 Protocolos de imobilização da lipase em subprodutos agroindustriais

Os métodos de imobilização investigados foram imobilização por adsorção e por ligação covalente. Na imobilização utilizando a adsorção foram utilizados três métodos de secagem: secagem em estufa com circulação de ar, liofilização e “spray drying”. Para o método de imobilização utilizando ligação covalente, foram utilizados três agentes de ativação (glutaraldeído, metaperiodato de sódio e epicloridrina) também sendo avaliados três métodos de secagem: secagem em estufa com circulação de ar, liofilização e leito de jorro.

Optou-se por estudar processos que apresentam distintos mecanismos de secagem de forma a avaliar a influência do processo na retenção e estabilização da atividade enzimática após os processos de secagem e imobilização. A Figura 10 apresenta um fluxograma descrevendo as etapas realizadas no estudo de imobilização utilizando os subprodutos agroindustriais como suportes.

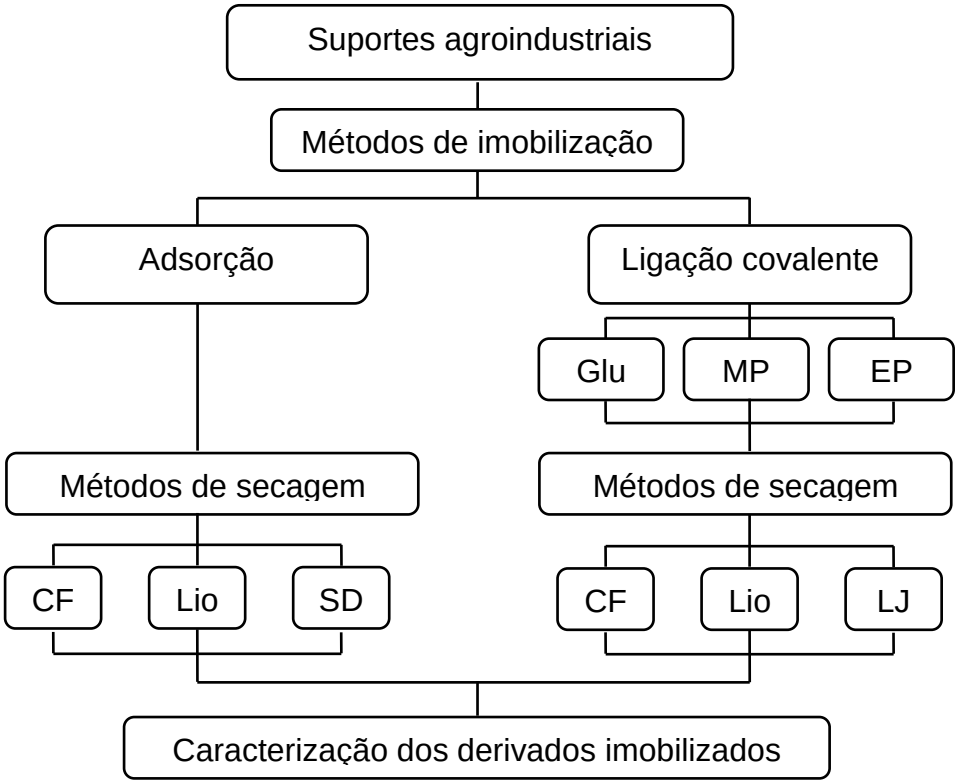


Figura 10. Fluxograma das etapas realizadas no estudo de imobilização com os subprodutos agroindustriais (Glu: glutaraldeído; MP: metaperiodato de sódio; EP: epicloridrina; CF: estufa de convecção forçada; Lio: liofilizador; SD: "spray dryer"; LJ: leito de jorro).

4.4.2.1 Imobilização por adsorção

A imobilização por adsorção foi realizada seguindo três protocolos diferentes. O primeiro consistiu na imobilização da lipase seguida de secagem em estufa de convecção forçada de ar. No segundo a enzima imobilizada foi desidratada em liofilizador e no terceiro protocolo, o derivado imobilizado foi submetido à secagem por nebulização ("spray drying"). A seguir estão apresentados detalhadamente os protocolos utilizados para essa etapa experimental.

4.4.2.1.1 Secagem em estufa com convecção forçada

Para a realização da imobilização por adsorção empregando-se estufa com convecção forçada, uma solução enzimática (2 mg de proteína.g^{-1} de suporte) foi colocada em contato com os suportes previamente preparados na forma de pós por

um período de uma hora sob agitação a 230 rpm. Após esse período, a solução enzimática (enzima + suportes) foi filtrada a vácuo e o material recuperado levado para secagem por 24 horas a uma temperatura de 40 °C. Após esse período, o derivado imobilizado foi utilizado para a determinação da retenção da atividade enzimática e outros ensaios de caracterização. A solução remanescente da filtração foi utilizada para a determinação da eficiência de imobilização através da Equação 3.

4.4.2.1.2 Secagem por liofilização (“freeze drying”)

Para a imobilização realizada pelo método de liofilização, utilizou-se um liofilizador modelo SNL 108B da Thermo Fischer Scientific contendo unidade liofilizadora (Micromodulyo 1,5 L), condensador em aço inoxidável; compressor de 1/4 hp e potência de 0,30 kw; bomba de ultra-vácuo, frascos para liofilização e válvulas independentes (Figura 11).

Figura 11. Fotografia do liofilizador Thermo Fischer Scientific SNL 108B.

A enzima foi colocada em contato com os suportes por um período de uma hora sob agitação constante em agitador orbital a 230 rpm. Nestes ensaios foram empregados carreamentos de 2 mg de proteína.g^{-1} de suporte. O sistema enzima-suporte foi recuperado por filtração a vácuo e desidratado em liofilizador por período de 24 horas. Utilizando conteúdo protéico remanescente na solução após a filtração do derivado imobilizado, determinou-se a eficiência de imobilização através da Equação 3.

4.4.2.1.3 Secagem por nebulização (“spray drying”)

O terceiro método de imobilização por adsorção utilizou como método de secagem o “spray drying”. O secador “spray dryer” utilizado nessa etapa (SD 05 fabricado pela LAB-PLANT, Reino Unido) está apresentado na Figura 12 e sua câmara de secagem possui diâmetro de 215 mm e altura de 500 mm. O sistema de atomização utilizado é composto por um bico atomizador tipo duplo fluido com mistura interna e com diâmetro de orifício de aspersão de 1 mm. A solução enzimática (2 mg de proteína.g^{-1} de suporte) foi colocada em contato com os suportes, sob agitação a 230 rpm, por uma hora. Ao término do período de agitação, a solução enzimática foi submetida à secagem. As condições operacionais utilizadas para secagem do derivado imobilizado obtido foram fixadas em:

Temperatura de entrada do ar de secagem (T_{ge})	=	100 ºC
Pressão do ar de atomização (P_{atm})	=	1,5 kgf/cm^2
Vazão do ar de atomização (W_{atm})	=	17 lpm
Vazão de alimentação do extrato (W_{susp})	=	4 g/min
Vazão do ar de secagem (W_g)	=	60 m^3/h

A operação teve início com a alimentação e aquecimento do gás de secagem. Após atingida a temperatura do ar de secagem desejada, deu-se início a alimentação da solução enzimática (enzima + suporte) na vazão pré-estabelecida. Uma vez a solução enzimática na câmara de secagem, foram efetuadas as medidas, em intervalos regulares, da temperatura do ar de saída (T_{gs}), para se obter o instante em que o processo entra em regime permanente (em torno de 15 minutos). Em seguida, iniciou-se então a retirada de amostra do produto seco durante aproximadamente 40 minutos. Essas amostras foram utilizadas para as análises físico-químicas do produto (determinação da umidade, atividade de água, retenção da atividade enzimática das amostras secas etc). A quantidade de material recuperado (recuperação do produto ou rendimento do processo) foi determinada através de percentual entre a massa de pó total coletada e a massa de sólidos alimentada ao secador (SOUZA, 2003).

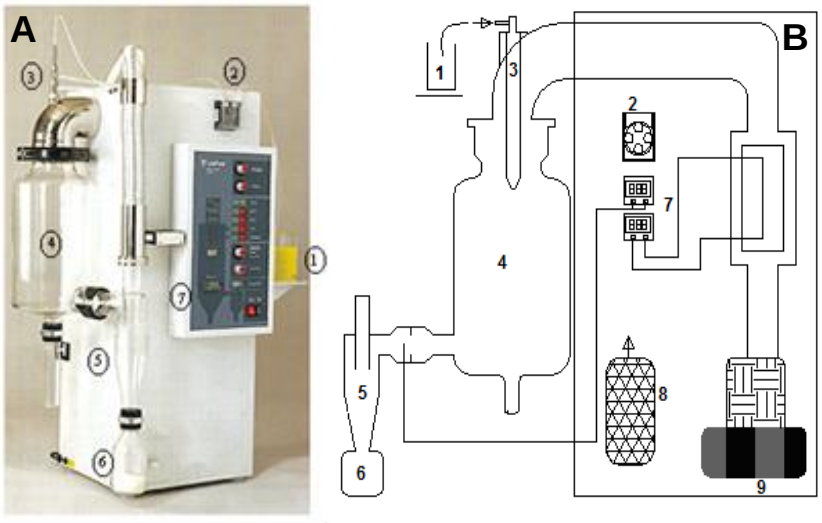


Figura 12. Equipamento “spray dryer” utilizado - (A) Unidade experimental e (B) Diagrama esquemático: 1- reservatório, 2- bomba peristáltica, 3- sistema de atomização, 4- câmara de secagem, 5- ciclone, 6- coletor do produto seco, 7- painel de controle.

4.4.2.2 Imobilização por ligação covalente

Para imobilização por ligação covalente foram utilizados glutaraldeído, epicloridrina ou metaperiodato de sódio como agentes ligantes nas proporções de 0,5, 1,5 e 2,5% (v/v). Após a ativação, os suportes foram colocados em contato com a solução enzimática para iniciar o processo de imobilização seguido pela secagem. O glutaraldeído foi utilizado para todos os equipamentos de secagem avaliados, enquanto que a epicloridrina e o metaperiodato foram usados somente na secagem em leito de jorro.

4.4.2.2.1 Ativação dos suportes e imobilização das lipases

Os subprodutos agroindustriais foram ativados com as soluções dos agentes ligantes na proporção de suporte:solução de agente ligante de 1:10 (p/v). Os suportes foram colocados em contato com as soluções ativadoras (contendo os agentes ligantes) por uma hora sob agitação a 230 rpm e, após esse período foram filtrados a vácuo e lavados exaustivamente com água destilada. Os suportes ativados foram desidratados em estufa de convecção forçada à temperatura de 40ºC por um período de 24horas. Após o período de imobilização, os derivados imobilizados foram submetidos ao processo de secagem em estufa de convecção

forçada, liofilizador e por leito de jorro. A ativação usando o metaperiodato de sódio foi realizada na ausência de luz.

4.4.2.2.2 Secagem em leito de jorro

Na secagem em leito de jorro, os três agentes ligantes foram avaliados para ativação da superfície dos suportes. Os suportes ativados foram colocados em contato com a solução enzimática (2 mg de proteína.g^{-1} de suporte) durante uma hora sob agitação constante a 230 rpm. O sistema enzima-suporte obtido após este período foi levado para secagem em leito de jorro. O leito de jorro empregado nesse trabalho consiste de uma base cônica com ângulo incluso de 40° e orifício de entrada de ar com diâmetro de 15 mm. Acoplada à base cônica há uma coluna cilíndrica de 85 mm de diâmetro e 300 mm de altura. A parte superior do equipamento é constituída por outro cone, com ângulo interno de 60° onde encontra-se acoplado o sistema de coleta de pós composto por um ciclone do tipo Lapple. A Figura 13 mostra o diagrama do leito de jorro, assim como a unidade experimental utilizada. Como material inerte utilizou-se partículas côncavo-cilíndricas de politetrafluoretileno (teflon®), material já empregado com sucesso na secagem de produtos biológicos e na produção de extratos secos de plantas medicinais (SOUZA, 2007). Os parâmetros operacionais utilizados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros operacionais fixados para a secagem em leito de jorro.

Parâmetros operacionais do leito de jorro	
Temperatura do ar de entrada (T_{ge}), °C	100,0
Vazão do ar de jorro (W_g), m^3/min	0,624
Relação $W_g/W_{g,jm}$	1,4
Ângulo da base cônica (*y*), °	40
Posição do sistema de alimentação	“Top spray”
Altura do leito de partículas (H_0), cm	5,5
Massa de partículas inertes (M_{pi}), g	250,0
Vazão de alimentação (Ws), g/min	5,0

$W_{g,jm}$: Vazão de ar correspondente à condição de jorro mínimo

A operação teve início com a alimentação e aquecimento do gás de secagem. Atingida a temperatura desejada (100 °C), iniciou-se a alimentação da solução enzimática (enzima + suportes), a uma vazão de alimentação de 5,0 g/min. A

solução enzimática foi alimentada ao sistema por gotejamento, sendo efetuadas as medidas, em intervalos regulares, da temperatura de saída do gás, T_{gs}, para se obter o instante em que o processo entra em regime permanente (em torno de 15 minutos). Após esse período iniciou-se a coleta do produto seco, o qual foi utilizado para a caracterização do sistema enzima-suporte, principalmente no que se refere à retenção da atividade enzimática, atividade de água, umidade residual e rendimento do processo. A recuperação do produto ou o rendimento do processo foi calculado através de percentual entre a massa de pó total coletada e a massa de sólidos alimentada ao sistema (SOUZA, 2003).

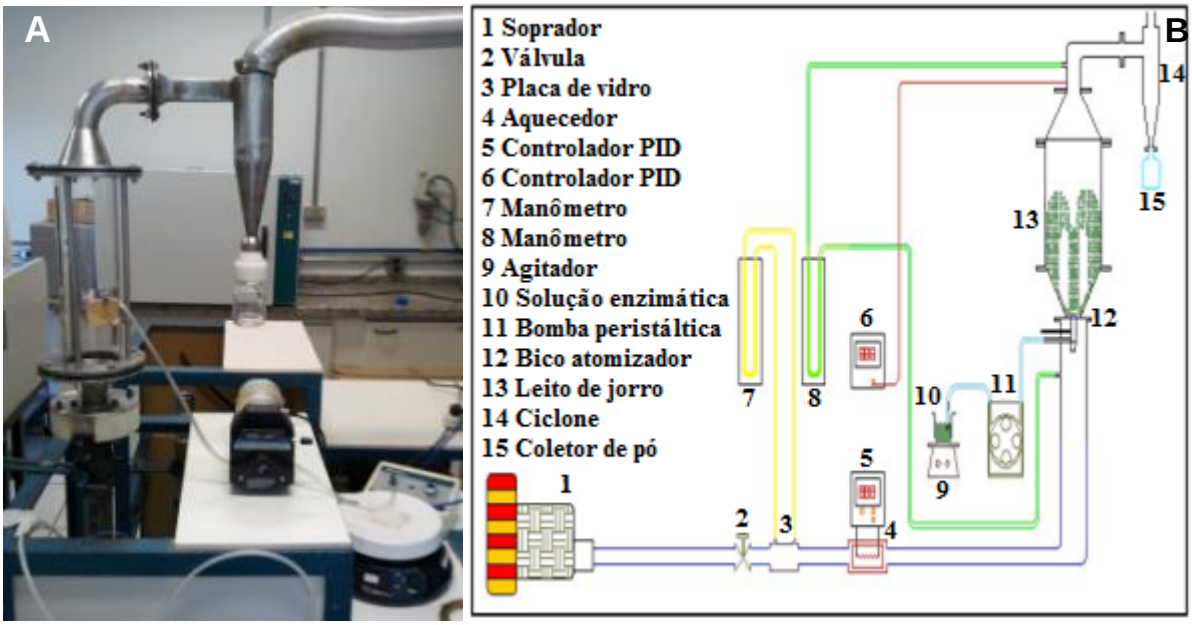


Figura 13. Equipamento de leito de jorro utilizado: (A) unidade experimental e (B) diagrama esquemático.

4.4.2.2.3 Secagem em estufa com convecção forçada

Na imobilização por ligação covalente e secagem utilizando estufa de circulação de ar (convecção forçada), os suportes agroindustriais ativados somente com glutaraldeído (nas três concentrações) foram colocados em contato com a solução enzimática (2 mg de proteína.g^{-1} de suporte) sob agitação constante a 230 rpm durante 1 hora para imobilização da lipase. A mistura suporte-enzima foi filtrada a vácuo e desidratada em estufa a temperatura de 40°C por 24 horas. O derivado imobilizado obtido foi usado nos ensaios de caracterização enquanto que a solução

remanescente da filtração foi utilizada para a determinação da eficiência de imobilização através da Equação 3.

4.4.2.2.4 Secagem por liofilização (“freeze drying”)

No terceiro método usando imobilização por ligação covalente, o liofilizador foi usado como equipamento de secagem. Somente o glutaraldeído foi utilizado como agente ligante sendo que as três proporções foram avaliadas: 0,5%, 1,5% e 2,5% (v/v). O suporte ativado foi colocado em contato com a solução enzimática (2 mg de proteína.g^{-1} de suporte) e mantido sob agitação constante (230 rpm) por um período de uma hora. O sistema suporte-enzima foi então filtrado a vácuo e desidratado em liofilizador por 24 horas. O filtrado resultante do processo de imobilização foi utilizado para determinação da eficiência de imobilização através do uso da Equação 3.

4.5 Protocolo para imobilização da lipase em microesferas de acetato de quitosana

Nesta etapa avaliou-se o potencial de utilização da quitosana como suporte para imobilização da lipase. O biopolímero quitosana pode ser modificado fisicamente, sendo uma das vantagens mais interessantes a sua grande versatilidade em ser preparado em diferentes formas, tais como pós, flocos, micro-esferas, nanopartículas, membranas, esponjas e fibras ocas. Neste trabalho, as microesferas de acetato de quitosana foram preparadas pelo método de inversão de fase baseado nos trabalhos de Rorrer et al. (1993) e Dias et al. (2008). Além disso, foram avaliados três tipos de imobilização: encapsulação usando partículas magnéticas, adsorção e ligação covalente. Para isso foram utilizados diferentes equipamentos de secagem como “spray dryer”, liofilizador, leito fluidizado e estufa de circulação de ar (convecção forçada). A Figura 14 apresenta um fluxograma descrevendo as etapas realizadas no estudo de imobilização com as microesferas de acetato de quitosana.

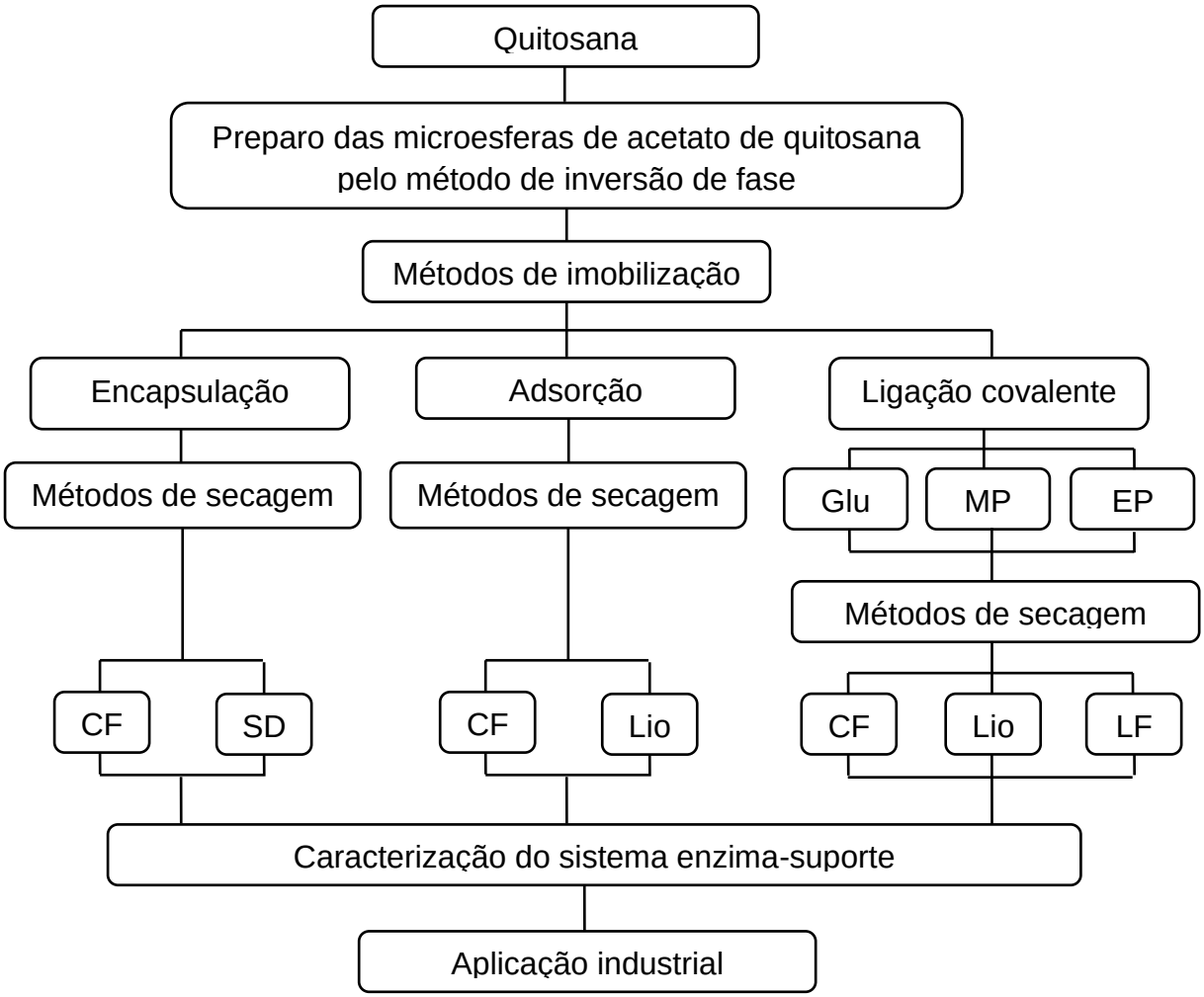


Figura 14. Fluxograma das etapas realizadas no estudo de imobilização com as microesferas de acetato de quitosana (Glu: glutaraldeído; MP: metaperiodato de sódio; EP: epicloridrina; CF: estufa de convecção forçada; Lio: liofilizador; LF: leito fluidizado).

4.5.1 Preparo das microesferas de acetato de quitosana

A quitosana em pó foi dissolvida em solução de ácido acético (5,0% v/v) contendo acetato de sódio na proporção de 1:1 (p/p) em relação à quantidade de quitosana adicionada. A solução de acetato de quitosana obtida foi inicialmente filtrada em tela de aço inox 150 μm para a retirada de impurezas e material particulado remanescente. A solução obtida foi gotejada com o auxilio de um sistema composto por uma agulha injetora alimentada com o auxílio de uma bomba peristáltica e um compressor de ar sobre uma solução de hidróxido de sódio 8% (m/v) em constante mistura (baixa agitação). As microesferas de quitosana formadas permaneceram na solução de hidróxido de sódio 8% (m/v) sem agitação por 24

horas para completa coagulação. O sistema gotejador utilizado foi adaptado a partir do trabalho realizado por Dias e colaboradores (2008) e está ilustrado na Figura 15A.

Após a obtenção das microesferas de acetato de quitosana é necessária a sua neutralização para posterior utilização como suporte para imobilização enzimática. A Figura 15B descreve um sistema também proposto por Dias e colaboradores (2008) utilizado para a “lavagem” das microesferas. Através de uma bomba peristáltica o tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 6,5) contido em um frasco de Marriott de 2000 mL é bombeado para uma coluna onde estão as microesferas de acetado de quitosana acumuladas. O fluxo do tampão ascendente fornece uma movimentação contínua das microesferas auxiliando a neutralização da superfície e do interior das mesmas. O pH do tampão do frasco de Marriott é monitorado e este é trocado periodicamente até atingir o valor de pH desejado.

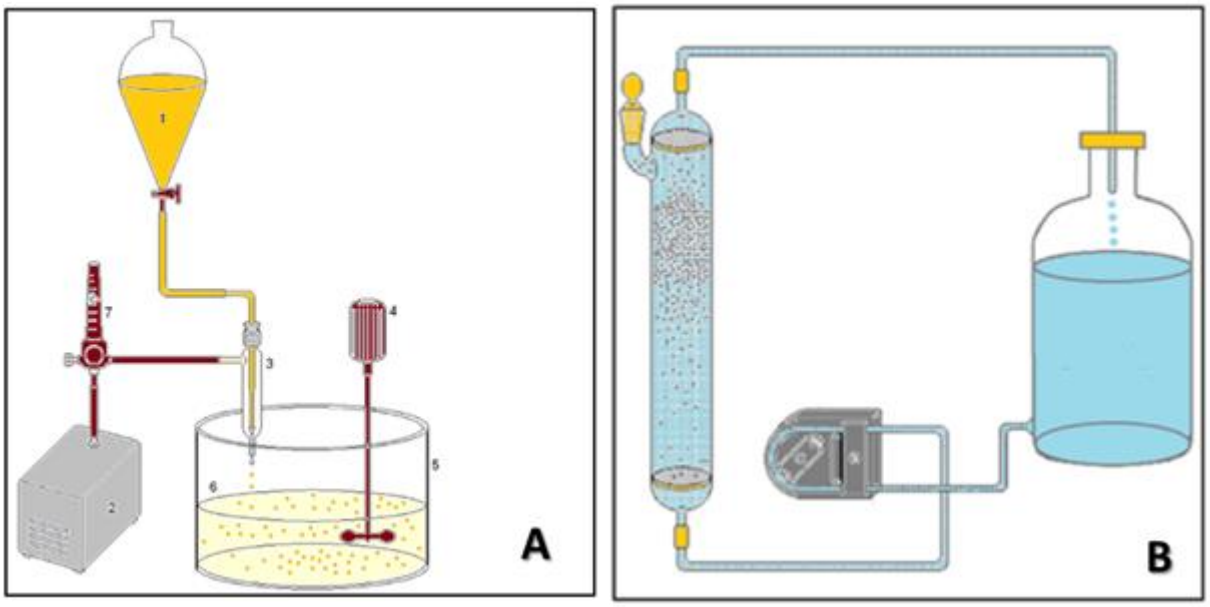


Figura 15. (A) Esquema do sistema de preparação das microesferas: 1 - funil com solução de quitosana, 2 - bomba de ar comprimido; 3 - gotejador, 4 - agitador; 5 - cuba de vidro; 6 - solução coagulante e 7 - rotâmetro. (B) Sistema para neutralização das microesferas por lavagem com tampão em fluxo ascendente (Adaptado de Dias et al., 2008).

Após a neutralização das microesferas, estas foram levadas a estufa de convecção forçada de ar para secagem a temperatura de 50 °C durante 30 horas ou para liofilização durante 24 horas. As microesferas de acetato de quitosana secas

foram utilizadas nos estudos de imobilização pelos métodos de adsorção e ligação covalente. Nestes ensaios foram avaliados três métodos de secagem: estufa com circulação de ar (convecção forçada), liofilizador e leito fluidizado. A Figura 16 apresenta as microesferas secas obtidas nas formas não-ativada e ativada.

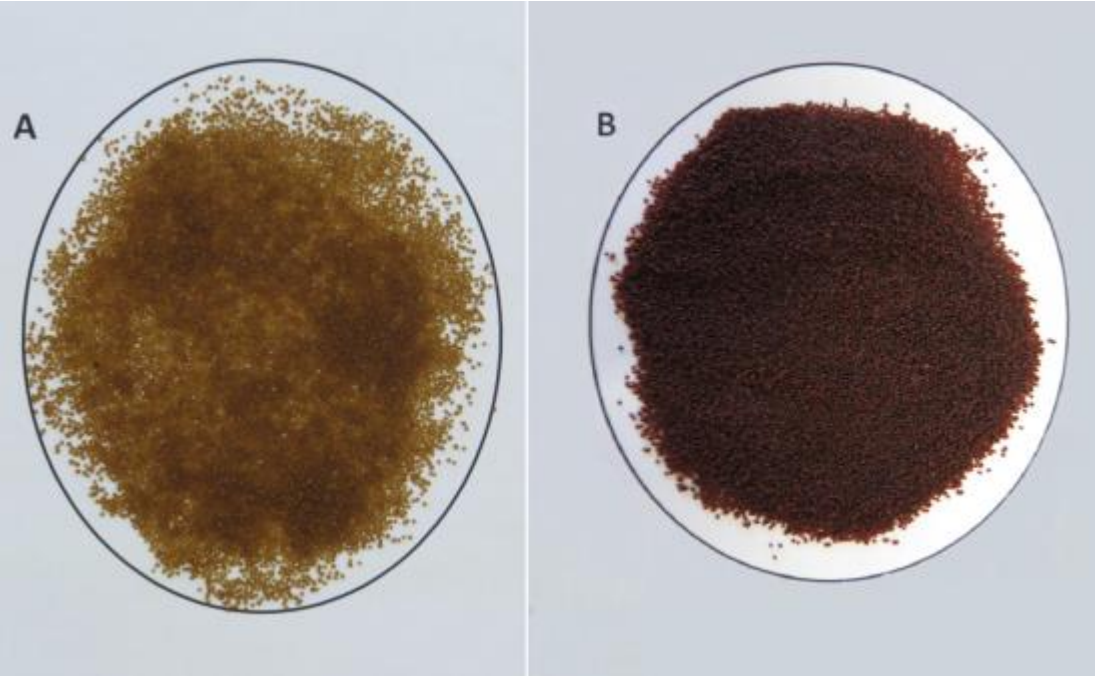


Figura 16. Microesferas de acetato de quitosana: A) Forma não ativada utilizada como suporte na imobilização por adsorção. B) Forma ativada com agente ligante (metaperiodato de sódio) para imobilização covalente.

4.5.1.1Secagem e imobilização da lipase

4.5.1.1.1 Estufa com circulação de ar

Para o método de imobilização por adsorção, as microesferas de acetato de quitosana neutralizadas, foram secas em estufa de circulação de ar e posteriormente colocadas em contato com a solução enzimática (2 mg de proteína.g^{-1} de suporte) sob agitação constante em agitador orbital a 120 rpm durante uma hora. Posteriormente, a mistura suporte-enzima imobilizada foi filtrada a vácuo e desidratada em estufa a temperatura de 40°C por 24 horas.

Na imobilização por ligação covalente, as microesferas de acetato de quitosana, já neutralizadas e secas em estufa, foram colocadas em contato com a solução do agente ligante (glutaraldeído na concentração de 1,5% v/v) durante 1

hora sob agitação constante em agitador orbital a 120 rpm, filtradas em sistema de filtração a vácuo e levadas a estufa para retirada do excesso de umidade. Após este processo, as microesferas ativadas foram colocadas em contato com a solução enzimática (2 mg de proteína.g^{-1} de suporte) sob agitação constante durante 1 hora para imobilização da lipase. A mistura suporte-enzima foi filtrada a vácuo e desidratada em estufa a temperatura de 40°C por 24 horas.

4.5.1.1.2 Liofilização

Para a imobilização pelo método de liofilização, utilizou-se um liofilizador modelo SNL 108B da Thermo Fischer Scientific contendo unidade liofilizadora (Micromodulyo 1,5 L), condensador em aço inoxidável; compressor de 1/4 hp e potência de 0,30 kw; bomba de ultra-vácuo, frascos para liofilização e válvulas independentes.

No método de imobilização por adsorção, as microesferas de acetato de quitosana neutralizadas, foram secas em liofilizador por 24 horas e posteriormente colocadas em contato com a solução enzimática (2 mg de proteína.g^{-1} de suporte) sob agitação constante em agitador orbital a 120 rpm durante uma hora para a imobilização da lipase. Posteriormente, a mistura suporte-enzima imobilizada foi filtrada a vácuo e desidratada em liofilizador por período de 24 horas.

Na imobilização por ligação covalente, as microesferas de acetato de quitosana neutralizadas e secas em liofilizador foram colocadas em contato com a solução do agente ligante (glutaraldeído na concentração de 1,5% v/v) durante 1 hora sob agitação constante em agitador orbital a 120 rpm, filtradas em sistema de filtração a vácuo e levadas a estufa para retirada do excesso de umidade. Após este processo, as microesferas ativadas foram colocadas em contato com a solução enzimática (2 mg de proteína.g^{-1} de suporte) sob agitação constante por um período de uma hora. A mistura suporte-enzima foi então filtrada a vácuo e desidratada em liofilizador por 24 horas.

4.5.1.1.3 Leito fluidizado

Nesta etapa somente a ligação covalente foi avaliada como método de imobilização. As microesferas de acetato de quitosana produzidas foram neutralizadas e secas em estufa de circulação de ar antes da ativação com os agentes ligantes. As microesferas de acetato de quitosana foram ativadas utilizando glutaraldeído, metaperiodato de sódio e epicloridrina como agentes ligantes na concentração de 1,5% (v/v). As microesferas foram ativadas durante 1 hora e em seguida lavadas com água destilada para retirar o excesso de agente ligante. As microesferas ativadas foram utilizadas como partícula semente durante o processo de secagem e imobilização em leito fluidizado.

Assim, na operação de secagem contínua em leito fluidizado, a solução enzimática foi alimentada ao sistema com o auxílio de uma bomba peristáltica e um sistema de atomização tipo duplo fluido sob a forma de gotículas que recobrem a superfície das microesferas ativadas, previamente aquecidas (temperatura de 60°C) por convecção pelo ar de fluidização. O leito fluidizado utilizado consiste de uma base cônica com ângulo incluso de 40° e orifício de entrada de ar com diâmetro de 15 mm. Acoplada à base cônica há uma coluna cilíndrica de 85 mm de diâmetro e 300 mm de altura. A Figura 17 mostra o diagrama do leito fluidizado, assim como a unidade experimental utilizada.

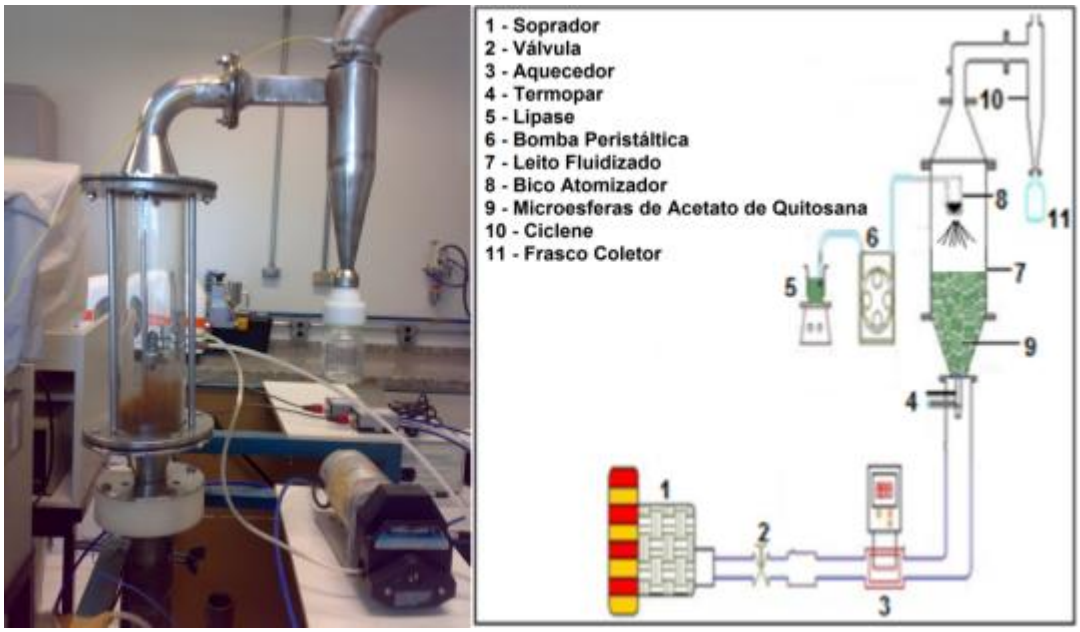


Figura 17. Equipamento de leito fluidizado utilizado: (A) unidade experimental e (B) diagrama esquemático.

Os parâmetros operacionais do leito fluidizado estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros operacionais fixados para a secagem em leito fluidizado.

Parâmetros operacionais	
Temperatura do ar de entrada (T_{ge}), °C	60,0
Vazão do ar de entrada (W_g), kg/min	0,75
Pressão do ar de atomização kgf/cm^2	1,0
Posição do sistema atomizador	"Top spray"
Altura do leito de partículas (H_0), cm	1,85
Massa de partículas inertes (M_{pi}), g	80,0
Vazão de alimentação (W_s), g/min	1,5

4.5.1.1.4 Imobilização por encapsulação

O terceiro método de imobilização avaliado foi a encapsulação da lipase em quitosana magnetizada. Para isso duas técnicas foram avaliadas: "cross-linking" e "spray drying".

4.5.1.1.4.1 Síntese das partículas magnéticas (Fe_3O_4)

A síntese das partículas de Fe_3O_4 foi realizada através do método de co-precipitação do complexo ferroso na presença de NH_4OH (XIE; MA, 2009).Inicialmente $FeCl_2.4H_2O$ e $FeCl_3.6H_2O$ [Fe^{2+}:Fe^{3+}=1:2] foram dissolvidos em 100 mL de água a uma concentração final de 0,3 M de íons de ferro. A solução iônica foi então adicionada lentamente ao NH_4OH sob forte agitação. Posteriormente a solução foi aquecida à temperatura constante de 80°C por 30 minutos. A mistura foi filtrada e lavada com água e etanol. O precipitado resultante foi seco em estufa a 102°C e adicionado à solução de acetato de quitosana (5%).

4.5.1.1.4.2 Imobilização em acetato de quitosana magnetizada – "Cross-linking"

Para imobilização enzimática utilizou-se uma solução de acetato de quitosana contendo partículas magnéticas de Fe_3O_4 (conteúdo de Fe_3O_4 em relação a quitosana 1/4) e 20 mL de solução de lipase (1,2 g de lipase). Esta solução foi

agitada suavemente a fim de garantir sua completa homogeneização. Posteriormente essa formulação foi gotejada em solução de tripolifosfato de sódio ($Na_5P_3O_{10}$) a 10% (m/v) utilizando o mesmo sistema gotejador mostrado para produção das microesferas de acetato de quitosana (Figura 15A).

As microesferas formadas foram filtradas e secas em estufa de circulação de ar a 35°C por 24 horas.

4.5.1.1.4.3 Imobilização em acetato de quitosana magnetizada por "spray drying"

A solução de acetato de quitosana magnetizada contendo enzima foi a mesma utilizada anteriormente, entretanto nesta etapa foram testadas 3 diferentes formulações apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Formulação usada para imobilização da lipase utilizando a secagem por "spray drying".

Formulação	"Spray drying"		
A	Acetato de quitosana (100 mL)	Fe2O3 (1g)	-
B	Acetato de quitosana (100 mL)	Fe2O3 (1g)	Goma Xantana (0,05%)
C	Acetato de quitosana (100 mL)	Fe_2O_3 (1g)	Glutaraldeído (0,0083%)

A secagem das soluções ocorreu em "spray dryer" de bancada (modelo SD-05, Lab-Plant, Huddersfield, U.K), com regime de fluxo corrente. A vazão de alimentação do ar de atomização foi determinada em 17,0 L/min a uma pressão de 1,5 kgf/cm^2. A vazão do fluxo do ar de secagem foi mantida constante a 60 m^3/h e a temperatura do ar de secagem mantida a 100 °C. As condições de secagem foram determinadas de acordo com Costa-Silva et al. (2011).

4.5.2 Caracterização física dos derivados imobilizados obtidos

4.5.2.1 Determinação da umidade residual (base seca)

A umidade do produto seco foi determinada pelo método da secagem em estufa (utilizando uma estufa de secagem e esterilização, à temperatura de 102 ± 1 °C), conforme método descrito no item 4.4.1.1.2.

4.5.2.2 Determinação da atividade de água (A_w)

A atividade de água (A_w) foi determinada com o auxilio do equipamento AQUALAB 4TEV (Decagon devices), pela técnica do ponto de orvalho a 25°C. O ponto de orvalho está relacionado com a pressão de vapor e por consequência com a atividade de água (A_w). As análises foram realizadas em triplicata e expressas pela média mais desvio padrão (NORENÂ et al., 1996).

4.5.2.3 Análise morfológica dos derivados imobilizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A forma e características superficiais dos sistemas suporte:enzima foram analisadas através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) empregando-se o microscópio eletrônico de varredura (Zeiss mod. EVO 50) com atmosfera de vácuo de 10^{-5} torr. As amostras foram colocadas sobre um porta-amostras de alumínio cobertos com fita adesiva de carbono de dupla face. Em seguida, as amostras foram introduzidas no pulverizador de ouro (Bal – Tec mod. SCD – 050 Sputter Coater) para o recobrimento com um filme de ouro (120 segundos, vácuo 2.10^{-2} mbar, corrente 40 mA). As micrografias foram geradas no modo topográfico a 20 kV (detector de elétrons secundário) com aumentos de 1,00 kx e 3,00 kx.

4.5.2.4 Análise elemental CHN

Para avaliar a incorporação da enzima na superfície dos suportes foi realizada a análise elementar CHN (carbono, hidrogênio e nitrogênio). Foram avaliados os suportes puros, suportes ativados e os derivados imobilizados obtidos com o uso do glutaraldeído (1,5% v/v) como agente ligante e leito de jorro e fluidizado como equipamentos de secagem. Para esta análise foi utilizando o equipamento Analisador Elementar de CHN Perkin Elmer 2400 (GOMES et al., 2005).

4.5.2.5 Análise de infravermelho por transformada de Fourier

A analise de Infravermelho por Transformada de Fourier (Spectrophotometer FTIR BOMEM MB-100) foi realizada para avaliação do processo de imobilização no que se refere à incorporação da enzima sobre a superfície do suporte. Foram avaliados os suportes ativados e os derivados imobilizados obtidos com o uso do glutaraldeído (1,5% v/v) como agente ligante e leitos de jorro e fluidizado como equipamentos de secagem. Os espectros foram obtidos no comprimento de onda de 400 a 4000-cm (GOMES et al., 2005).

4.5.3 Caracterização das propriedades bioquímicas e cinética dos derivados imobilizados obtidos

4.5.3.1 Determinação dos parâmetros cinéticos e de estabilidade: lipase livre X lipase imobilizada

As características da lipase livre contida na solução enzimática e da lipase imobilizada foram estudadas. Os ensaios realizados tiveram a finalidade de conhecer a modificação nas propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase após o processo de imobilização. Em todos os ensaios as atividades foram determinadas com o método do *p*-NPP (palmitato de *p*-nitrofenila), que está descrito na seção 4.3.3.1.

4.5.3.1.1 Determinação da temperatura ótima e termoestabilidade

Para determinação da temperatura ótima, a avaliação da atividade enzimática foi realizada nos intervalos de temperatura de 20 a 80°C (COSTA-SILVA, 2010). A termoestabilidade foi determinada através da incubação prévia da enzima por duas horas na temperatura de 80°C, em seguida procedeu-se a reação enzimática na respectiva temperatura ótima tanto da enzima livre como da imobilizada.

4.5.3.1.2 Determinação do pH ótimo

Para determinação do pH ótimo da enzima livre e imobilizada a reação enzimática ocorreu nos seguintes valores de pHs: citrato-fosfato (2,2 a 7,8) e Tris-HCl (8,2 a 9,0). O estudo foi realizado em triplicada e de acordo com Costa-Silva (2010).

4.5.3.1.3 Determinação dos parâmetros cinéticos – K_m e V_{max}

Para a determinação das constantes cinéticas as enzimas livre e imobilizada foram incubadas com diferentes concentrações de *p*-NPP variando entre 0,015 e 0,5 mmol/L, na temperatura e pH ótimo de atividade. Os valores de K_m e V_{max} aparentes foram determinados plotando-se os resultados obtidos no programa GraphPad Prism *Software* 5.0. O substrato utilizado na cinética enzimática foi preparado por diluição (COSTA-SILVA, 2010)

4.6 Avaliação do potencial de aplicação biotecnológica dos derivados imobilizados produzidos

A última etapa experimental desse trabalho constou-se da avaliação do potencial de aplicação biotecnológica dos melhores derivados obtidos. Como reações modelos foram selecionadas a síntese de aroma e biodiesel. Esta etapa experimental foi realizada no Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena – USP, sob supervisão da Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro.

4.6.1 Matéria-prima lipídica e agente acilante

Foi utilizado o óleo de coco como matéria-prima lipídica obtida comercialmente, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Fornecedor da matéria-prima lipídica e agente acilante.

Materiais	Fornecedor
Óleo de coco	FRESCOCO (São Paulo – SP)
Etanol anidro	CROMOLINE (99,8%)

4.6.2 Síntese do biodiesel

As reações de síntese de biodiesel foram efetuadas em reator de vidro cilíndrico (6 cm de altura e 4 cm de diâmetro) encamisados com capacidade para 50 mL, acoplados com condensador de refluxo e sob agitação magnética 150 rpm – Figura 18. As reações foram realizadas numa temperatura fixa de 40 °C, utilizando 20 gramas de meio reacional isento de solvente (razão molar matéria prima lipídica/etanol 1:12) e lipase imobilizada (numa proporção de atividade hidrolítica de 48 $U.g^{-1}$ de matéria lipídica). O processo de síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas ao longo da reação e as concentrações de ésteres de etila foram quantificadas por cromatografia em fase gasosa, conforme descrito na seção 4.6.2.2.3. O rendimento de transesterificação foi calculado de acordo com o método proposto por Uriosteet al. (2008).

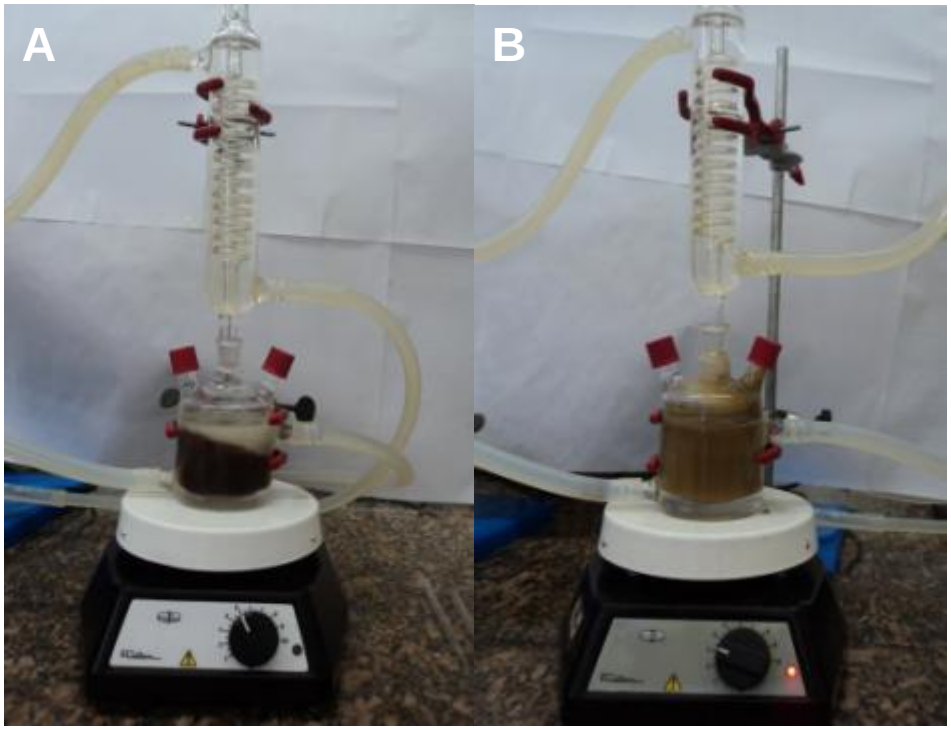


Figura 18. Ilustração do aparato experimental utilizado nas reações de transesterificação do óleo de coco empregando lipase imobilizada em quitosana (A) e casca de arroz (B).

4.6.2.1 Separação do biocatalisador e purificação dos ésteres de etila

Ao término das reações o biocatalisador foi separado do meio reacional por filtração seguida da lavagem com acetona e hexano. A atividade hidrolítica do biocatalisador recuperado foi quantificada conforme descrito na seção 4.3.2. A fase orgânica foi medida e em seguida adicionado o mesmo volume de água destilada. A mistura foi transferida para um funil de decantação e deixada em repouso por 30 minutos para separação de fases. A fase inferior contendo glicerol e água de lavagem foi descartada. A fase superior composta pelos ésteres de etila foi submetida à centrifugação (1570 g/15 min) e à evaporação em rota-evaporador para a remoção da água e etanol, sendo a água residual retirada pela adição de sulfato de sódio anidro. Após purificação, a conversão em ésteres foi determinada por RMN^{1}H utilizando metodologia validada por Paiva et al., (2013). A viscosidade do biodiesel purificado foi medida em viscosímetro Brookfield, modelo LVDVII e a densidade em densímetro Anton Paar, modelo DMA 35N.

4.6.2.2 Métodos analíticos

4.6.2.2.1 Caracterização das propriedades das matérias-primas lipídicas

O óleo de coco foi caracterizado quanto aos índices de acidez, iodo, saponificação e peróxido, adotando normas estabelecidas pela AOCS (2004).

O índice de acidez foi determinado de acordo com a Norma Cd 3d-63 e o resultado calculado pela relação entre a massa de hidróxido de potássio consumida (mg) por grama de amostra analisada. Para determinação do índice de iodo, foi utilizado o Método Cd 1b-87, expressando o resultado em quantidade de iodo reagido em 100 g de gordura ou óleo. O índice de saponificação foi determinado de acordo com método Ti Ia-64, sendo o resultado calculado pela quantidade de álcali em miligramas necessária para saponificar um grama de amostra. Na determinação do índice de peróxido foi utilizado o método oficial Cd 8b-90, tendo como resultado a quantidade, em miliequivalentes de peróxido por 100 g de amostra.

4.6.2.2.2 Determinação de perfil em ácidos graxos da matéria lipídica

A composição em ácidos graxos do óleo de coco foi determinada por cromatografia em fase gasosa segundo norma descrita pelo AOCS (2004), empregando cromatógrafo a gás (CG Agilent 68650 Series GG System), equipado com coluna capilar DB-23 Agilent (50% cyanopropilmethylpolysiloxane, dimensões 60 m, diâmetro interno: 0,25 mm, 0,25 µm filme) operando nas seguintes condições: fluxo coluna = 1,00 $mL.min^{-1}$, velocidade linear = 24 $cm.seg^{-1}$, temperatura do forno = 110 °C, mantendo-se constante por 24 min; hélio foi utilizado como gás de arraste.

4.6.2.2.3 Determinação dos ésteres etílicos pela técnica de cromatografia em fase gasosa

As amostras purificadas de biodiesel obtidas foram analisadas quanto ao teor de ésteres de etila (Tabela 8) em cromatógrafo à gás (Modelo Varian CG 3800, Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, USA), equipado com detector de chama ionizante e coluna capilar de sílica fundida do tipo BPX70-70% de Cianopropil com 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Nitrogênio foi usado como gás de arraste com fluxo de 37,2 mL/min. A coluna foi submetida a uma rampa de temperatura de 110 °C (3 min), 110 ºC à 160 ºC (8 ºC/ min) e 160 ºC à 230 ºC (3,5 ºC/ min). A coleta de dados foi realizada utilizando o *software* Varian Star Data System version 6. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL em *n*-heptano e padrão interno (C:23). A quantificação foi realizada pela calibração interna, conforme estabelecido por Visentainer e Franco (2006).

Tabela 8. Condições de operação para a determinação dos ésteres etílicos purificados.

Programa de Temperatura	110 °C/ 3 min, 160 ºC e 230 ºC	
Taxa de aquecimento	8 °C/ min, 3,5 °C/ min	
Gás de arraste	Nitrogênio	
Preparo da amostra	0,02 g de amostra em 100 mL de *n*-heptano	
Amostra para injeção	1 mL: 0,2 mL	
		Minutos
Tempos de retenção dos Monoésteres de etila	C8 EtOH	5,38
	C10 EtOH	7,42
	C12 EtOH	9,73
	C14 EtOH	12,23
	C16 EtOH	15,02
	C18 EtOH	18,04
	C18:1 EtOH	18,59
	C18:2 EtOH	19,56
	C20 EtOH	21,16
	C21 EtOH	22,72
	C22 EtOH	24,26
	C23 EtOH	25,87

4.6.2.2.4 Quantificação de monoglicerídeo e diglicerídeo

Mono e diglicerídeos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Inc. SP, Brasil), com detector evaporativo de espalhamento de luz e coluna de aço inoxidável Fenomenex Gemini C18 110 A (150x 4,6 mm) (Allcrom, Ltd., SP, Brasil), nas seguintes condições: temperatura da coluna de 40 °C e do detector de 70 ºC.

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC (JT Baker, Performance Materials Avantor TM, Xalostoc, Edo. De Mex. México). As fases móveis utilizadas foram: acetonitrila (A) e metanol (B). As concentrações dos solventes empregados foram: 80% A e 20% B por 35 min. A vazão de 1 mL/min foi mantida durante 6 min, 1,5 mL/min durante 30 min e 3,0 mL/min durante 35 min. Todas as amostras foram dissolvidas em acetato de etila-hexano (1:1, v/v) e os volumes de injeção foram de 10 µL. Os padrões utilizados foram: monolaurina, monomiristina, monopalmitina, monoestearina, monooleina, dilaurina, dipalmitina, dimiristina, diestearina, e dioleina.

Os teores de monoglicerídeos e diglicerídeos foram calculados nas amostras de biodiesel purificadas e baseado nas concentrações de ésteres alquílicos presentes nas amostras analisadas anteriormente.

4.6.2.2.5 Ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^{1}H)

As amostras de biodiesel purificado foram dissolvidas em clorofórmio deuterado e os espectros de RMN registrados em espectrômetro Varian, modelo Mercury-300 MHz. A conversão de triglicerídeo em ésteres foi determinada tomando por base os dados gerados por RMN utilizando a equação proposta por Garcia (2006) e validada por Paiva (2010).

4.6.3 Síntese de butirato de butila

A potencialidade de aplicação dos sistemas imobilizados de lipase na síntese de ésteres foi verificada também para produção de aroma. As sínteses foram conduzidas em frascos fechados de 100 mL contendo butanol e ácido butírico, em 20 mL de heptano. As misturas foram incubadas com lipase imobilizada (massa seca), sob condições de agitação de 150 rpm, numa temperatura de 35 °C durante 24 horas. Foram analisadas amostras referentes ao tempo inicial e final de cada ensaio efetuado.

4.6.3.1 Influência da massa de enzima imobilizada e da temperatura

A influência de alguns fatores na formação de ésteres pela lipase imobilizada foi verificada por meio de um planejamento composto central (face centrada) de 2 níveis sem replicata. Para este sistema foi considerado a influência de duas variáveis de controle: temperatura (X_1) e massa de enzima (X_2) e em uma variável resposta específica do processo (formação do butirato de butila). Os seguintes níveis foram adotados: massa de enzima imobilizada (0,1 a 0,5 gramas, massa seca) e temperatura (32 a 43 °C). A matriz do experimento esta apresentada na Tabela 9, com os valores reais empregados nas sínteses. Todos os experimentos foram efetuados de maneira randômica. Três experimentos foram realizados no

ponto central, para estimativa do erro experimental.

Tabela 9. Variáveis Independentes do Planejamento Experimental.

Variáveis	**Níveis**		
	Baixo (-)	Médio (0)	Alto (+)
X_1: Temperatura °C	32	37	43
X_2: Massa de enzima (gramas, massa seca)	0,1	0,3	0,5

4.6.3.2 Métodos analíticos

4.6.3.2.1 Teor de ácido graxo

A concentração de ácido graxo foi determinada por titulação de alíquotas dissolvidas em 10 ml de etanol p.a, empregando-se solução alcoólica de KOH 0,02 N e fenolftaleína como indicador (MACEDO e PASTORE, 1997). Os cálculos foram efetuados pela Equação 5.

$$\boxed{Acido\ graxo\ \left(g/litro \right) = \frac{V \times N \times M}{W}} \qquad (5)$$

onde,

$M =$ massa molecular do ácido graxo titulado, mol

$N =$ normalidade da solução de KOH

$V =$ volume gasto de KOH, mL

$W =$ massa da alíquota titulada (gramas).

4.6.3.2.2 Teor de álcool e éster

As concentrações dos álcoois e ésteres foram determinadas por cromatografia em fase gasosa, utilizando-se uma coluna empacotada (6ft S# DEGS WHP 80/100 mesh, HP), operando à temperatura de 70 °C e empregando-se hexanol como padrão interno.

Na produção do butirato de butila, todos os resultados foram analisados considerando-se como fator resposta a conversão molar dos materiais de partida (álcool ou ácido), conforme Equação 6.

$$\text{Conversor molar (\%)} = \frac{C_0 - C}{C_0} \text{ x } 100 \qquad (6)$$

onde:

C_0 = concentração inicial do reagente

C = concentração final do reagente no tempo considerado.

No planejamento experimental, a análise de variância (ANOVA) e análise de regressão foram empregadas para avaliação da influência das variáveis, temperatura e massa molar, sobre a síntese de butirato de butila, empregando-se o Programa Statistica 9.0.

4.7 Tratamento dos dados obtidos a partir dos protocolos de imobilização

Para comparar os resultados obtidos pelas diferentes técnicas de imobilização realizou-se uma análise exploratória dos dados, com o objetivo básico de sumarizar os valores, organizando e descrevendo os dados por meio de tabelas com medidas descritivas. Para atingir o objetivo proposto, foi utilizado o modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos). Os modelos lineares de efeitos mistos são utilizados na análise de dados em que as respostas estão agrupadas (medidas repetidas para um mesmo indivíduo) e a suposição de independência entre as observações num mesmo grupo não é adequada (SCHALL, 1991). Tal modelo, tem como pressuposto, que o resíduo obtido através da diferença entre os valores preditos pelo modelo e os valores observados tenha distribuição normal com média 0 e variância constante. Nesta análise foi considerado um nível de significância de 5% e o ajuste do modelo foi feito através do software SAS versão 9.0, utilizando a PROC MIXED.

5. Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar do excelente potencial catalítico, as propriedades das enzimas normalmente devem ser melhoradas antes da sua aplicação em escala industrial. Geralmente, as enzimas solúveis precisam ser imobilizadas para serem reutilizadas por longos períodos em reatores industriais. Além disso, algumas outras propriedades críticas como atividade catalítica, estabilidade, problemas de inibição por produtos de reação, seletividade em relação aos substratos não-naturais devem ser otimizadas. Deste modo, as enzimas imobilizadas podem também exibir propriedades funcionais superiores ao correspondente solúvel através da utilização de protocolos de imobilização adequados.

Nesta seção estão apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos através do desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, apresentam-se os resultados da produção, purificação e caracterização bioquímica das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*. Também estão apresentados os resultados da caracterização físico-química dos subprodutos agroindustriais e das microesferas de acetato de quitosana empregados como suporte de imobilização.

Protocolos de imobilização das lipases pelos métodos de adsorção, encapsulação e ligação covalente foram avaliados e os sistemas suporte:enzima (derivados imobilizados) foram caracterizados através de diversas técnicas (umidade residual, atividade de água, microscopia eletrônica de varredura, infra-vermelho, análise elemental CHN, parâmetros cinéticos, etc). Por fim, são apresentados os resultados da análise do potencial de aplicação dos derivados imobilizados na síntese de biodiesel e produção de aroma (butirato de butila).

5.1 Produção, purificação e caracterização bioquímica das lipases produzidas pelo fungo *Cercospora kikuchii*

Como relatado anteriormente, o fungo *Cercospora kikuchii* tem sido isolado como fitopatógeno de várias espécies vegetais como café, milho e braquiária (ALMEIDA et al., 1997). Entretanto o cultivo que mais é afetado por esse microrganismo é a soja, causando grandes prejuízos aos produtores. Entretanto são várias as condições que determinam o tipo de associação com o hospedeiro, como

idade da planta e condições climáticas, podendo este ser fitopatogênico ou endofítico. A cepa utilizada neste trabalho foi isolada como tendo uma associação endofítica com a planta *Tithonia diversifolia,* ou seja, uma associação que não causa prejuízo ao desenvolvimento da planta.

Muitos estudos tem evidenciado a presença de um grande número de isolados endofíticos com nenhuma ou reduzida capacidade de produzir estruturas reprodutivas em culturas axênicas, o que dificulta a sua identificação. A produção de estruturas reprodutivas desses fungos em cultura pura geralmente é bastante demorada, podendo levar meses (BAYMAN et al., 1998). A ocorrência de micélios estéreis pode estar relacionada à ausência de fatores nutricionais e condições ambientais favoráveis à esporulação dos fungos em meio de cultura (GUO et al., 2000). Nesses casos em que a esporulação é nula ou muito reduzida, utiliza-se a transferência de pedaços de micélios aos meios de cultura. Embora isso possa ser considerada uma dificuldade para a ampliação na escala de produção da enzima, o fungo *C. kikuchii* revelou-se como um excelente produtor de lipase. Essa capacidade pode estar relacionada com a associação com a planta hospedeira, a qual possui grandes quantidades de óleos em seus tecidos vegetais. No meio de cultura foi utilizado óleo de soja como agente indutor para produção da enzima. Esse indutor torna-se interessante devido ao custo e disponibilidade. A Tabela 10 apresenta informações sobre a produção e caracterização das lipases presentes no extrato bruto obtido após a fermentação do fungo *C. kikuchii*.

Tabela 10. Produção e caracterização bioquímica das lipases contidas no extrato bruto produzido pelo fungo *Cercospora kikuchii.*

Produção da lipase	Fungo	Agente indutor	Tempo de produção	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)
	C. kikuchii	Óleo de soja	6 dias	30	120
Lipase (extrato bruto)	(Unidade/mL)*	Proteína (mg/mL)	Sólidos totais (%)	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo (-)
	12	2	0,5	60	6,5

*Atividade enzimática

O resumo do processo final de purificação assim como o perfil eletroforético dos "Pools" obtidos pelas duas colunas utilizadas estão apresentados respectivamente na Tabela 11 e na Figura 19.

Tabela 11. Resumo do processo final de purificação de uma lipase produzida pelo fungo *C. kikuchii.*

Amostra	U/Total	Ativ. Específica	Proteína Total (mg)	Ip	Rendimento %
Extrato bruto	360,5	45,1	8,00	1	100,0
Interação Hidrofóbica	295,0	196,6	1,50	4,4	82,0
Gel Filtração	99,7	398,8	0,25	8,9	27,6

Ip: Índice de purificação

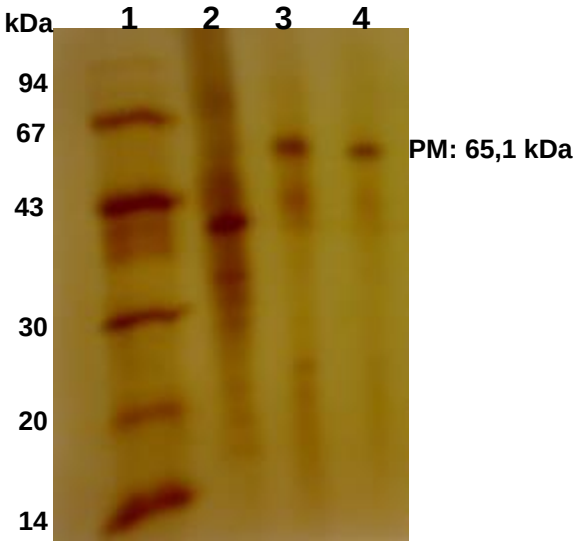


Figura 19. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. Coluna 1: padrões de massa molecular: fosfolipase B (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa); coluna 2: fluido de cultura, dialisado e concentrado (100 µg); coluna 3: Pool I Butyl-Sepharose Fast Flow (57 µg); coluna 4: Pool II gel filtração (30 µg).

5.2. Caracterização física dos suportes agroindustriais

Antes do processo de imobilização da lipase, os suportes agroindustriais foram caracterizados através da determinação da distribuição granulométrica, umidade residual, área superficial específica, densidades e porosidade.

5.2.1 Distribuição granulométrica

Através da análise da Figura 20 pode-se observar que todos os subprodutos agroindustriais utilizados como suporte apresentaram ampla distribuição granulométrica, variando de 37,5 a 980 µm. De forma a uniformizar o tamanho médio de partículas a serem utilizadas como suporte nos estudos de imobilização, selecionou-se a fração abaixo de 150 µm.

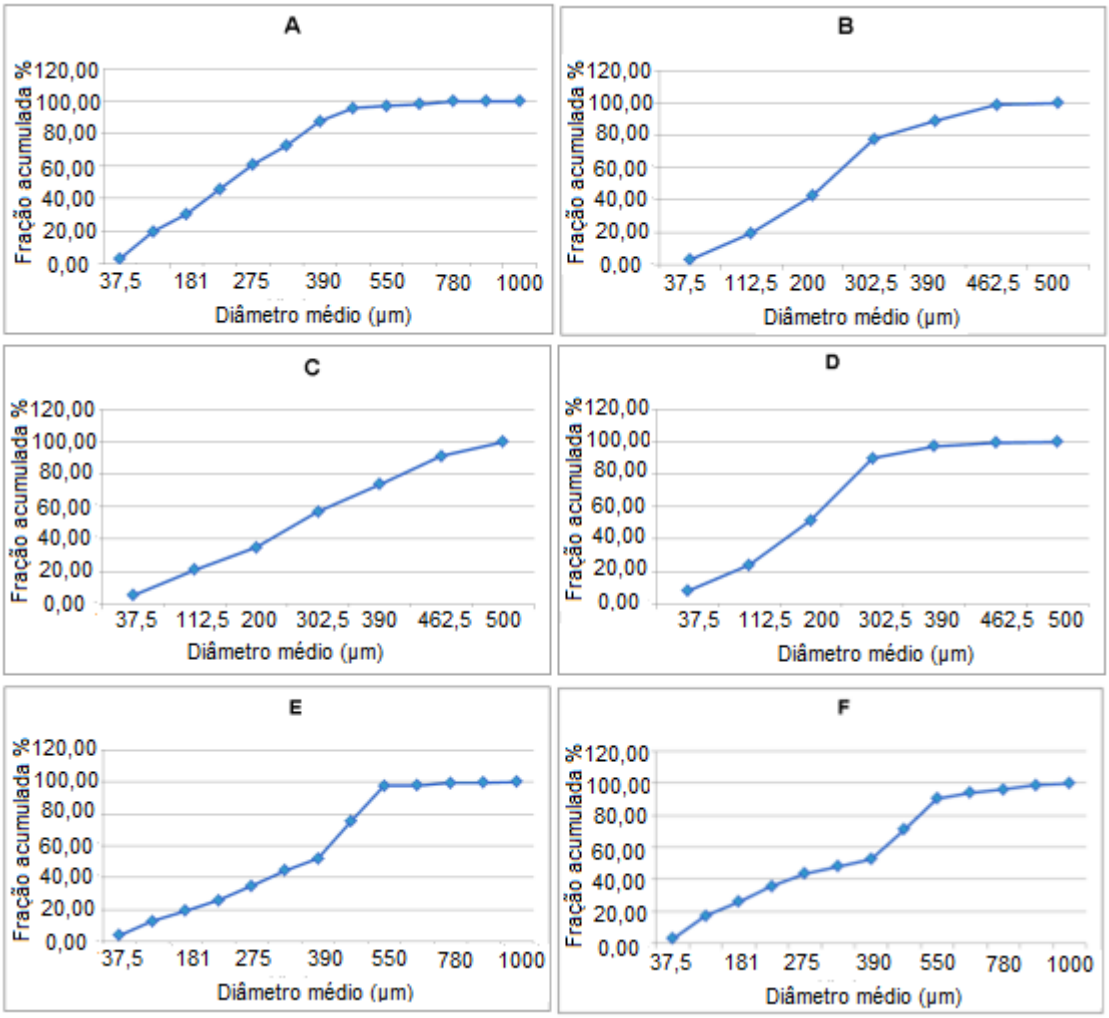


Figura 20. Distribuição granulométrica acumulativa dos suportes utilizados para imobilização: (A) bagaço de cana, (B) casca de coco verde, (C) celulose microcristalina, (D) casca de arroz, (E) palha de milho e (F) sabugo de milho.

5.2.2 Umidade residual

Normalmente, produtos que contém substâncias protéicas, tornam-se mais estáveis quando possuem baixo teor de umidade apresentando, portanto, uma vida útil maior. A Tabela 12 apresenta os valores da umidade dos suportes antes do processo de imobilização. As amostras avaliadas apresentaram valores de umidade residual na faixa de 3,0 a 7,93% e esses valores estão dentro da faixa de umidade recomendada, abaixo de 12% (JUNIOR et al., 2003).

Tabela 12. Resultado da umidade residual dos suportes utilizados para a imobilização das lipases de *Cercospora Kikuchii* após a secagem em estufa.

Suportes	Umidade (%)
Bagaço de cana	5,50 ± 0,26
Casca de coco verde	6,23 ± 0,35
Casca de arroz	7,93 ± 0,55
Celulose microcristalina	3,05 ± 0,32
Palha de milho	6,20 ± 0,25
Sabugo de milho	7,43 ± 0,40

5.2.3 Determinação da área superficial, porosidade e densidade

Os resultados obtidos para determinação das características físicas dos subprodutos agroindustriais encontram-se na Tabela 13. Uma das principais características de partículas sólidas é a área superficial. Esta é usualmente, expressa como área superficial específica que corresponde à área de superfície intersticial de espaços vazios (ou poros), tanto por unidade de massa, como unidade de volume do material poroso. A área superficial é importante em todos os processos dependentes da superfície do sólido, tais como transferência de calor e massa, assim como em processos de adsorção (SVAROVSKY, 1987). Os subprodutos agroindustriais apresentaram uma área superficial relativamente alta, o que os tornam propícios ao uso como carreadores de substâncias, principalmente no caso dos processos de adsorção de enzimas.

Tabela 13. Características físicas dos subprodutos agroindustriais utilizados como suportes.

Suporte	As (m^2/g)	At_{poro} (m^2/g)	Dm_{poro} (nm)	ε (%)	ε_{sup} (%)	ρ_{bulk} (g/mL)	ρ_{ap} (g/mL)	ρ_{real} (g/mL)
Bagaço de cana	111,1	1,5	155,7	93,7	48,5	0,15	0,8	1,6
Casca de coco verde	170,5	1,5	182,7	83,3	28,9	0,35	1,4	2,1
Casca de arroz	140,5	1,5	142,1	92,5	50,9	0,24	1,2	3,3
Celulose MC	135,0	1,2	149,2	88,4	45,2	0,45	2,1	3,9
Palha de milho	110,1	1,3	129,9	83,4	47,6	0,44	1,4	2,7
Sabugo de milho	150,2	1,4	145,2	86,4	49,1	0,42	1,6	3,1

MC: microcristalina; As: área superficial específica; At_{poro}: área total do poro; Dm_{poro}: diâmetro médio do poro; ε: porosidade total; ε_{sup}: porosidade do suporte; ρ_{bulk}: densidade "bulk"; ρ_{ap}: densidade aparente; ρ_{real}: densidade real

Para otimizar a interação enzima/suporte é necessária a disponibilidade de uma elevada área superficial específica, que pode ser conseguida escolhendo-se um suporte poroso ou, se utilizado um suporte de baixa porosidade, que o mesmo seja constituído por partículas de dimensões reduzidas. Segundo a classificação da IUPAC (1994), materiais microporosos possuem poros de até 2 nm, mesoporosos de 2 até 50 nm e macroporosos acima de 50 nm. As amostras utilizadas como suporte apresentaram uma estrutura com níveis de porosidade variada, sendo que todos possuem poros com diâmetros superiores a 50 nm, o que os classificam como materiais macroporosos. No caso de suportes porosos a dessorção da proteína é dificultada, principalmente se o tamanho médio dos poros é em torno de duas vezes maior que o diâmetro médio das moléculas de proteína (GREEG; SING, 1982).

A densidade de uma biomassa qualquer pode ser mensurada de três maneiras distintas, dependendo do interesse ou necessidade, são elas a densidade a granel, a densidade real ou absoluta e a densidade aparente. A densidade aparente de uma partícula qualquer é definida pela razão da massa da partícula pelo volume ocupado por essa partícula e seus poros. A densidade real ou simplesmente densidade de uma partícula é definida como sendo a razão entre a massa da partícula sólida pelo volume do material sólido que compõe a partícula, não incluindo o volume dos poros que eventualmente possam compor a estrutura sólida da partícula. Por fim tem-se a densidade a granel (ou densidade bulk), que é definida como sendo a razão entre a massa das partículas pelo volume ocupado pelas mesmas incluindo seus poros e espaços intersticiais (ALMEIDA-NETO, 2011).

Na literatura a densidade dos materiais ligninocelulósicos é caracterizada por um valor não homogêneo. Isso é bem compreensível, pois as variações das características de tais materiais são determinadas por muitas condições, tais como a umidade, a granulometria, influência do tipo de moinho, tipo e concentração de sustâncias que os compõem entre outras. É importante conhecer a densidade de uma partícula porque além dessa característica estar relacionada com a porosidade da amostra, e essa com o potencial de carreamento, ela é importante na fluidodinâmica do material e no processo de envasamento e transporte do produto final.

5.3 Imobilização por adsorção

Neste tópico são apresentados os resultados obtidos para o procedimento de imobilização da lipase por adsorção utilizando os subprodutos agroindustriais como suportes. Para avaliação dos processos de secagem foram empregados a estufa por convecção forçada de ar, o liofilizador e o “spray dryer”. Portanto, este estudo enfatiza a combinação do uso de suportes e método de imobilização mais baratos, buscado alternativas para viabilizar o uso dos biocatalizadores em uma escala maior através da diminuição dos custos de produção.

5.3.1 Secagem em estufa

A Tabela 14 apresenta os resultados referentes à imobilização da lipase por adsorção e secagem por estufa com convecção forçada de ar. Um dos principais parâmetros avaliados, a retenção da atividade enzimática, variou de 64,5 a 79,0%. Levando-se em consideração os subprodutos agroindustriais houve um destaque para a casca de arroz, sabugo de milho, bagaço de cana e casca de coco verde que apresentaram retenção da atividade enzimática acima de 70,0%. Houve diferença estatística ($p<0,05$) para os valores de retenção da atividade enzimática quando se usou a celulose microcristalina comparado com os demais suportes (Tabela A1). Usando-se os subprodutos agroindustriais, a retenção da atividade enzimática foi superior para a casca de arroz e bagaço de cana, apresentando diferença estatística ($p<0,05$) entre os valores obtidos para a casca de coco, palha e sabugo de milho. A eficiência de imobilização, que é a capacidade de adsorção da enzima junto ao suporte, foi condizente com os valores de retenção da atividade enzimática e com os

valores obtidos para a área superficial específica. A casca de coco verde, sabugo de milho, e a celulose microcristalina apresentaram maiores valores para a área superficial e consequentemente maior eficiência de imobilização (Tabela 13). Isso evidência a existência de uma relação entre a área superficial específica e a capacidade de carreamento da enzima pelo suporte.

Tabela 14. Retenção da atividade enzimática das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* imobilizadas por adsorção em subprodutos agroindustriais utilizando estufa como método de secagem.

Suportes	EI (%)	R_{AE} (%)	Umidade (%)	A_w (-)
Bagaço de cana	52,0 ± 0,90	74,63 ± 0,61	7,5 ± 0,73	0,24 ± 0,02
Casca de coco	82,0 ± 0,33	71,17 ± 0,76	6,1 ± 0,60	0,35 ± 0,06
Celulose MC	75,0 ± 0,24	79,60 ± 0,66	5,7 ± 0,85	0,13 ± 0,08
Casca de arroz	73,0 ± 0,95	74,17 ± 0,35	5,2 ± 0,32	0,18 ± 0,05
Palha de milho	68,3 ± 0,89	64,93 ± 0,93	7,6 ± 0,40	0,33 ± 0,02
Sabugo de milho	77,0 ± 0,87	71,23 ± 1,01	7,2 ± 0,25	0,31 ± 0,02

EI: eficiência de imobilização; R_{AE}: retenção da atividade enzimática; A_w: atividade de água.

Entre os vários critérios utilizados para estudar a estabilidade de compostos biológicos incluem o conteúdo de umidade, concentração de soluto, pressão osmótica, umidade relativa e atividade de água. É um consenso de que este último é o mais importante para expressar os requerimentos para o crescimento microbiano, atividade enzimática e outras alterações químicas (FERNÁNEZ-SALGUEIRO et al., 1993).

A determinação do conteúdo de água dos derivados imobilizados, realizada pela quantificação da umidade residual e da atividade de água, apresentou valores adequados para estocagem de materiais biológicos como as proteínas. A umidade variou de 5,2 a 7,6%, enquanto que o valor de atividade de água apresentou uma média em torno de 0,25.

A atividade de água (A_w) é um dos principais fatores para prevenir ou limitar o desenvolvimento microbiano. Em vários casos, este parâmetro é responsável pela estabilidade do produto, modula a resposta microbiana e determina qual o tipo de

microrganismo poderá se desenvolver no produto. Condições adversas de A_w podem causar estresse osmótico e provocar a esporulação nos microrganismos e em condições ótimas de A_w induzem a germinação e crescimento. Segundo Beauchat (1981) várias bactérias e fungos, inclusive alguns produtores de toxinas, se desenvolvem quando os valores de A_w estão entre 0,6 e 0,97. Isso acontece porque células microbianas têm pressão osmótica interna mais elevada do que o meio ao seu redor, resultando em pressão túrgica exercida sobre a parede da célula, provendo uma força mecânica necessária para a expansão da célula e crescimento. Quando um microrganismo é colocado em um ambiente com A_w reduzida, a água migra do citoplasma da célula e a membrana perde o turgor. A homeostasia (equilíbrio interno) é perturbada e o microrganismo não se multiplicará e permanecerá na fase lag até o equilíbrio ser re-estabelecido (SHIBATA, 2013).

Outros fatores tornam muito importante o monitoramento da atividade de água de formulações sólidas, tais como: possibilidade de avaliar reações químicas e vida de prateleira, determinar a estabilidade física, escolha da embalagem – proteção contra umidade ambiente, avaliar a transferência de umidade entre ingredientes, avaliar o intercâmbio de umidade com o meio ambiente (SHIBATA, 2013).

A Figura 21 apresenta os resultados do teste de estabilidade quando os derivados imobilizados foram armazenados a 5 °C durante um período de 6 meses, assim como a atividade residual após 5 ciclos de reação. No teste de retenção da atividade enzimática durante os ciclos foi utilizado o *p*-NPP como substrato. Durante o período de armazenamento a retenção da atividade enzimática dos derivados imobilizados variou de 41,1 a 61,0% (Figura 21a). A eficiência do processo de imobilização e secagem na estabilidade da lipase fica evidente quando se compara o valor da retenção da atividade no período avaliado. No mesmo período, a atividade da lipase livre mantida em solução aquosa teve uma diminuição de 85,8% enquanto que para a enzima imobilizada em celulose microcristalina, por exemplo, a diminuição foi de apenas 38,1%. Os ciclos de atividade enzimática, que representam o reuso do derivado imobilizado, também foram determinados. A média de retenção da atividade da enzima imobilizada após cinco ciclos de reação foi de 46,4% (Figura 21b).

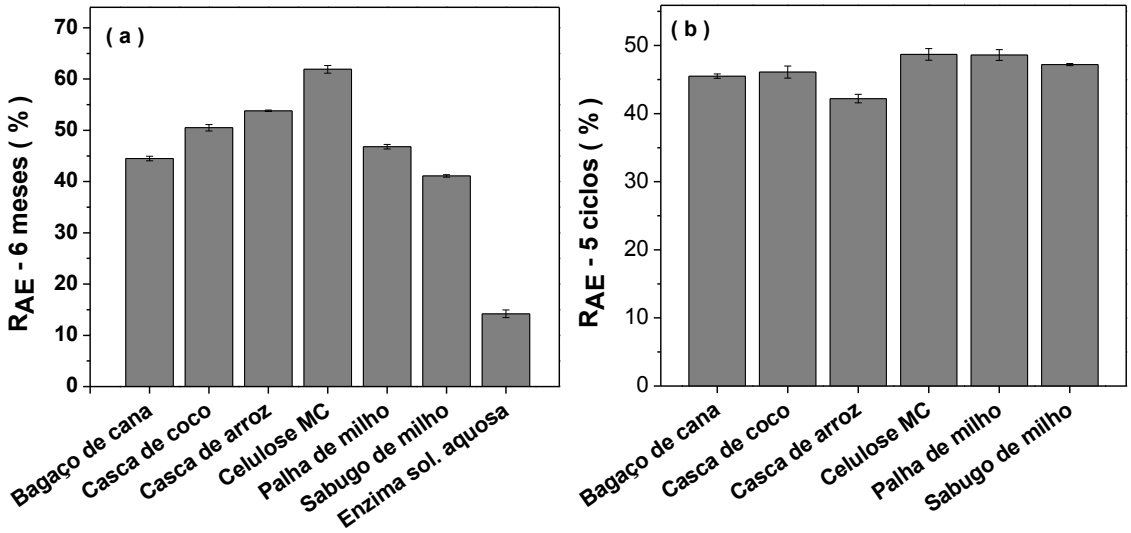


Figura 21 - Retenção da atividade enzimática (R_{AE}) das lipases imobilizadas por adsorção e secas em estufa no período de armazenamento de 6 meses a 5°C (a) e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b).

5.3.2 Secagem por liofilização

O segundo método de imobilização por adsorção utilizou o processo de liofilização na etapa de secagem. Os resultados das respostas analisadas para esse processo de imobilização estão apresentados na Tabela 15. A eficiência de imobilização apresentou valores muito próximos àqueles obtidos com a secagem em estufa, uma vez que o mesmo procedimento de imobilização foi utilizado. A diferença, que foi o método de secagem do derivado imobilizado obtido, influenciou na principal resposta analisada que é a manutenção da atividade enzimática. Usando celulose microcristalina e casca de arroz como suportes, os valores de retenção da atividade enzimática apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$) quando comparando com os valores obtidos para os demais suportes (Tabela A2). O conteúdo de umidade apresentou média de 5,85% e atividade de água em torno de 0,28, o que evidencia a eficácia do processo de secagem uma vez que esses valores são indicativos da qualidade final do produto obtido (JUNIOR et al., 2003).

Tabela 15. Resultados da eficiência de imobilização, retenção da atividade enzimática, umidade e atividade de água das lipases imobilizadas por adsorção em subprodutos agroindustriais utilizando a liofilização como método de secagem.

Suportes	EI (%)	R_{AE} (%)	Umidade (%)	A_w (-)
Bagaço de cana	59,0 ± 0,80	75,03 ± 0,21	5,8 ± 0,53	0,29 ± 0,02
Casca de coco verde	77,5 ± 0,73	75,50 ± 0,50	6,7 ± 0,61	0,35 ± 0,03
Casca de arroz	72,3 ± 0,90	90,73 ± 0,38	4,6 ± 0,32	0,19 ± 0,03
Celulose microcristalina	81,4 ± 0,24	91,13 ± 0,90	4,1 ± 0,12	0,18 ± 0,08
Palha de milho	70,3 ± 0,81	83,03 ± 0,91	7,6 ± 0,20	0,30 ± 0,02
Sabugo de milho	78,1 ± 0,27	87,97 ± 0,35	6,3 ± 0,25	0,38 ± 0,04

EI: eficiência de imobilização; R_{AE}: retenção da atividade enzimática; A_w: atividade de água

A Figura 22 apresenta os resultados do teste de estabilidade quando os derivados imobilizados foram armazenados a 5 °C durante um período de 3 meses (Figura 22a), assim como a atividade residual após 5 ciclos de reuso.

A média da retenção da atividade no período de armazenamento foi de 78,2% (diminuição da atividade enzimática inicial de 21,8%) enquanto que para a enzima livre e em solução aquosa a retenção foi de 30,18% (decréscimo de 69,8%). Embora o tempo de análise tenha sido inferior ao utilizado para os derivados imobilizados obtidos pela secagem em estufa, mais uma vez ficou evidente o papel positivo que a secagem e imobilização exercem na estabilidade enzimática.

A retenção da atividade após cinco ciclos de reação variou de 37,5 a 48,7%, conforme apresenta a Figura 22b.

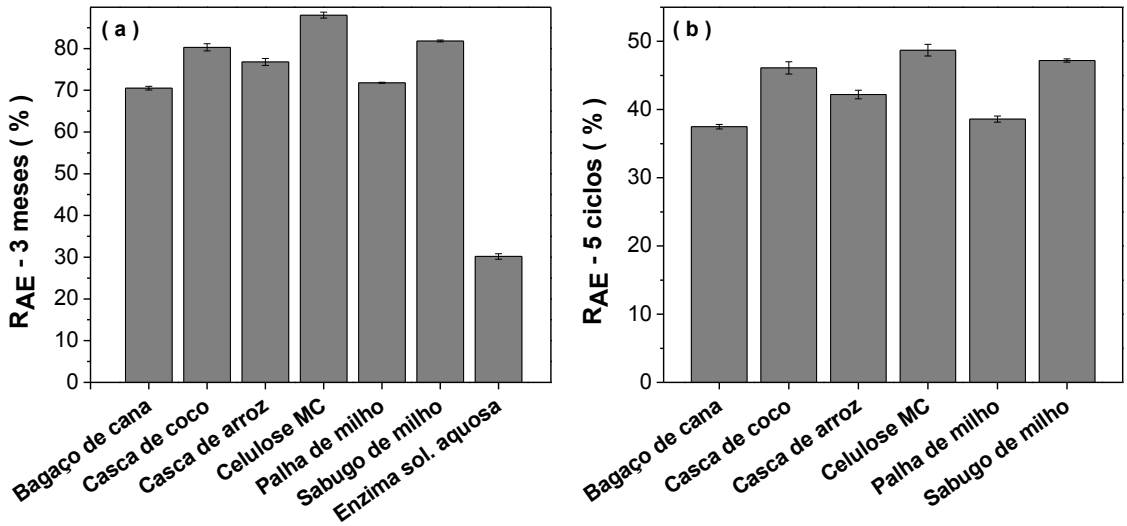


Figura 22. Retenção da atividade enzimática (R_{AE}) das lipases imobilizadas por adsorção e secas em liofilizador no período de armazenamento de 3 meses a 5°C (a) e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b).

5.3.3 Secagem por "spray drying"

O terceiro método de imobilização por adsorção utilizando o "spray dryer" como equipamento de secagem mostrou-se altamente promissor. A Tabela 16 apresenta os valores para rendimento do processo, retenção da atividade enzimática, umidade residual e atividade de água dos derivados imobilizados obtidos. Usando este secador, verificou-se diferença estatística ($p<0,05$) para os valores de retenção da atividade enzimática com o uso da celulose microcristalina comparado com os valores obtidos para os demais suportes (Tabela A3). A celulose microcristalina proporcionou 98,6% de retenção da atividade enzimática, seguido por casca de arroz (96,4%), bagaço de cana (94,3%) e palha de milho (93,8%).

Levando em consideração as diferenças estatísticas ($p<0,05$) para a retenção da atividade enzimática utilizando os diferentes processos de secagem, o "spray dryer" foi o melhor método para desidratação dos derivados imobilizados obtidos pela adsorção (Tabela A4). Em seguida tem-se a secagem por liofilização como o segundo melhor método utilizado e por último a secagem por estufa de convecção forçada de ar. Ressalta-se entretanto, que estas conclusões são válidas para as condições experimentais empregadas nesse trabalho.

Tabela 16. Resultado da imobilização de lipases em diferentes suportes (subprodutos agroindustriais) utilizando o "spray dryer" como equipamento de secagem.

Suportes	R (%)	R_{AE} (%)	Umidade (%)	A_w (-)
Bagaço de cana	42,0	94,33 ± 0,67	4,5 ± 0,33	0,14 ± 0,06
Casca de coco verde	77,0	85,57 ± 0,60	6,1 ± 0,60	0,30 ± 0,01
Casca de arroz	55,0	96,40 ± 0,87	4,2 ± 0,32	0,18 ± 0,03
Celulose microcristalina	60,0	98,60 ± 0,56	5,7 ± 0,55	0,23 ± 0,08
Palha de milho	41,3	93,80 ± 0,40	5,6 ± 0,70	0,30 ± 0,02
Sabugo de milho	67,0	90,57 ± 0,57	5,2 ± 0,45	0,21± 0,04

R: recuperação de produto; R_{AE}: retenção da atividade enzimática; A_w: atividade de água.

O processo de imobilização por adsorção utilizando a secagem em "spray drying" possui peculiaridades que o torna diferente dos demais processos até aqui apresentados. Na utilização da estufa ou liofilizador como equipamentos de secagem, a imobilização ocorria antes do processo de desidratação propriamente dito. Isso porque mantinha-se a enzima em contado com o suporte por uma hora e somente após a filtração é que o derivado obtido era submetido à desidratação. No caso do uso do "spray dryer", a enzima ficou em contado com o suporte durante o mesmo período de tempo e sob agitação constante. A diferença primordial é que não ocorreu a filtração após essa etapa, ou seja, toda a mistura (enzima+suporte) foi submetida à secagem. Como consequência disso, teoricamente toda a enzima que não se perde no processo de secagem estará presente no suporte, seja pela interação química (força iônica, interação hidrofóbica etc.) ou interação física (encapsulação/revestimento). Isso pode ter contribuído para a obtenção de derivados imobilizados apresentando valores para retenção da atividade enzimática superiores àqueles obtidos pelos métodos de secagem em estufa e liofilização.

Os valores do conteúdo de água das amostras obtidas também ficaram dentro da faixa adequada para o armazenamento de produtos biológicos: umidade média de 8,2% e atividade de água com média de 0,22 (JUNIOR et al., 2003).

A taxa de recuperação das amostras (produção de pó) variou de 41 a 77% sendo estes valores considerados adequados para equipamentos de escala laboratorial. A baixa recuperação do produto, com o uso de alguns suportes, pode

estar relacionada às propriedades físico-químicas dos suportes e também ao fato de que o sistema coletor do pó (ciclone) utilizado no “spray dryer” é de escala laboratorial. Este problema pode ser resolvido durante o processo de escalonamento, pela escolha de um sistema coletor mais eficiente assim como o uso de filtros de manga e precipitação eletrostática.

Outro problema recorrente durante o desenvolvimento da secagem em “spray dryer” é a alta aderência de alguns materiais nas paredes da câmara de secagem, levando à diminuição da recuperação do produto final. Assim, outra forma de melhorar o rendimento do processo é através da otimização da formulação da solução de secagem. A utilização de substâncias que propiciem uma diminuição da aderência do material seco ao equipamento de secagem é uma das possibilidades para resolver o problema de baixa recuperação.

A Figura 23 apresenta os resultados do teste de estabilidade quando os derivados imobilizados obtidos pela secagem em “spray dryer” foram armazenados a 5°C durante um período de 6 meses (Figura 23a), assim como a retenção da atividade enzimática após 5 ciclos de reação (Figura 23b). A análise dos gráficos apresentados na Figura 23 mostra que a imobilização e secagem por “spray dryer” revelou-se uma excelente ferramenta para estabilização da lipase. Enquanto que a atividade enzimática dos derivados imobilizados apresentou redução inferior a 30,0% do valor inicial, a enzima livre e em solução aquosa teve diminuição de quase 86,0% de sua atividade. Os valores da retenção da atividade após cinco ciclos de reação também foram maiores, sendo que houve a manutenção da atividade acima de 50,0% para todos os suportes utilizados (Figura 23b).

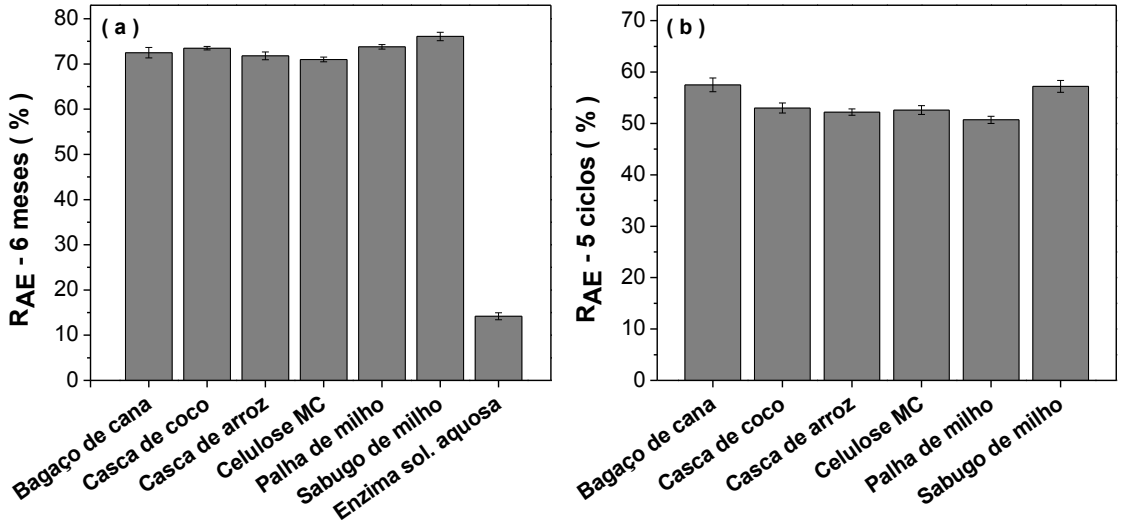


Figura 23. Retenção da atividade enzimática (R_{AE}) das lipases imobilizadas por adsorção utilizando "spray dryer" como método de secagem no período de armazenamento de 6 meses a 5 °C (a) e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b).

No planejamento dos experimentos de imobilização, geralmente, a adsorção é o primeiro método a ser avaliado devido à sua fácil execução. A utilização de métodos reversíveis para imobilização de enzimas é altamente atraente, também por razões econômicas, porque quando a atividade enzimática decai o suporte pode ser regenerado e recarregado com enzima ativa. De fato, o custo do suporte é muitas vezes o fator principal no custo total do catalisador imobilizado. A imobilização reversível de enzimas é particularmente importante para a imobilização de enzimas lábeis e para aplicações em sistemas bioanalíticos (GUPTA; MATTIASSON, 1992).

Entretanto, os mecanismos envolvidos na interação suporte/enzima são complexos, pois envolvem vários tipos de ligações não covalentes atuando simultaneamente, a saber: pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações dipolo-dipolo, forças eletrostáticas, forças hidrofóbicas (SYNOWIECKI et al., 1987). Todas estas ligações são rompidas com facilidade através da variação do pH, da força iônica, temperatura e da natureza do solvente.

De modo geral, os requisitos básicos para um material ser considerado um suporte adequado são: elevada área superficial, permeabilidade, estabilidade química e mecânica sob as condições operacionais, capacidade de regeneração, custo, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao

ataque microbiano, alta densidade de grupos reativos presentes na superfície dos mesmos, dentre outras (MATEO et al., 2007).

Além disso, adsorção de lipase em certo suporte depende de fatores como pH, concentração iônica, ponto isoelétrico, superfície e propriedades da enzima. A maioria dos suportes geralmente possuem capacidade de carreamento protéico que varia de 2 a 50 mg de proteína por grama de suporte. No entanto, alguns suportes possuem capacidade de carreamento superior a 170 mg de proteína.g^{-1} de suporte (TRAN; BALKUS-JR, 2011). Entretanto essa alta capacidade pode resultar em problemas de interferência estérica e perda da atividade enzimática (VILLENEUVE et al., 2000). Em geral, a máxima adsorção é observada em pHs perto do ponto isoelétrico da lipase. Em adição, suportes porosos são superiores aos não-porosos para processos de imobilização devido à grande área superficial. Entretanto, suportes porosos devem possuir uma morfologia interna que permita não apenas a ligação da enzima, mas também uma fácil acessibilidade às moléculas de substrato para minimizar possíveis limitações difusionais. Tem-se revelado que tamanhos de poros que são mais compatíveis para imobilização de lipases possuem pelo menos 100 nm de diâmetro (MOJOVIĆ et al., 1999). Tamanhos de poros menores podem resultar em uma diminuta disponibilidade de espaço para a enzima e restringir a difusão de moléculas.

A Figura 24 ilustra uma enzima a qual requer uma orientação específica em um material poroso para se tornar acessível. Não há controle sobre essa orientação ao menos que certos resíduos da proteína interajam mais favoravelmente com as paredes dos poros resultando numa orientação preferencial. O tamanho do poro também força certa orientação principalmente se a enzima não é esférica. Um importante fator quando enzimas são adsorvidas em suportes porosos é o diâmetro da abertura do poro. Isso acontece porque a capacidade de carreamento e retenção da enzima são claramente dependentes da relação de tamanho entre a enzima e o diâmetro dos poros do suporte. É obvio que enzimas muito maiores que a abertura dos poros não vão se encaixar no interior dos mesmos. Com diâmetros de poros menores que o diâmetro da enzima, a adsorção fica restrita na superfície externa do suporte e o interior dos poros fica inacessível (Figura 24B). Em contraste, materiais com diâmetro de poros muito maior que as enzimas adsorvidas são altamente suscetíveis à dessorção durante sua utilização (Figura 24D). Suportes com

diâmetros de poros correspondentes ao tamanho da enzima diminui a possibilidade de dessorção e adicional estabilidade é observada (Figura 24C) (TRAN; BALKUS-JR, 2011).

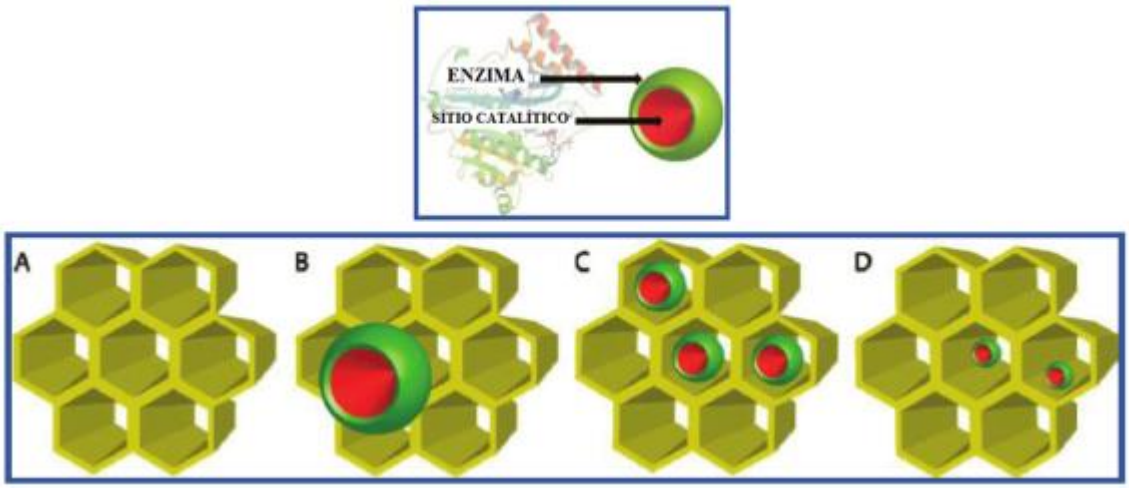


Figura 24. A) Imagem representativa de um suporte poroso; B) Descreve a situação em que a enzima é muito grande para encaixar dentro dos poros; C) Retrata a situação em que o tamanho da enzima e o diâmetro dos poros são correspondentes; D) Situação em que o diâmetro dos poros é muito maior do que a enzima (Adaptado de TRAN; BALKUS-JR, 2011).

Como inconveniente do uso dos suportes porosos, tem-se possíveis problemas relacionados a limitações difusionais, uma vez que o substrato além de se difundir do seio da solução para a superfície externa, deverá difundir-se também para o interior dos poros do suporte, no qual grande parte das moléculas do catalisador estão situadas. Todavia, a localização das enzimas no interior dos poros também lhes conferem uma proteção frente a eventuais condições adversas do meio reacional (MATEO et al., 2007). Os suportes não porosos apresentam como principal vantagem a acomodação das moléculas de enzima apenas na sua superfície externa, o que facilita a interação do catalisador com o substrato. No entanto, a pequena área superficial exibida por estes suportes é sua mais notória desvantagem (MATEO et al., 2007).

Embora as enzimas imobilizadas por essa técnica estejam sujeitas à dessorção, a imobilização por adsorção é uma das técnicas mais empregadas na obtenção de biocatalisadores insolúveis, devido à sua maior praticidade e menor custo (KENNEDY et al., 1988). A maior aplicação de biocatalisadores imobilizados por essa técnica encontra-se em meios orgânicos, no qual as enzimas não são

solúveis, desfavorecendo assim o processo de dessorção (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

Os resultados apresentados, principalmente no que se refere à alta retenção da atividade enzimática, demonstram a eficiência desse método de imobilização para a enzima em estudo. O método de secagem também foi interessante por proporcionar a obtenção de um produto com baixo conteúdo de água. Por fim, a combinação dos processos de imobilização por adsorção e secagem mostrou-se altamente viável para a estabilidade da enzima, principalmente quando se compara com a estabilidade da lipase na forma livre e em solução.

5.4 Imobilização por ligação covalente

Nesta etapa do trabalho foi avaliada a eficiência da imobilização da lipase pelo método de ligação covalente. O glutaraldeído, epicloridrina e/ou metaperiodato de sódio foram utilizados como agentes ativadores dos mesmos suportes usados para o estudo da imobilização por adsorção. Além disso, foram avaliados diferentes equipamentos de secagem para a obtenção do produto final, a saber: leito de jorro, estufa e liofilizador.

5.4.1 Secagem em leito de jorro

5.4.1.1 Agente ligante: metaperiodato de sódio

Os maiores valores de retenção de atividade enzimática foram obtidos para todos os suportes ativados com 1,5% de metaperiodato de sódio (Tabela 17). Nesta concentração (1,5% v/v), a casca de arroz foi o melhor suporte para a retenção da atividade enzimática, apresentando diferença estatística ($p<0,05$) entre os valores obtidos com uso dos demais suportes ativados com a mesma concentração de agente ligante (Tabela A5). O rendimento na produção de pó (enzima imobilizada e seca) teve uma média de 73,0%. Esse valor esta de acordo com o que é relatado para a secagem em um equipamento de leito de jorro de escala laboratorial. Pode-se observar pela média dos valores de temperatura do ar de saída (T_{gs}) e da temperatura interna (T_i) do secador monitorada no interior da câmara de secagem (termômetro de infravermelho) determinadas em 80 e 60 °C respectivamente, que o

sistema substrato-enzima não entra em contato com temperaturas elevadas durante o processo de secagem. Além disso, o reduzido tempo de residência do material dentro do leito corroborou para a alta retenção da atividade enzimática apresentada pelos derivados imobilizados obtidos por esse processo. Os valores experimentais para a atividade de água (média 0,43) e umidade (média 8,21%) reforçaram a viabilidade do uso do leito de jorro para imobilização e secagem da lipase.

Tabela 17. Resultado da imobilização das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* em subprodutos agroindustriais utilizando metaperiodato de sódio como agente ligante e secagem em leito de jorro.

Suporte	MP (%)	T_{gs} (°C)	T_{gi} (°C)	R (%)	R_{AE} (%)	A_w (-)	Umidade (%)
Bagaço de cana	0,5	79,6	62,7	59,3	45,17±0,35	0,44±0,06	9,40±1,80
	1,5	77,5	61,1	64,6	67,70±0,26	0,46±0,03	8,80±0,67
	2,5	78,8	62,9	60,6	49,40±0,56	0,42±0,04	9,10±0,97
Casca de coco verde	0,5	81,5	61,9	61,0	45,73±0,40	0,39±0,03	7,13±0,57
	1,5	80,7	60,5	60,3	55,77±0,25	0,44±0,04	8,53±0,33
	2,5	78,9	59,7	62,1	41,30±0,36	0,40±0,06	8,33±0,24
Casca de arroz	0,5	78,8	60,9	73,0	56,03±0,25	0,24±0,03	5,24±0,93
	1,5	75,8	61,0	80,6	83,97±0,31	0,26±0,07	7,74±1,13
	2,5	79,6	62,0	71,0	33,40±0,62	0,30±0,02	8,20±0,87
Celulose MC	0,5	80,6	60,8	78,3	63,07±0,31	0,42±0,09	7,50±0,47
	1,5	79,1	62,1	81,8	78,17±0,81	0,36±0,05	6,33±0,63
	2,5	81,2	60,8	79,4	55,23±0,32	0,40±0,04	8,80±0,67
Palha de milho	0,5	80,3	58,7	70,2	58,67±0,60	0,59±0,03	9,73±0,74
	1,5	81,2	57,5	72,6	80,70±0,66	0,61±0,08	9,88±0,57
	2,5	78,9	59,1	71,3	62,80±0,20	0,54±0,04	8,15±0,24
Sabugo de milho	0,5	83,7	60,5	73,3	68,83±0,49	0,44±0,09	7,15±0,22
	1,5	79,5	57,7	78,5	78,30±0,62	0,47±0,04	8,65±0,84
	2,5	79,5	58,3	74,6	59,97±0,15	0,54±0,03	9,15±0,24

MP: metaperiodato de sódio; MC: microcristalina; Tg_S: temperatura de saída; Tgi: temperatura interna; R: rendimento; R_{AE}: retenção da atividade enzimática; A_w: atividade de água.

Realizou-se também a avaliação da estabilidade dos derivados imobilizados obtidos com o uso de 1,5% de metaperiodato, assim como a retenção da atividade enzimática após vários ciclos de reação. A Figura 25 apresenta os resultados do teste de estabilidade quando os derivados imobilizados obtidos após a secagem em

leito de jorro foram armazenados a 5°C durante 6 meses. Os valores de retenção da atividade enzimática teve média de 77,1%. Esse valor é um indicativo da viabilidade do uso da secagem em leito de jorro e do método de ligação covalente na proteção das propriedades da enzima e no controle de sua estabilidade.

Os valores da retenção da atividade após cinco ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato teve uma média de 67,0%. Esse valor é maior do que aqueles obtidos na imobilização por adsorção o que indica o maior potencial da ligação covalente no reuso da enzima imobilizada.

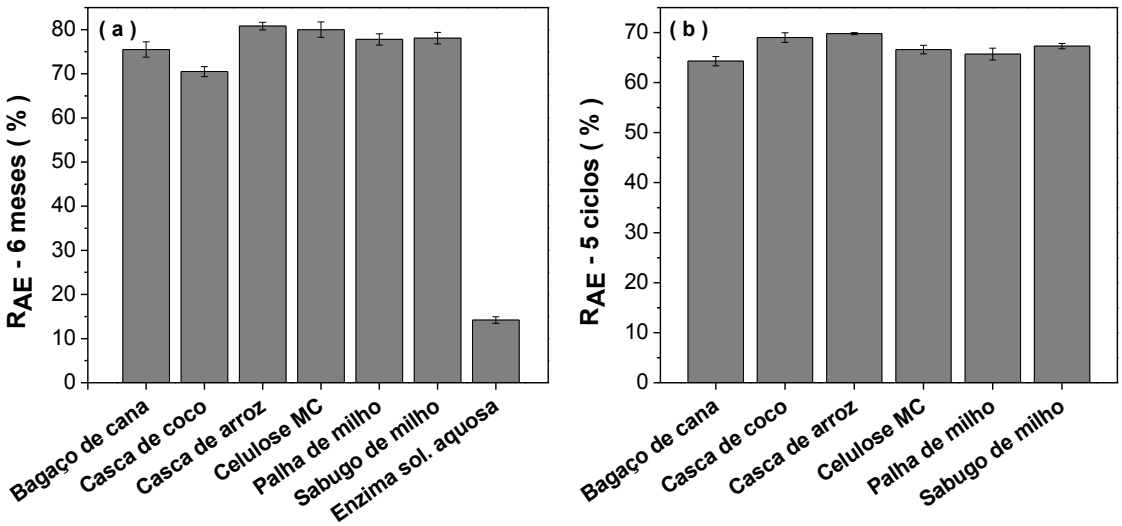


Figura 25. Retenção da atividade enzimática das lipases imobilizadas por ligação covalente (metaperiodato de sódio) e utilizando leito de jorro como método de secagem no período de armazenamento de 6 meses a 5°C (a) e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b).

5.4.1.2 Agente ligante: epicloridrina

A imobilização utilizando suporte ativado com epicloridrina proporcionou uma retenção de atividade enzimática inferior quando comparado com a utilização do metaperiodato de sódio e glutaraldeído (Tabela 18). Mais uma vez a concentração de 1,5% do agente ligante revelou-se a mais adequada com valores de retenção da atividade variando de 51,2 a 73,9%. Nesta concentração (1,5% v/v), a casca de arroz foi o melhor suporte para a retenção da atividade enzimática, apresentando diferença estatística ($p<0,05$) entre os valores obtidos com uso dos demais suportes ativados com a mesma concentração de agente ligante (Tabela A6). Mesmo esses

valores sendo menores do que aqueles obtidos através do uso dos demais agentes aqui avaliados, ainda são interessantes quando comparados com a utilização de outros agentes ligantes e/ou lipases de outras fontes (Vide Tabela 1).

Tabela 18. Resultado da imobilização das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* em subprodutos agroindustriais utilizando epicloridrina como agente ligante e secagem em leito de jorro.

Suporte	EP (%)	T_{gs} (°C)	T_{gi} (°C)	R (%)	R_{AE} (%)	A_w (-)	Umidade (%)
Bagaço de cana	0,5	79,6	52,7	41,3	41,03±0,57	0,49±0,07	9,41±1,83
	1,5	78,5	51,6	45,7	51,00±0,20	0,50±0,03	9,34±0,67
	2,5	76,8	55,9	39,6	40,70±0,60	0,52±0,04	9,20±0,77
Casca de coco verde	0,5	79,5	51,0	53,1	55,53±0,47	0,39±0,03	7,13±0,57
	1,5	77,7	47,5	57,3	62,80±0,30	0,44±0,04	8,53±0,33
	2,5	78,9	51,7	52,1	41,50±0,44	0,40±0,06	8,11±0,24
Casca de arroz	0,5	78,8	59,9	73,0	66,60±0,44	0,44±0,03	6,74±0,93
	1,5	77,8	55,0	77,2	73,83±0,60	0,45±0,07	7,74±0,13
	2,5	79,6	52,0	74,0	53,93±0,06	0,43±0,02	7,20±0,37
Celulose MC	0,5	80,3	50,8	48,3	60,70±0,36	0,42±0,09	7,22±0,47
	1,5	81,1	52,3	47,9	68,67±0,35	0,50±0,05	8,36±0,51
	2,5	82,2	53,8	49,4	55,33±0,67	0,47±0,06	7,80±0,25
Palha de milho	0,5	80,3	53,7	70,1	66,10±0,70	0,55±0,03	9,79±0,94
	1,5	79,2	49,5	69,6	72,73±0,40	0,47±0,01	9,08±0,17
	2,5	78,9	52,1	71,3	62,77±0,25	0,50±0,03	9,15±0,84
Sabugo de milho	0,5	81,7	54,5	63,3	68,03±0,55	0,51±0,09	8,15±0,22
	1,5	77,5	52,7	67,5	71,00±0,20	0,50±0,04	8,60±0,64
	2,5	79,5	51,3	64,6	62,27±0,64	0,54±0,03	9,17±0,29

EP: epicloridrina; MC: microcristalina; T_{gs}: temperatura de saída; T_{gi}: temperatura interna; R: rendimento; R_{AE}: retenção da atividade enzimática; A_w: atividade de água

Valores semelhantes de temperatura do ar de saída (T_{gs}) e da temperatura interna (T_{gi}) do secador monitorada no interior da câmara de secagem (termômetro de infravermelho), respectivamente 80 e 52 °C foram encontrados para os ensaios de secagem utilizando a epicloridrina como agente ligante, quando comparados aos resultados obtidos para o metaperiodato de sódio (T_{gs} de 80 °C e T_{gi} de 60°C). O rendimento do processo apresentou valores inferiores, em media 60%, quando comparados aos obtidos para o metaperiodato de sódio (70%). Esse fenômeno pode ter ocorrido pela natureza do agente ligante, o qual aumentou a aderência do

produto nas paredes do secador e nas partículas inertes. Para resolver esse problema seriam necessários ajustes na formulação de secagem e/ou nos próprios parâmetros de secagem do equipamento. Com relação ao conteúdo de água, a média para atividade de água (0,47) e para a umidade medida pelo método de estufa (8,37%) também mostraram valores adequados, evidenciando a eficácia do leito de jorro como método de secagem de produtos biológicos.

A Figura 26 apresenta os resultados do teste de estabilidade quando os derivados imobilizados obtidos (1,5% de epicloridrina) após a secagem em leito de jorro foram armazenados a 5°C durante um período de 6 meses, assim como a atividade residual após 5 ciclos de reação. A enzima seca e covalentemente imobilizada apresentou uma estabilidade muito superior a sua forma livre e solúvel. A média para a retenção da atividade enzimática no período de armazenamento foi de 73,5%. Os valores da retenção da atividade após cinco ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato apresentou valor médio de 60,5%.

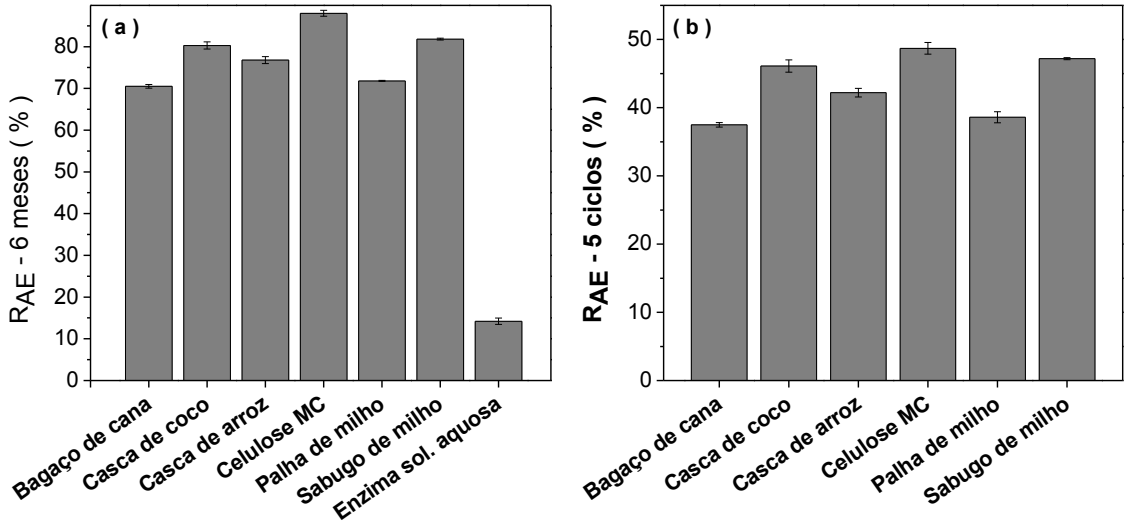


Figura 26. Retenção da atividade enzimática das lipases imobilizadas por ligação covalente (epicloridrina) e utilizando leito de jorro como método de secagem no período de armazenamento de 6 meses a 5 °C (a) e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b).

5.4.1.3 Agente ligante: glutaraldeído

As condições de secagem em leito de jorro, os resultados obtidos para a retenção da atividade enzimática e rendimento do processo, estão apresentados na Tabela 19. De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que a retenção da atividade enzimática apresentou valores superiores aos da enzima livre em quatro dos seis suportes avaliados, sendo eles, bagaço de cana, casca de arroz, celulose microcristalina e palha de milho.

Obteve-se diferença estatística ($p<0,05$) para os valores de retenção da atividade enzimática com o uso do glutaraldeído na concentração de 1,5% (v/v) comparado com as demais concentrações utilizadas. Nesta concentração, os melhores valores foram obtidos para a celulose microcristalina com retenção da atividade enzimática de 179,1%, seguido da casca de arroz e da palha de milho com 173,9% e 169,8%, respectivamente. A análise desses resultados mostrou diferença estatística ($p<0,05$) para os valores de retenção da atividade enzimática com o uso da celulose microcristalina comparado com os demais suportes. A casca de arroz foi o suporte que propiciou a maior retenção da atividade enzimática, apresentando diferença estatística ($p<0,05$) entre subprodutos agroindustriais utilizados (Tabela A7).

O equipamento de secagem, leito de jorro, mostrou-se eficiente tanto para a retenção da atividade enzimática quanto para o rendimento do processo que variou de 55,6 a 80,2% (média de 72%). As temperaturas do ar de saída (T_{gs}) e da temperatura interna (T_{gi}) do secador apresentaram valores semelhantes as encontrados para os demais agentes de ligação estudados (metaperiodato de sódio e epicloridrina), com valores médios de 80 e 60°C, respectivamente.

As diferenças nos valores da retenção da atividade enzimática e dos rendimentos de imobilização podem ser explicadas pelas diferenças nas estruturas dos suportes. Os subprodutos estudados apresentam diferenças na estrutura, composição, área de superfície e porosidade, portanto, são esperadas diferenças nas respostas dessas variáveis, mesmo que a ativação dos suportes tenha sido idêntica.

Tabela 19. Retenção da atividade enzimática das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* imobilizadas em subprodutos agroindustriais utilizando leito de jorro como método de secagem e glutaraldeído como agente ligante.

Suporte	GL (%)	T_{gs} (°C)	T_{gi} (°C)	R (%)	R_{AE} (%)
Bagaço de cana	0,5	83,8	63,7	55,6	125,37 ± 0,71
	1,5	84,5	64,1	64,6	156,57 ± 0,67
	2,5	83,8	62,9	57,6	149,60 ± 0,36
Casca de coco verde	0,5	82,5	61,5	68,0	89,47 ± 0,47
	1,5	80,7	62,5	68,3	102,37 ± 0,60
	2,5	77,9	59,7	72,1	91,63 ± 0,45
Casca de arroz	0,5	80,8	62,9	76,0	146,07 ± 0,32
	1,5	79,8	61,1	74,6	173,90 ± 0,26
	2,5	79,6	63,0	74,0	133,73 ± 0,47
Celulose microcristalina	0,5	80,8	60,4	78,3	132,83 ± 0,85
	1,5	80,3	60,1	76,8	179,12 ± 0,74
	2,5	81,2	59,8	79,4	154,77 ± 0,49
Palha de milho	0,5	80,3	55,7	78,6	149,33 ± 0,70
	1,5	76,2	54,5	80,2	169,80 ± 0,57
	2,5	73,9	52,1	77,3	122,93 ± 0,32
Sabugo de milho	0,5	83,7	60,5	73,3	83,87 ± 1,22
	1,5	81,5	57,9	71,5	142,70 ± 0,66
	2,5	79,5	58,3	74,6	88,97 ± 0,74

GL: glutaraldeído; T_{gs}: temperatura de saída; T_{gi}: temperatura interna; R: rendimento; R_{AE}: retenção da atividade enzimática; temperatura de entrada 100°C.

A Tabela 20 apresenta os resultados da umidade residual e atividade de água do sistema enzima-suporte, após os processos de imobilização e secagem em leito de jorro.

Tabela 20. Caracterização do sistema enzima-suporte (glutaraldeído 1,5%) obtidos durante a secagem em leito de jorro no que se refere à umidade (base seca) e atividade de água.

Suporte	A_w (%)	Umidade (%)
Bagaço de cana	0,18 ± 0,01	3,53 ± 0,72
Casca de coco verde	0,18 ± 0,01	4,99 ± 0,95
Casca de arroz	0,20 ± 0,02	4,78 ± 0,27
Celulose microcristalina	0,23 ± 0,01	2,31 ± 0,57
Palha de milho	0,25 ± 0,02	3,89 ± 0,25
Sabugo de milho	0,30 ± 0,02	5,76 ± 0,57

De acordo com a Tabela 20 todos os derivados imobilizados apresentaram resultados satisfatórios para o conteúdo de água, umidade abaixo de 6% e atividade de água inferior a 0,3.

Um dos motivos que justifica a secagem do extrato enzimático é a diminuição da A_w, e assim diminuir a possibilidade de contaminação microbiológica do mesmo. Pode-se observar na Tabela 20, que os valores de A_w foram baixos com média de 0,23 para os seis suportes utilizados na imobilização.

Com relação ao teste de estabilidade, no qual os derivados imobilizados (glutaraldeído 1,5% v/v) foram armazenados a 5°C durante um período de 6 meses, o glutaraldeído juntamente com a secagem em leito de jorro proporcionaram uma excelente estabilidade enzimática. Os derivados imobilizados obtidos tiveram uma diminuição da atividade enzimática com uma média de apenas 17,3% enquanto que a forma livre da enzima perdeu 85,8% de sua atividade inicial (Figura 27a). Desta forma, a imobilização promoveu um efeito benéfico na estabilidade da enzima, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima. A avaliação da manutenção da atividade após os ciclos de reação também revelou valores superiores aos outros processos de secagem e imobilização usando os subprodutos agroindustriais como suporte. Os valores da retenção da atividade após cinco ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato apresentou valor médio de 67,2%.

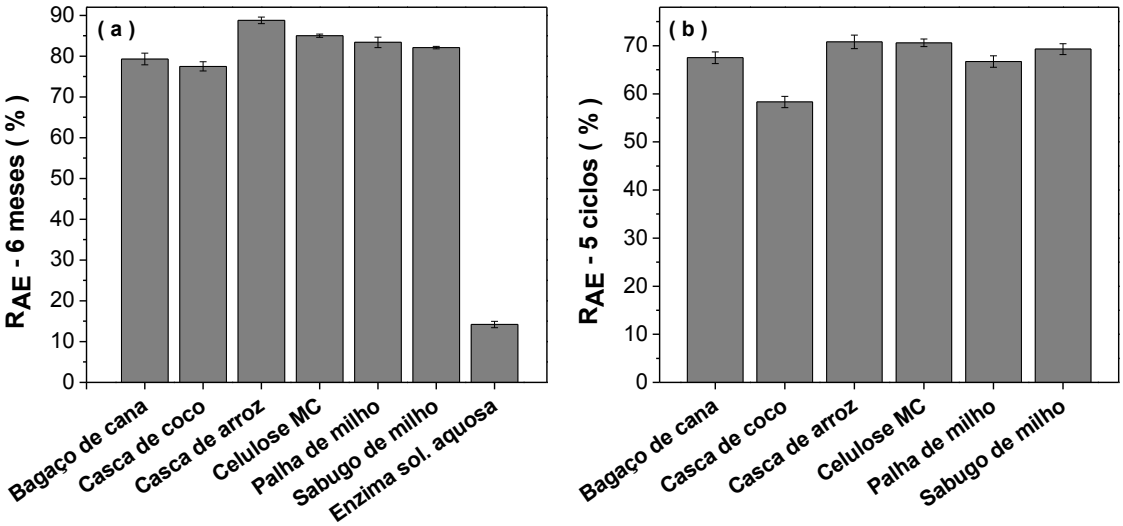


Figura 27. Retenção da atividade enzimática das lipases imobilizadas com glutaraldeído e utilizando leito de jorro como método de secagem no período de armazenamento por 6 meses a 5 °C (a) e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b).

5.4.2 Secagem em estufa de convecção forçada

Na secagem em estufa somente o glutaraldeído foi avaliado como agente ligante. A Tabela 21 apresenta os resultados de retenção da atividade enzimática para as três concentrações de glutaraldeído avaliadas. Os valores da atividade enzimática foram bem interessantes quando se leva em consideração os valores relatados na literatura especializada (PARK, et al., 2006).

A concentração de 1,5% de glutaraldeído foi a que forneceu os melhores resultados de retenção da atividade enzimática para todos os suportes avaliados. A palha de milho foi o suporte que propiciou a maior retenção da atividade enzimática, apresentando diferença estatística ($p<0,05$) entre os valores obtidos para todos os outros suportes utilizados (Tabela A8).

Analisando os resultados apresentados na Tabela 21 pode-se inferir que os suportes apresentaram capacidades diferentes de interação com o agente ligante, o que certamente influenciou na eficiência da ligação com a enzima e portanto, na retenção da atividade enzimática final. Embora a concentração maior de glutaraldeído tenha fornecido uma eficiência de imobilização superior isso não garante uma retenção da atividade enzimática maior do que as demais concentrações empregadas. Uma das possíveis causas para esse fenômeno é a

polimerização excessiva da enzima com o agente ligante. Isso pode ocasionar uma interação indesejada com resíduos de aminoácidos que estão presentes no sítio ativo, o que pode afetar a capacidade catalítica da enzima. Além disso, outro problema do alto grau de polimerização é a rigidez excessiva da estrutura da enzima, podendo reduzir sua atividade catalítica. É importante ressaltar que um excesso de carreamento, causada por exemplo por uma elevada eficiência de imobilização, pode conduzir a efeitos difusivos negativos. O intercâmbio de substrato e produto em um suporte que contém uma camada muito expessa de enzimas fica prejudicado, diminuindo o poder catalítico do biocatalizador.

Tabela 21. Retenção da atividade enzimática e eficiência da imobilização das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* imobilizadas em subprodutos agroindustriais utilizando a estufa como método de secagem.

Suportes	Glutaraldeído (%)	R_{AE} (%)	EI (%)
Bagaço de cana	0,5	39,37 ± 0,75	48,1 ± 0,7
	1,5	63,47 ± 0,72	64,2 ± 0,3
	2,5	54,93 ± 0,49	70,0 ± 0,6
Casca de coco verde	0,5	17,77 ± 0,45	34,3 ± 0,7
	1,5	32,70 ± 0,30	45,9 ± 0,6
	2,5	16,83 ± 0,91	48,7 ± 1,2
Casca de arroz	0,5	36,13 ± 0,80	63,7 ± 1,1
	1,5	63,67 ± 0,90	79,5 ± 0,6
	2,5	49,10 ± 0,85	85,1 ± 0,4
Celulose microcristalina	0,5	35,40 ± 0,46	36,3 ± 1,3
	1,5	56,73 ± 0,47	48,9 ± 0,9
	2,5	44,37 ± 0,95	53,1 ± 1,1
Palha de milho	0,5	71,37 ± 0,40	71,5 ± 0,9
	1,5	91,83 ± 0,21	88,6 ± 1,3
	2,5	85,73 ± 0,87	91,9 ± 0,8
Sabugo de milho	0,5	23,70 ± 0,80	53,4 ± 1,1
	1,5	55,03 ± 0,35	69,8 ± 1,4
	2,5	43,80 ± 0,62	76,5 ± 0,9

R_{AE}: Retenção da atividade enzimática; EI: Eficiência de imobilização

A Tabela 22 apresenta os resultados do conteúdo de água dos suportes imobilizados e secos com uma concentração de glutaraldeído de 1,5% (v/v). Os valores obtidos referentes à umidade residual e atividade de água são considerados adequados para que se obtenha uma estabilidade mais efetiva durante a estocagem (BEAUCHAT, 1991).

Tabela 22. Caracterização do sistema enzima-suporte (glutaraldeído 1,5% v/v) obtidos durante a secagem por estufa no que se refere à umidade (base seca) e atividade de água.

Suporte	A_w (-)	Umidade (%)
Bagaço de cana	0,28 ± 0,91	5,53 ± 0,72
Casca de coco verde	0,28 ± 0,71	5,99 ± 1,09
Casca de arroz	0,24 ± 0,92	5,23 ± 1,27
Celulose microcristalina	0,21 ± 0,11	4,31 ± 0,57
Palha de milho	0,25 ± 0,32	5,80 ± 1,25
Sabugo de milho	0,23 ± 0,22	5,12 ± 0,87

Aw: atividade de água

A Figura 28 apresenta os resultados do teste de estabilidade para os derivados imobilizados obtidos após a secagem em estufa quanto estes foram armazenados a 5°C durante um período de 6 meses, assim como a atividade residual após 5 ciclos de reação. Enquanto a atividade enzimática dos derivados imobilizados apresentou em média perda inferior a 34,5% do valor inicial, a enzima livre e em solução aquosa teve diminuição de quase 86,0% de sua atividade. Os valores da retenção da atividade após cinco ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato teve uma média de 65,1%. Esse valor torna-se muito interessante quando leva-se em consideração os aspectos econômicos do uso de enzimas. A manutenção da atividade após vários ciclos de reação é uma das vantagens esperados no processo de imobilização.

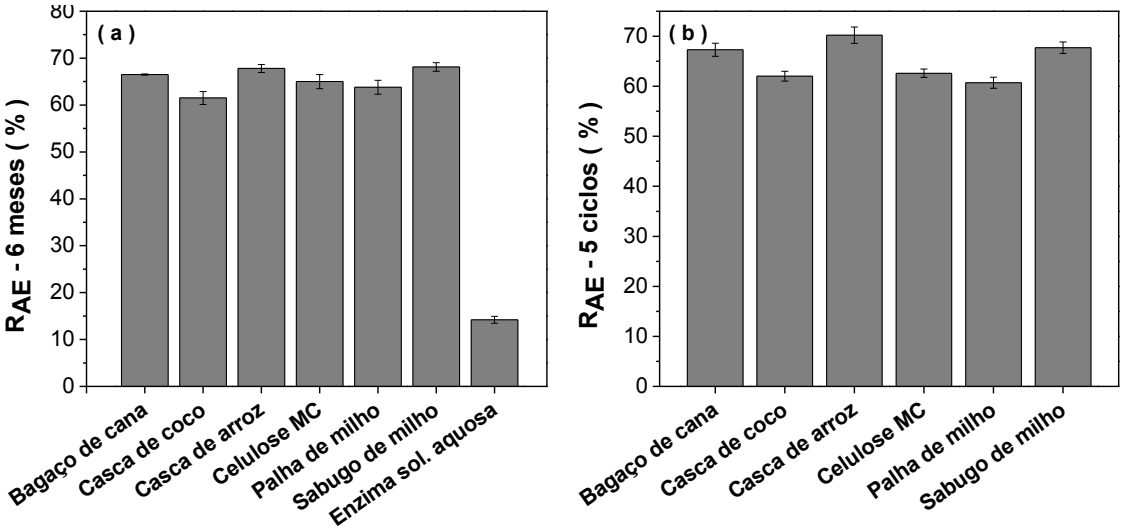


Figura 28. Retenção da atividade enzimática (R_{AE}) das lipases imobilizadas por ligação covalente (glutaraldeído) e utilizando estufa como método de secagem no período de armazenamento de 6 meses a 5°C (a) e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b).

5.4.3 Secagem por liofilização (“freeze drying”)

A lipase imobilizada nos suportes previamente ativados com glutaraldeído também foi submetida à secagem por liofilização. A Tabela 23 apresenta as concentrações do agente ligante utilizadas, assim como a retenção da atividade enzimática e eficiência de imobilização após a liofilização.

Pode-se verificar que dos suportes utilizados a palha de milho, cana de açúcar, sabugo de milho e casca de arroz proporcionaram o aumento da atividade enzimática inicial nas três concentrações de glutaraldeído. Houve diferença estatística ($p<0,05$) para os valores de retenção da atividade enzimática com o uso do glutaraldeído na concentração de 1,5% (v/v) comparado com as demais concentrações utilizadas. Nesta concentração (1,5% v/v), a casca de arroz foi o melhor suporte para a retenção da atividade enzimática, apresentando diferença estatística ($p<0,05$) entre os valores obtidos com uso dos demais suportes ativados com a mesma concentração de agente ligante (Tabela A9).

Tabela 23. Retenção da atividade enzimática (R_{AE}) e eficiência de imobilização (EI) das lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii* imobilizadas em subprodutos agroindustriais utilizando liofilização como método de secagem.

Suportes	Glutaraldeído (%)	R_{AE} (%)	EI (%)
Bagaço de cana	0,5	146,13 ± 0,80	48,1 ± 0,7
	1,5	154,77 ± 0,21	64,2 ± 0,3
	2,5	135,17 ± 0,51	70,0 ± 0,6
Casca de coco verde	0,5	75,73 ± 0,32	34,3 ± 0,7
	1,5	90,03 ± 0,21	45,9 ± 0,6
	2,5	52,47 ± 0,57	48,7 ± 1,2
Casca de arroz	0,5	133,77 ± 0,38	63,7 ± 1,1
	1,5	163,50 ± 0,46	79,5 ± 0,6
	2,5	116,17 ± 0,67	85,1 ± 0,4
Celulose microcristalina	0,5	58,73 ± 0,59	36,3 ± 1,3
	1,5	85,67 ± 0,57	48,9 ± 0,9
	2,5	73,60 ± 0,40	53,1 ± 1,1
Palha de milho	0,5	152,67 ± 0,87	71,5 ± 0,9
	1,5	157,57 ± 0,40	88,6 ± 1,3
	2,5	150,83 ± 0,76	91,9 ± 0,8
Sabugo de milho	0,5	111,30 ± 0,30	53,4 ± 1,1
	1,5	129,40 ± 0,85	69,8 ± 1,4
	2,5	119,77 ± 0,85	76,5 ± 0,9

R_{AE}: Retenção da atividade enzimática; EI: eficiência da imobilização

Pode-se verificar que o processo de imobilização covalente seguido da secagem em liofilizador, não somente propiciou a manutenção da atividade enzimática, como também otimizou a atividade hidrolítica da enzima em alguns casos. O fato da enzima estar imobilizada em um suporte pode ter auxiliado na proteção contra danos causados pelo processo de congelamento, como no caso de desdobramento de sua estrutura terciária.

O conteúdo de água é um fator crítico quando se leva em consideração a estabilidade de produtos biológicos durante o período de estocagem. Sendo assim, o conteúdo de água das amostras (1,5% de glutaraldeído) obtidas após a liofilização também foi determinado e esta apresentado na Tabela 24. Os valores da umidade

residual e principalmente de atividade de água foram superiores aos obtidos pelos outros métodos de secagem (secagem por estufa e leito de jorro). Segundo dados da literatura especializada, os valores ideais para a A_w devem ficar abaixo de 0,6 (BEAUCHAT, 1991).

Tabela 24. Caracterização do sistema enzima-suporte (glutaraldeído 1,5%) obtidos durante a secagem em liofilizador no que se refere à umidade (base seca) e atividade de água.

Suporte	Umidade (%)	A_w (%)
Bagaço de cana	7,53 ± 0,72	0,88 ± 0,03
Casca de coco verde	8,99 ± 0,95	0,68 ± 0,05
Casca de arroz	6,78 ± 1,27	0,73 ± 0,02
Celulose microcristalina	4,31 ± 1,53	0,30 ± 0,08
Palha de milho	8,89 ± 0,25	0,85 ± 0,08
Sabugo de milho	9,76 ± 0,67	0,93 ± 0,02

A_w: atividade de água

A Figura 29 apresenta os resultados do teste de estabilidade quando os derivados imobilizados obtidos após a secagem por liofilizador foram armazenados a 5°C durante um período de 6 meses, assim como a atividade residual após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato.

Os valores de retenção da atividade enzimática dos derivados imobilizados no período de armazenamento de 6 meses também foram menores do que para os outros processos de secagem. A média de retenção foi de 39,3%. Uma possível explicação para essa diminuição na estabilidade do derivado pode ter relação com o maior valor da atividade de água apresentado na Tabela 24. A presença da água pode desestabilizar a estrutura da enzima devido a diversas reações físico-químicas que ocorrem durante o armazenamento. Os valores da retenção da atividade após cinco ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato teve uma média de 56,4% como pode ser observado na Figura 25(b).

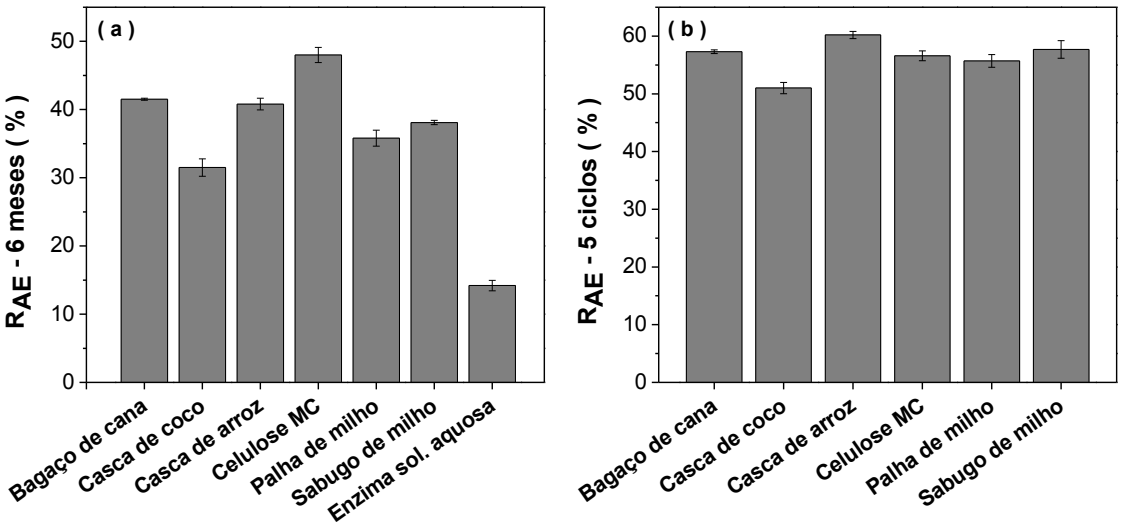


Figura 29. Retenção da atividade enzimática (R_{AE}) das lipases imobilizadas por ligação covalente (glutaraldeído) e utilizando liofilização como método de secagem no período de armazenamento de 6 meses a 5°C (a) e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato (b).

5.5 Caracterização do sistema enzima-suporte

Uma vez que os resultados referentes à retenção da atividade enzimática foram mais expressivos para imobilização covalente e secagem em leito de jorro, as amostras secas na proporção de 1,5% (v/v) de glutaraldeído foram selecionadas para a realização das análises de caracterização físico-química.

5.5.1 Análise por microscopia eletrônica de varredura

Pode-se constatar através da Figura 30 que os sistemas enzima-suporte apresentaram morfologias distintas. Houve uma predominância de partículas com superfícies irregulares e de formas cilíndricas, como é o caso da casca de arroz e da celulose microcristalina. No caso das partículas de casca de coco verde, sabugo de milho e palha de milho notam-se estruturas mais porosas e possivelmente flexíveis. O bagaço de cana-de-açúcar apresentou estruturas na forma de lascas. Essas diferenças nas morfologias externas das partículas podem ser atribuídas à composição química de cada subproduto agroindustrial e, também, influência do agente ativador, glutaraldeído, utilizado. Outro fator com potencial para influenciar na superfície das partículas é o comportamento das gotículas líquidas, que durante a secagem em leito de jorro, estão sujeitas às turbulências, movimentações internas e forças de atrito inter-partículas (MAA; HSU, 1997).

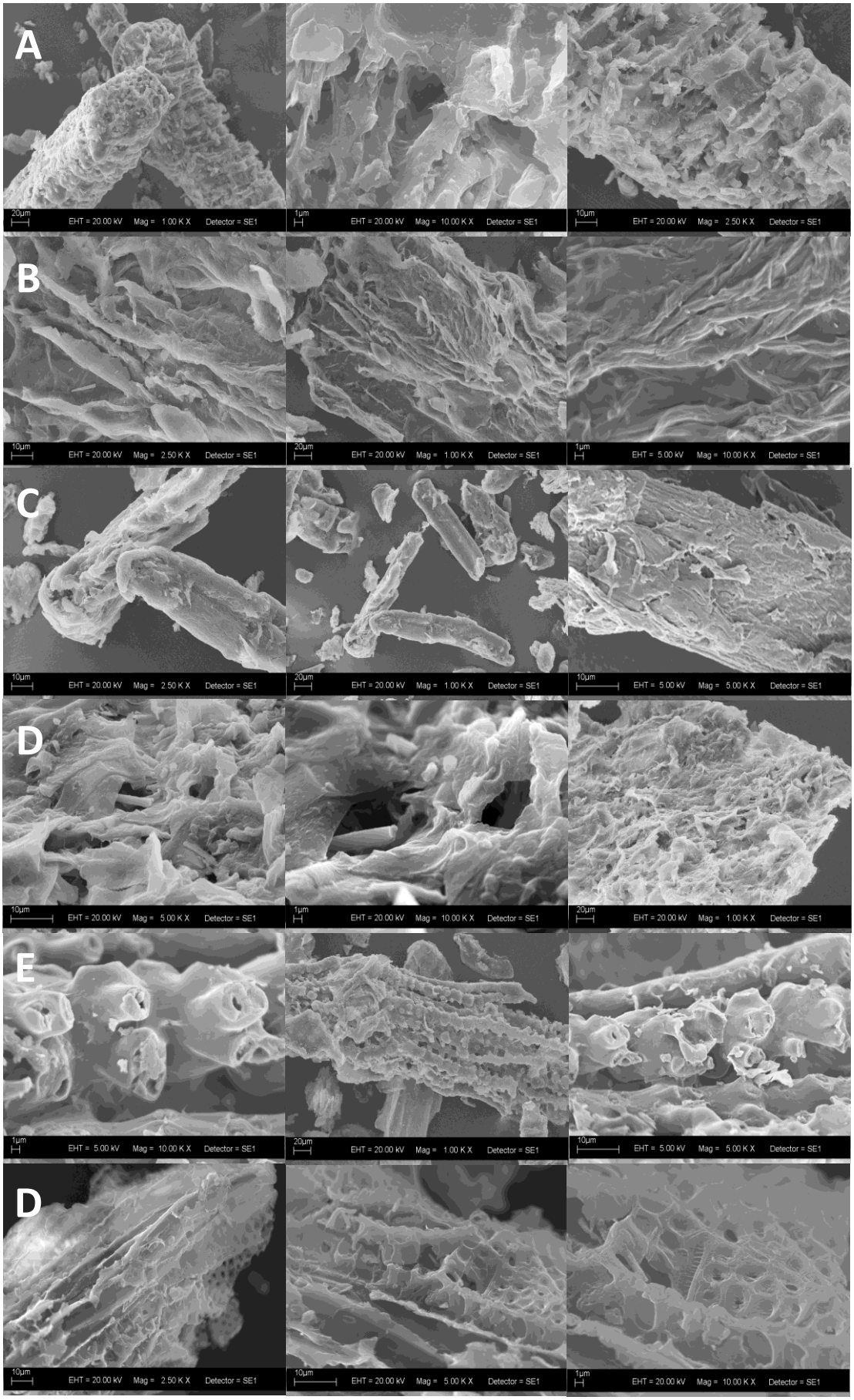
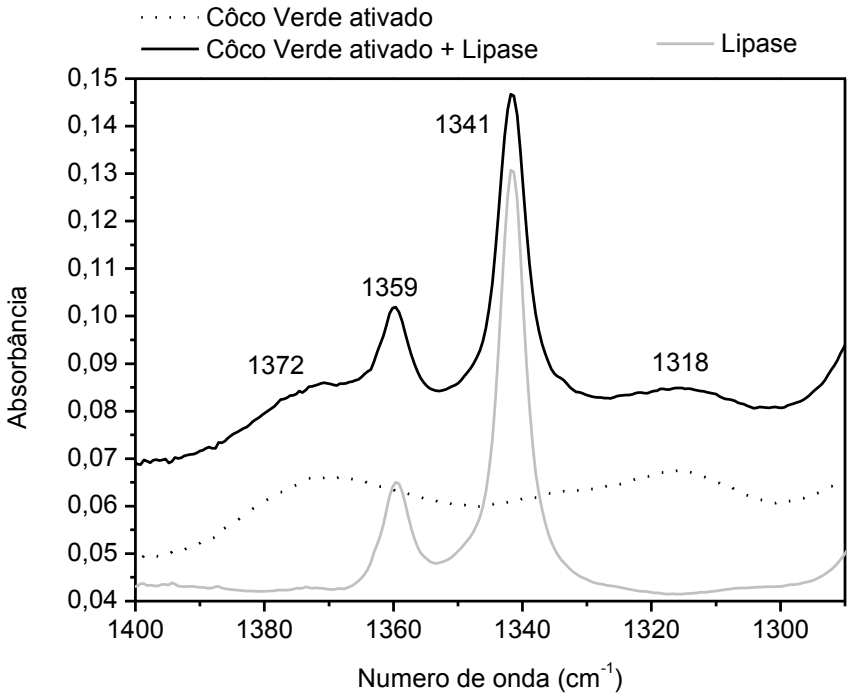


Figura 30. Fotomicrografias dos derivados imobilizados: (A) casca de arroz; (B) bagaço de cana; (C) celulose microcristalina; (D) casca de coco; (E) sabugo de milho; (F) palha de milho.

5.5.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A eficiência do método de imobilização em relação à incorporação de lipase no suporte ativado também foi avaliada por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). As Figuras 31 a 33 mostram um conjunto de espectros da lipase livre, suporte pré-ativado e derivado imobilizado produzido. A banda característica da lipase livre claramente apareceu no número de onda de 1341 cm^{-1} o que é observado também para o derivado imobilizado (suporte + lipase), sugerindo a fixação da enzima no suporte após o processo de imobilização.



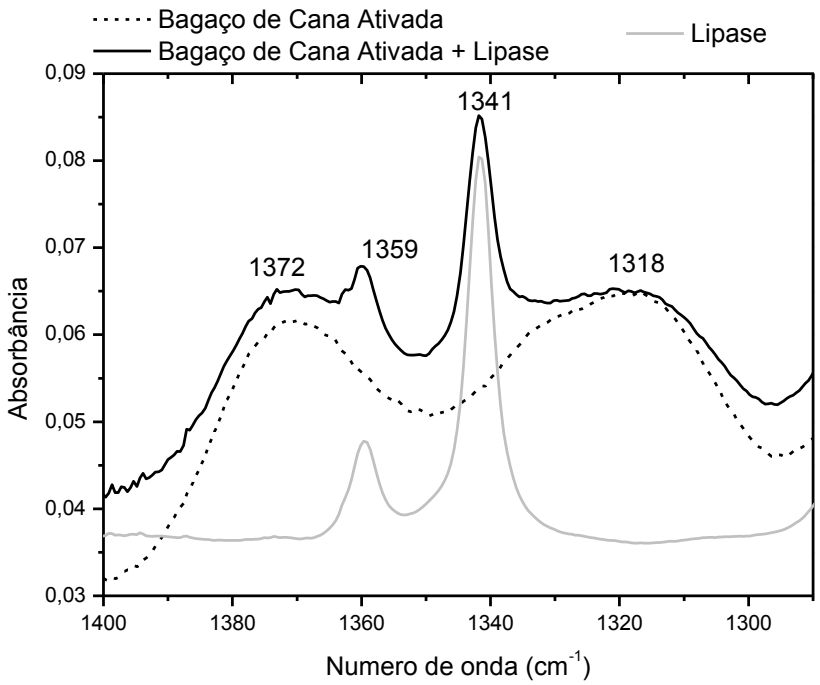


Figura 31. Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para lipase livre, suporte pré-ativado e derivado imobilizado obtido: casca de coco verde e bagaço de cana.

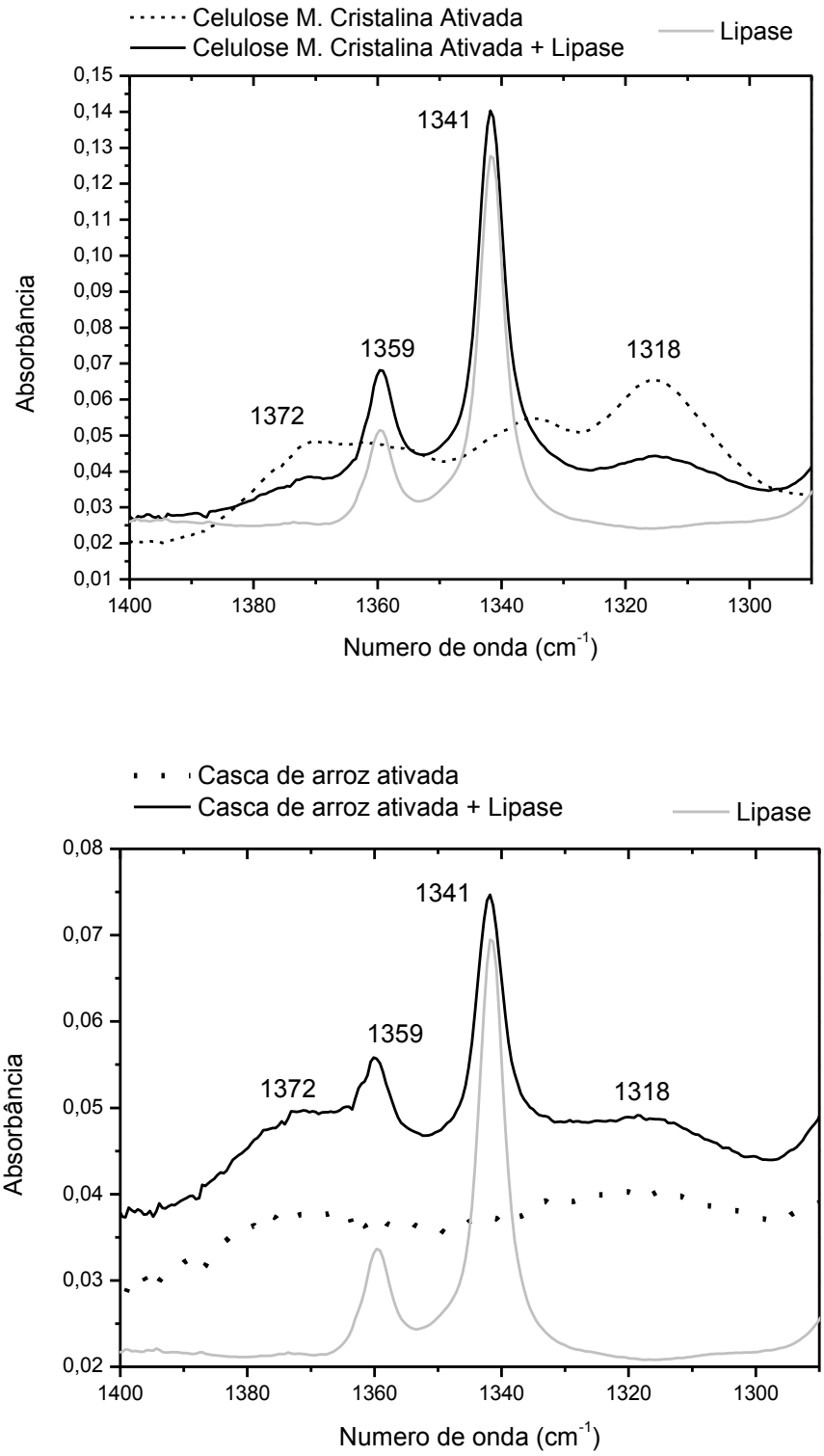


Figura 32. Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para lipase livre, suporte pré-ativado e derivado imobilizado obtido: celulose microcristalina e casca de arroz.

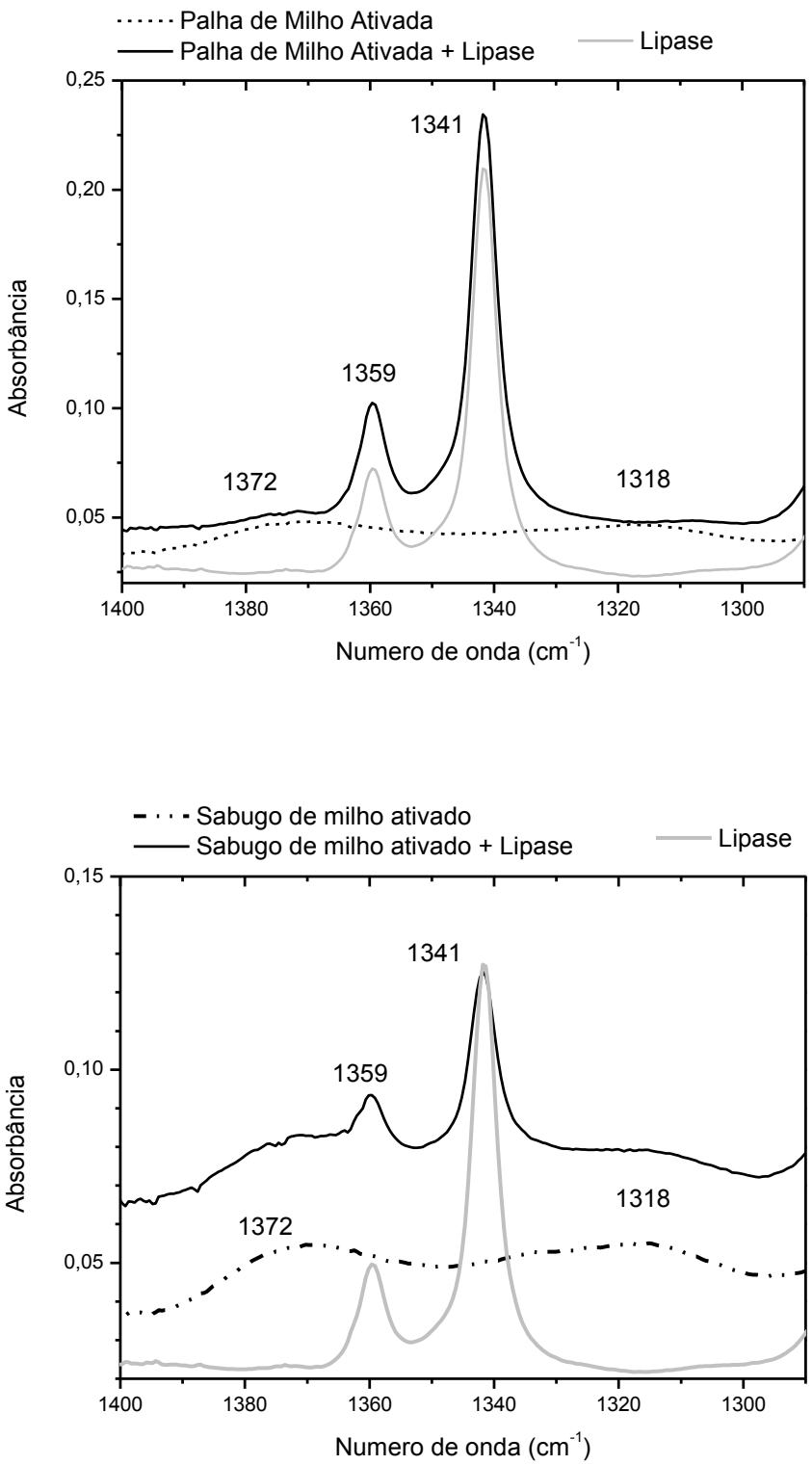


Figura 33. Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para lipase livre, suporte pré-ativado e derivado imobilizado obtido: palha de milho e sabugo de milho.

5.5.3 Análise elemental (CHN)

Para analisar a incorporação da enzima nos suportes realizou-se a análise elemental da superfície do suporte puro e ativado com glutaraldeído assim como dos derivados imobilizados obtidos (suporte+enzima). O principal elemento utilizado como parâmetro de comparação foi o nitrogênio devido ao fato deste elemento estar presente no suporte (tanto puro quanto ativado) em níveis extremante baixos e por ser um elemento referência para enzimas.

A Tabela 25 apresenta o conteúdo de CHN (carbono, hidrogênio e nitrogênio) das amostras analisadas. Como esperado, todos os derivados imobilizados apresentaram aumento na porcentagem dos elementos analisados. O nitrogênio foi claramente o elemento que mais aumentou na superfície do suporte após a imobilização da enzima, com uma média de aumento de 50,2%. Esses resultados reforçam as evidências da incorporação da enzima na superfície dos suportes.

Tabela 25. Resultado da análise elemental realizada para os suportes puros, suportes ativados e para os derivados imobilizados obtidos pelo uso do glutaraldeído (1,5% v/v) como agente ligante e leito de jorro como equipamento de secagem.

Amostra		Carbono (% m/m)	Hidrogênio (% m/m)	Nitrogênio (% m/m)
Bagaço de cana	puro	45,4 ± 0,1	5,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1
	ativado	46,4 ± 0,1	5,8 ± 0,3	0,3 ± 0,1
	+ lipase	47,0 ± 0,3	6,1 ± 0,2	0,5 ± 0,2
Casca de coco verde	puro	47,2 ± 0,8	5,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1
	ativado	46,6 ± 0,5	6,4 ± 0,4	0,9 ± 0,2
	+ lipase	47,1 ± 0,4	6,9 ± 0,7	1,1 ± 0,2
Casca de arroz	puro	32,3 ± 0,2	4,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2
	ativado	33,4 ± 0,1	4,9 ± 0,2	0,5 ± 0,1
	+ lipase	35,7 ± 0,3	5,3 ± 0,2	0,8 ± 0,1
Celulose Microcristalina	puro	41,9 ± 0,1	6,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2
	ativado	42,5 ± 0,1	6,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1
	+ lipase	43,0 ± 0,2	7,4 ± 0,2	0,8 ± 0,2
Palha de milho	puro	43,8 ± 0,1	5,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1
	ativado	45,9 ± 0,2	7,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1
	+ lipase	46,1 ± 0,1	7,9 ± 0,2	1,3 ± 0,1
Sabugo de milho	puro	45,2 ± 0,1	6,1 ± 0,2	0,8 ± 0,1
	ativado	45,6 ± 0,2	7,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1
	+ lipase	46,3 ± 0,2	7,6 ± 0,2	1,6 ± 0,1

5.5.4 Determinação dos parâmetros cinéticos e de estabilidade: lipase livre X lipase imobilizada

Os principais componentes de um sistema de enzima imobilizada são: a enzima, o suporte e o modo de ligar a enzima ao suporte. Após a imobilização, as propriedades físico-químicas da enzima podem sofrer significativas alterações. Deve-se considerar os efeitos da imobilização sobre a estabilidade, as propriedades cinéticas e especificidade além da produtividade da enzima (MARKOGLOU; WAINER, 1976). As diferenças no comportamento da enzima imobilizada, quando comparada à sua forma em solução, devem-se a fatores como efeitos conformacionais (modificação conformacional da molécula de enzima devido à alteração na estrutura terciária do sítio ativo); efeitos estereoquímicos (uma parte da molécula da enzima é imobilizada numa posição tal que o sítio ativo é relativamente inacessível); efeitos difusionais ou de transferência de massa (têm origem na resistência de difusão do substrato até o sítio catalítico da enzima) e efeitos microambientais resultantes do método de imobilização utilizado ou da presença e natureza (hidrofóbica ou hidrofílica) do suporte na vizinhança da enzima. Todos esses fatores podem influenciar as propriedades da enzima imobilizada que adquire novas propriedades cinéticas, modificações em seus valores de K_m e V_{max} (velocidade máxima de reação enzimática), deslocamento dos valores de pH e comportamento diferente, em relação à temperatura (MARKOGLOU; WAINER, 2003).

Portanto, o conhecimento desses parâmetros sobre a reação enzimática permite explorar melhor as propriedades catalíticas. Assim, foi realizado o estudo de alguns parâmetros bioquímicos e cinéticos tanto da lipase na forma livre quanto imobilizada. Para a forma imobilizada foram utilizados os derivados obtidos para os três suportes (casca de arroz, palha de milho e celulose microcristalina) que conferiram maior retenção da atividade enzimática para todos os agentes ligantes avaliados. A Tabela 26 mostra os resultados para a determinação da temperatura e pH ótimo e valores de K_m e V_{max} aparentes utilizando o *p*-NPP como substrato. A influência do processo de imobilização nas propriedades originais da lipase ficou evidente ao se analisar o comportamento da atividade enzimática frente à temperatura. Nota-se que a atividade máxima da lipase livre ocorreu a 60 °C, enquanto que a lipase imobilizada apresentou uma atividade máxima diferente e

dependente do agente ligante utilizado. As mudanças mais drásticas ocorreram com a utilização da epicloridrina e metaperiodato de sódio, uma vez que a temperatura ótima apresentou aumento de 10°C. Esses resultados sugerem que o processo de imobilização atuou no sentido de aumentar a temperatura ótima da enzima, o que é muito favorável, pois permite operações de trabalho em uma faixa maior de temperatura.

O aumento da temperatura ótima de atuação da lipase imobilizada pode ser atribuído à ligação efetiva da enzima ao suporte, impedindo o desdobramento da estrutura terciária da enzima (ZANIN; MORAIS, 2004; BALCÃO et al., 1996). Na literatura existem vários relatos de mudança na temperatura ótima de atuação da enzima mediante sua imobilização (Vide Tabela 1).

Um aumento de temperatura geralmente corresponde a um aumento na taxa de reação por unidade de enzima. Entretanto, a elevação de temperatura e o tempo de exposição também podem promover aumento na taxa de desativação térmica da lipase, portanto, reduzindo a formação de produto (GOMES et al., 2006).

Os dados da Tabela 27 mostram que a perda de atividade catalítica para enzima livre é bem superior àquela determinada para a imobilizada a 80 °C, sugerindo que o procedimento de imobilização conferiu à lipase maior estabilidade térmica. Após duas horas de incubação a 80°C, 50,0% da atividade da enzima livre foi perdida enquanto que para os derivados obtidos com o uso de epicloridrina e metaperiodato de sódio encontrou-se em media valores de retenção de atividade de 82,6% e 75,5%, respectivamente.

O glutaraldeído conferiu uma menor proteção térmica à enzima se comparado com os demais agentes ligantes, sendo que houve uma retenção média de 65,5% da atividade após o período de incubação. Posteriormente serão discutidos os possíveis mecanismos de interação de cada um dos agentes ligantes entre os suportes e a enzima, evidenciando a influência nas propriedades da enzima.

Tabela 26. Parâmetros bioquímicos e cinéticos da lipase livre e imobilizada nos subprodutos agroindustriais ativados com glutaraldeído, epicloridrina e metaperiodato de sódio.

Agente ligante	Suporte	Temp. ótima °C	pH ótimo	K_m mM	V_{max} µmol/min/mg
-	Lipase livre	60,0	6,5	0,212	160,3
Glutaraldeído	Casca de arroz	65,0	7,5	0,121	275,4
	Palha de milho	65,0	7,5	0,162	293,1
	Celulose micristalina	65,0	7,5	0,102	269,2
Epicloridrina	Casca de arroz	70,0	7,5	0,279	98,3
	Palha de milho	70,0	7,5	0,283	102,3
	Celulose micristalina	70,0	7,5	0,285	95,9
Metaperiodato de Sódio	Casca de arroz	70,0	8,5	0,245	111,4
	Palha de milho	70,0	8,5	0,267	108,9
	Celulose micristalina	70,0	8,5	0,268	116,4

Tabela 27. Estabilidade à temperatura da atividade enzimática da lipase livre e imobilizada nos subprodutos agroindustriais utilizando diferentes agentes ligantes.

Agente ligante	Suporte	Termoestabilidade (R_{AE} %)*
-	Lipase livre	50,0 ± 1,23
Glutaraldeído	Casca de arroz	68,0 ± 1,12
	Palha de milho	62,8 ± 0,90
	Celulose M. cristalina	65,7 ± 1,10
Epicloridrina	Casca de arroz	83,6 ± 0,80
	Palha de milho	81,2 ± 0,76
	Celulose M. cristalina	83,2 ± 0,63
Metaperiodato de sódio	Casca de arroz	76,6 ± 1,22
	Palha de milho	74,7 ± 1,09
	Celulose M. cristalina	75,2 ± 0,98

*R_{AE}: Retenção da atividade enzimática após duas horas de incubação a 80 °C.

A variação da atividade enzimática em função do pH para a lipase livre e imobilizada também esta apresentada na Tabela 26. Observa-se que o processo de imobilização deslocou o pH ótimo da enzima livre (pH= 6,5), para um valor de pH mais básico (pH= 7,5/8,5). Esse comportamento pode estar relacionado com possíveis mudanças conformacionais da enzima ou alterações de concentração entre as espécies carregadas, substrato, produto, íons hidrogênio, íons hidroxilas, tanto no microambiente da enzima imobilizada quanto no meio reacional (ZANIN;

MORAIS, 2004; GOMES et al., 2006). Normalmente esse é um comportamento esperado para lipases imobilizadas, onde o pH ótimo de atuação desloca-se parcialmente para pH mais alcalino, tendo em vista que o ataque nucleofílico da serina é auxiliado pelo comportamento básico da histidina (MURALIDHAR et al., 2002). Isto acontece porque a abertura, mesmo que parcial, da tampa hidrofóbica mediante a imobilização é susceptível de expor a histidina do sítio ativo diretamente à solução de íons de hidrogênio, e assim apenas condições menos ácidas produzem a forma não protonada do anel imidazólio necessária para um comportamento básico (GOMES et al., 2005).

A estrutura dos suportes também afeta o deslocamento do perfil de atuação da enzima no que se refere ao pH ótimo. Isso ocorre porque os grupos hidroxilas (^{-}OH) presentes do suporte possuem afinidade pelos hidrogênios ionizáveis (H^{+}) disponíveis no meio de reação, ocasionando um acúmulo desses íons, o que pode afetar o microambiente da lipase e, consequentemente, sua faixa de pH ótimo (ZANIN; MORAIS, 2004). Além disso, os grupos carboxílicos da lipase podem também influenciar o acúmulo de hidrogênios ionizáveis (GOMES et al., 2006). A estabilização deste microambiente ocorre em pH básico, permitindo maior redução da concentração de H+ no sistema imobilizado deslocando, por essa razão, o valor de pH ótimo de atuação da lipase de 6,5 na forma livre, para 7,5 ou 8,5 na forma imobilizada dependendo do agente ligante utilizado.

Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max}, determinados para a lipase livre foram 0,212 mM e 160,3 µmol/min/mg, respectivamente (Tabela 26). De acordo com estes resultados, a afinidade aparente pelo substrato para os derivados imobilizados mudou e foi dependente do tipo de reagente químico utilizado para ativação do suporte. Os resultados experimentais sugerem que estes reagentes modificaram as interações entre enzima e os suportes produzindo, consequentemente, alterações na taxa de reação. Para os derivados obtidos com a utilização do glutaraldeído como agente ligante, houve uma diminuição do valor do K_m com um valor médio de 0,129 mM. Esse aumento da afinidade da lipase imobilizada pelo substrato pode explicar o aumento na taxa de reação comparado com a enzima na forma livre, ou seja, obtenção de valores de atividade enzimática superiores a 100%. Esse aumento na taxa de reação também foi observado em vários trabalhos sobre imobilização de enzimas (HARA et al., 2008; KIM et al., 2006).

No caso de lipases, o processo de imobilização pode ser uma excelente ferramenta para auxiliar na atividade catalítica. Como já discutido anteriormente, estas enzimas possuem um tampa hidrofóbica cobrindo o sítio ativo. Em solução aquosa há um equilíbrio entre a forma aberta, com alta atividade, e a forma fechada que possui atividade catalítica reduzida. Diante dessa característica, fica evidente a necessidade de se explorar um protocolo de imobilização que favoreça o equilíbrio e a estabilização da enzima na sua forma mais ativa, nesse caso a forma aberta. Um dos modos de induzir a abertura da tampa é a utilização de suportes que apresentam uma superfície hidrofóbica ou suportes ativados com agentes químicos que interajam com os resíduos de aminoácidos da enzima estabilizando-a na configuração hiper-ativada. A Figura 34 apresenta dois possíveis mecanismos que podem ocorrer para estabilização da lipase. Seja por adsorção ou por ligação covalente, a lipase será fixada ao suporte e consequentemente terá sua estrutura moldada pela interação com o mesmo. Evidentemente, a ligação covalente pode proporcionar uma maior rigidez na estrutura da enzima, tornando-a física e bioquimicamente mais estável. Esta fixação da enzima na forma aberta é uma das possíveis razões para o aumento da atividade enzimática do derivado imobilizado quando comparado com sua contraparte solúvel.

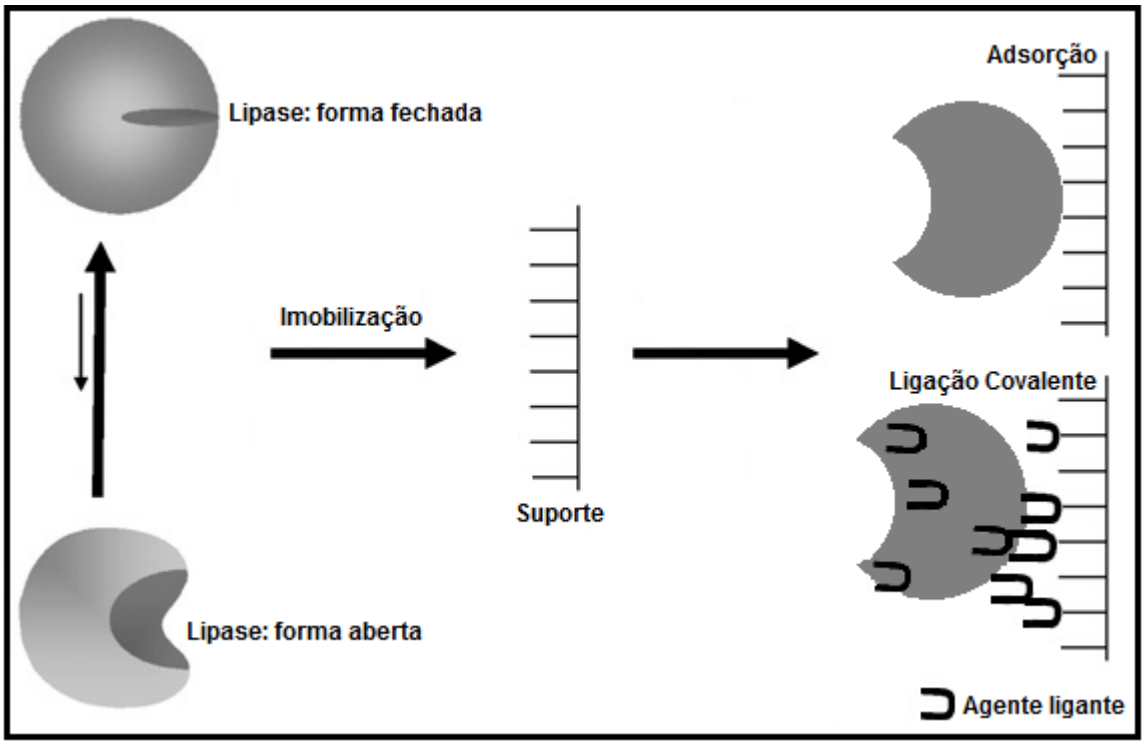


Figura 34. Possíveis mecanismos que podem ocorrer para estabilização e hiper-ativação da lipase.

A relação V_{max}/K_m da lipase imobilizada em casca de arroz com o uso do glutaraldeído é 3 vezes maior do que essa mesma relação tomando como base os valores para a enzima na forma livre. Isso pode ser explicado pela estabilização da conformação aberta da lipase imobilizada como resultado da abertura da tampa hidrofóbica (SCHRAG, et al., 1997; MONDAL et al., 2006). Isso ajuda a corroborar a idéia dos mecanismos propostos na Figura 34.

Geralmente, os valores de Km mudam após imobilização. Isto pode ser atribuído às mudanças estruturais na enzima sobre imobilização ou mudanças na acessibilidade do substrato ao sítio ativo (DA RÓS et al., 2010).

Os valores de Km podem variar significativamente de enzima para enzima, e mesmo para diferentes substratos utilizando a mesma enzima. Por exemplo, utilizando-se o *p*-NPP como substrato, Montero et al. (1993) encontraram valor de Km de 2600 mM para lipase de *C. rugosa* imobilizada em polipropileno, ao passo que Nadruz et al. (1994) estudaram a imobilização da mesma lipase, mas utilizando esferas de vidro como suporte e encontraram valores de Km de 88 mM (*p*-NPP também como substrato). Valores de K_m mais elevados foram determinados por Yesiloglu (2005) para lipase de *C. rugosa* imobilizada em bentonita usando azeite de oliva como substrato. Estas melhorias nos parâmetros cinéticos das lipases imobilizadas podem ser interessantes para a etapa de aplicação industrial. Este resultado torna-se mais valioso levando em consideração que o ensaio de análise dos parâmetros cinéticos adotados para os derivados imobilizados é considerado ideal para lipase solúvel. Isto sugere que, devido à resistência à transferência de massa, a atividade medida da lipase imobilizada pode ser menor do que a taxa real (RANJBAKHSH et al., 2012).

Vários materiais podem ser utilizados como suportes e, durante uma seleção para um dado processo de imobilização, as principais propriedades que devem ser analisadas são: pH, carga, natureza hidrofóbica e hidrofílica, presença de íons metálicos na superfície; morfologia; composição; resistência ao ataque microbiológico; resistência mecânica; resistência a compactação em operações a altas vazões quando se utilizam reatores de leito fixo; possibilidade para modificações físicas (tamanho, diâmetro, área superficial) e químicas (ZANIN, 1989). A escolha do suporte para a imobilização depende não só das suas propriedades químicas e físicas, como também, e principalmente, da enzima a ser imobilizada e

do processo no qual o catalisador será aplicado. Logo, pode-se dizer que não há um suporte universal que possa ser aplicado em todas as situações (ZANIN, 1989; D'SOUZA, 2006).

A busca por suportes mais baratos e a abundância de subprodutos agroindustriais, tem levado a alguns estudos de imobilização de enzimas nestes materiais (GODDARD; HOTCHKISS, 2007). Os subprodutos agroindustriais utilizados nesse trabalho são constituídos de uma complexa mistura de celulose, hemicelulose e lignina (Tabela 28). A Figura 35 apresenta a disposição geral de cada componente na estrutura celular vegetal.

A celulose é um polímero de alta massa molecular, composta em grande parte por unidades de glicose. A hemicelulose é composta em grande parte por unidades de xilose com pequenas partes de arabinose, ambas com cinco carbonos na estrutura molecular (pentose), em oposição à glicose que tem seis carbonos na estrutura molecular (hexose). Lignina é uma substância complexa composta em grande parte de fenólicos aromáticos compostos que geralmente dão a rigidez e a dureza da fibra vegetal. Existem também pequenas quantidades de compostos inorgânicos, tais como cálcio e sílica presentes nas estruturas celulares, mas que não são significativos na composição geral da fibra.

As principais diferenças entre os suportes utilizados nesse trabalho esta justamente na proporção de cada um desses componentes. Mesmo com essas diferenças, o mecanismo de interação com os agentes ligantes acaba sendo da mesma natureza, o que faz possível uma interpretação conjunta do processo de imobilização da enzima. Por exemplo, uma das principais características desses compostos é a grande presença de grupos hidroxilas que são importantes no processo de ativação da matriz via glioxil, por agentes funcionais como a epicloridrina, que reagem preferencialmente com grupos hidroxilas localizados na superfície do suporte formando uma ligação covalente (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010).

Tabela 28. Composição química de biomassas lignocelulósicas utilizadas como suportes para imobilização da lipase.

Biomassa lignocelulósica	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Bagaço de cana	32-48	19-27,5	23-32
Casca de coco verde	36-43	10,0	41-45
Casca de arroz	43,3	26,4	16,3
Palha de milho	25-42	34,5	14,1
Sabugo de milho	31,7-45,0	35,0	15,0-20,3

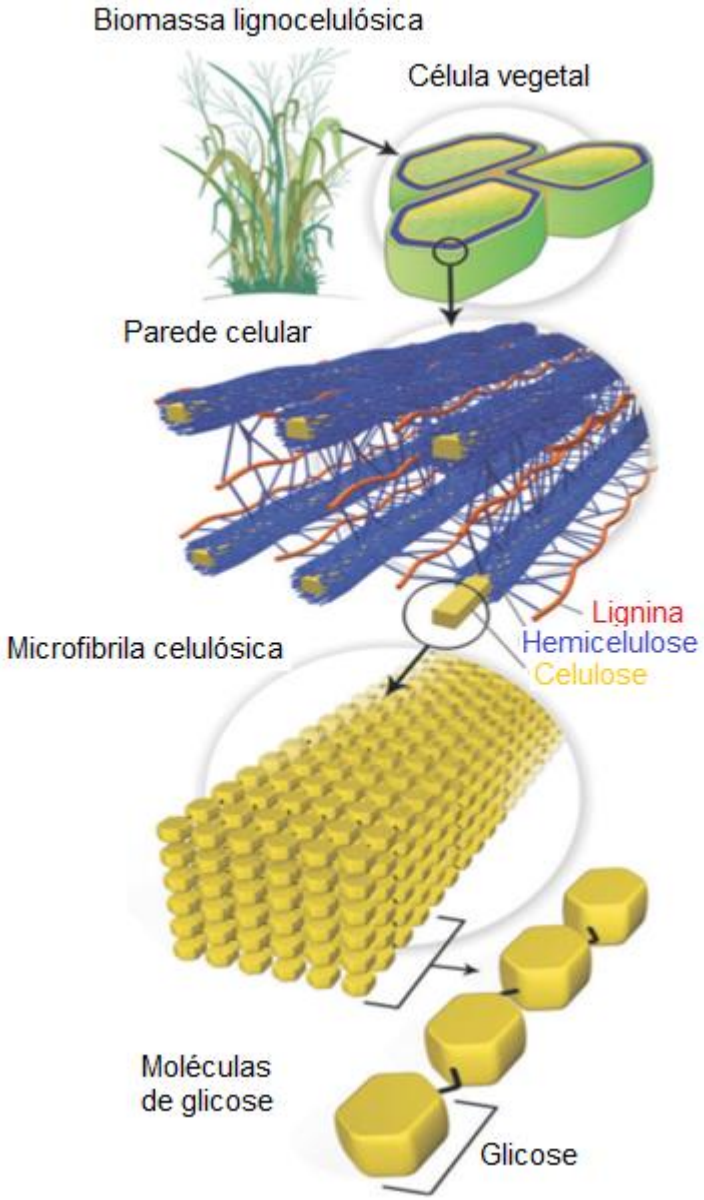


Figura 35. Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica (Fonte: KONDO, 1997 *apud* SANTOS et al., 2012).

As propriedades dos derivados imobilizados obtidos também são influenciadas pelo procedimento de imobilização utilizado. O uso da ligação covalente, um dos tipos de imobilização estudada nesse trabalho, possui várias vantagens como a ligação forte entre a enzima e o suporte; a fácil interação enzima/substrato devido à localização superficial do catalisador; o aumento da termoestabilidade em decorrência da forte interação com o suporte; o aumento da estabilidade operacional (por exemplo, resistência às forças de cisalhamento), tornando mais flexível a escolha do reator a ser empregado. O estabelecimento da ligação entre o suporte e a enzima se dará entre os grupos reativos existentes no suporte e os grupos dos resíduos de aminoácidos localizados na estrutura protéica, de preferência, em posições que não estão envolvidas na catálise. Os principais grupos dos resíduos de aminoácidos são o ε-amino da lisina, a sulfidrila da cisteína, a β-carboxila do ácido aspártico, o γ-carbonil do ácido glutâmico, a hidroxila da tirosina e as hidroxilas da serina e treonina (ADLERCREUTZ, 1993). Os grupos amino, carboxil e hidroxil são alvos preferenciais, devido ser abundantes nas proteínas em geral.

Um dos compostos químicos amplamente utilizado para a imobilização de enzimas é o glutaraldeído, uma vez que este reage com as proteínas sob condições amenas de pH e temperatura. O glutaraldeído atua modificando os grupos amino primários das proteínas, embora possa eventualmente reagir com outros grupos como tióis, fenóis, e imidazoles (MIGNEAULT et al., 2004; WALT; AGAYN, 1994). O glutaraldeído é um reagente que pode formar ligações cruzadas intermolecularmente com as moléculas de enzima imobilizada em qualquer tipo de suporte, principalmente, se as moléculas de enzima estão intimamente unidas (RODRIGUES et al., 2011; BARBOSA et al., 2012). No entanto, na maioria dos casos, o glutaraldeído é usado para imobilizar enzimas em suportes contendo grupos amino primários.

Existem duas estratégias diferentes na utilização de um agente ligante, por exemplo, o próprio glutaraldeído, para um eficiente processo de imobilização. A primeira é a de absorver a enzima por troca iônica em um suporte aminado, e em seguida tratar este sistema com o agente ligante sob condições suaves, para ativar todos os grupos amino primários do suporte e da enzima com apenas uma molécula de glutaraldeído, e desse modo obter a reticulação entre a enzima e o suporte. Em

alguns casos, isto pode permitir uma alta intensidade de multi-interações entre a enzima e suporte, como por exemplo: enzima-amino-glutaraldeído/suporte-amino-glutaraldeído. Além disso, como a molécula inteira de enzima é modificada com o agente ligante, reticulações inter e intramoleculares não podem ser descartadas, o que podem produzir um aumento na rigidez da enzima (WONG; WONG, 1992; RODRIGUES et al., 2011). Em alguns casos esta modificação completa da superfície da enzima pode ter um impacto (negativo ou positivo) na estabilidade da enzima e na atividade enzimática, uma vez que todos os grupos amino da superfície da enzima serão modificados. A segunda possibilidade, a que foi empregada nesse trabalho, é a imobilização covalente da enzima em um suporte previamente ativado com o agente ligante. Após a remoção do excesso de ativador, o suporte e a enzima são colocados em contato por um dado tempo, normalmente sob agitação, a fim de que as ligações covalentes entre o suporte e a enzima se estabeleçam.

Para o glutaraldeído, o mecanismo da interação com os suportes ligninocelulósicos não é clara. É um mecanismo complexo uma vez que esses suportes não foram previamente funcionalizados com grupos funcionais reativos, como grupo amino, susceptível à reação com grupos aldeído. De acordo com Walt e Agayn (1994), vários estudos demonstraram que a solução aquosa de glutaraldeído comercial (25 ou 70%) representam misturas complexas, provavelmente devido à oxidação parcial de alguns grupos aldeído formando ácidos carboxílicos. Na realidade, soluções aquosas de glutaraldeído são complexos em equilíbrio, que incluem além do glutaraldeído livre, estruturas mono e diidratadas, hemiacetais e vários polímeros α e β-insaturados. Como consequência, a purificação do reagente antes do seu uso, por processos de destilação ou tratamento por carvão ativado, não garante que materiais com características constantes possam ser obtidos com seu uso. Sob estas condições, o glutaraldeído pode causar ligações inespecíficas diferentes daquelas esperadas, principalmente após interação com materiais ligninocelulósicos (PEREZ et al., 2007).

Por outro lado, sob certas condições, a ativação química do suporte com glutaraldeído causa rapidamente uma condensação aldólica intramolecular do glutaraldeído. Isso resulta em um aldeído oligomérico insaturado no qual os grupos aldeído internos existem em conjugação com carbonos de ligações duplas, locais onde as bases de Schiff podem ser formadas (PEREZ et al., 2007). Se o

glutaraldeído, de um lado interage com o suporte, por outro reage com os grupos amino da lipase, o que resulta em uma imina estabilizada (Figura 36).

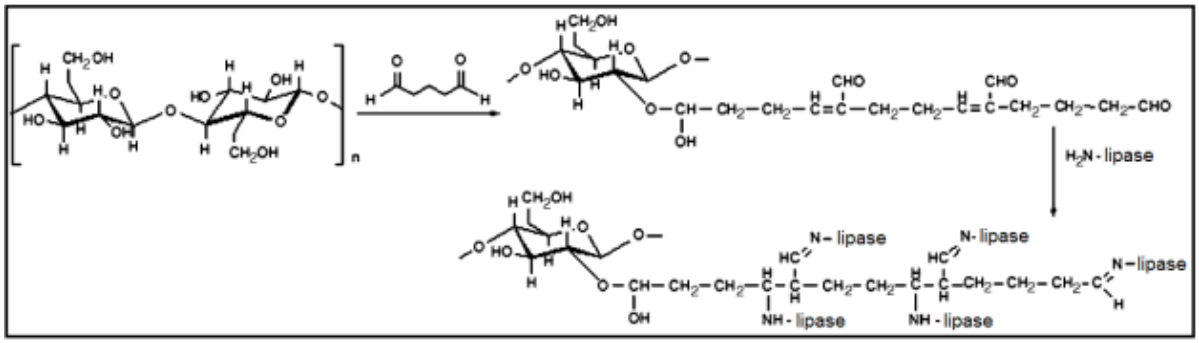


Figura 36. Possível mecanismo de reação entre os suportes ligninolíticos e o glutaraldeído (Fonte: PEREZ et al., 2007).

Outro ponto de vista que deve ser ressaltado é o fato de dímeros de glutaraldeído conferir alguma hidrofobicidade na superfície do suporte, o que pode afetar a imobilização das enzimas. De fato, tem sido mostrado que na maioria dos casos, a adsorção da enzima em suportes ativados com glutaraldeído, em uma baixa força iônica, é muito mais rápida do que a ligação covalente (BETANCOR et al., 2006). Em outras palavras, quando coloca-se o suporte em uma solução contendo o glutaraldeído, forma-se uma camada do agente ligante sobre o suporte transformando-o em um trocador iônico. Lipase são enzimas que apresentam alta afinidade por suportes hidrofóbicos sendo os óleos seus substratos naturais. Isto é uma consequência do mecanismo catalítico de lipases, projetado para atuar na interface óleo/água, a chamada ativação interfacial (VERGER, 1997, BRZOZOWSKI et al., 1991). Isto envolve o movimento de uma cadeia polipeptídica, que funciona como uma tampa que pode isolar o centro ativo do meio. Os arredores do centro ativo da lipase e a face interna da tampa são hidrofóbicos, e após o movimento da tampa a lipase é adsorvida sobre a interface (VERGER, 1997). Assim, a natureza hidrofóbica do glutaraldeído pode permitir a adsorção de lipases através deste mecanismo, antes que a ligação covalente possa ocorrer. Além disso, a superfície hidrofóbica do suporte pode ocasionar uma super-ativação na atividade da enzima, fazendo com que os valores de retenção da atividade após a imobilização sejam maiores (superiores a 100%) do que o valor da atividade inicial.

É importante ressaltar que mesmo que a característica hidrofóbica do glutaraldeído favoreça inicialmente o processo de adsorção, isso não exclui a possibilidade de uma posterior ocorrência de ligações covalentes entre a enzima

adsorvida e o suporte ativado. Segundo Barbosa e colaboradores (2012), o meio no qual acontece a imobilização pode influenciar a forma de ligação da enzima como o suporte. Estes pesquisadores evidenciaram processos de imobilização de lipases usando glutaraldeído nas seguintes situações:

- Alta concentração iônica: adsorção iônica é evitada e enzima é adsorvida via ativação interfacial;
- Presença de detergente não-iônicos (ex: Triton X-100): enzima torna-se iônicamente adsorvida no suporte ativado;
- Presença de sal e detergentes: ligação covalente é primeiramente formada;
- Ausência de alta concentração iônica e detergente: ocorrência de uma mistura de todas as possibilidades de imobilização supracitadas.

Neste trabalho usou-se a última situação, ou seja, vários tipos de imobilização podem coexistir. Isso pode explicar a eficácia na retenção da atividade enzimática e as diferenças nas propriedades bioquímicas e cinéticas se comparado aos outros agentes de ligação. Ao mesmo tempo, isso pode dificultar uma análise mais aprofundada do mecanismo de interação entre a enzima e suporte.

Com o uso do metaperiodato de sódio o modo de interação da enzima com o suporte ocorre de maneira diferente. Ocorre a oxidação dos carbonos adjacentes nas moléculas de glicose da celulose por exemplo, o que resulta na formação de grupos aldeídos. Em seguida, o dialdeído reage com um composto diamino e cria-se assim, a Base de Schiff. Na última etapa, o suporte ativado é embebido na solução enzimática e outra Base de Schiff é formada, entre o grupamento aldeído do suporte com algum grupamento amino livre da enzima (Figura 37). O uso de ativação de polissacarídeos por meio do periodato não é novo e foi inicialmente usado na ativação de sephadex em preparações imunoadsorventes (WILSON; NAKANE, 1976).

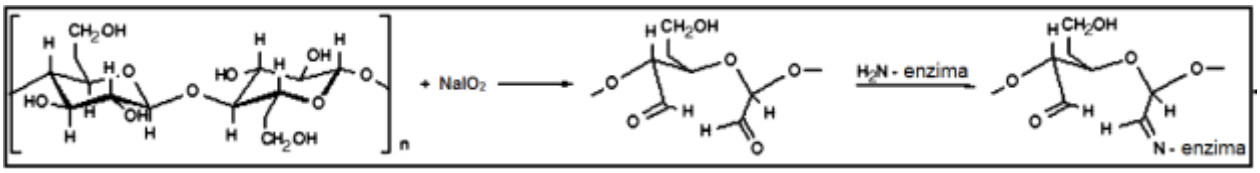


Figura 37. Ligação covalente da enzima com suporte quimicamente modificado com metaperiodato de sódio (Fonte: PEREZ et al., 2007).

O terceiro agente ligante utilizado nesse trabalho, a epicloridrina, reage preferencialmente com grupos hidroxilas do suporte. Esse agente ligante pode fazer reticulações com o suporte ou interagir com resíduos contendo hidroxila da enzima, funcionando como uma ponte. A Figura 38 apresenta um dos possíveis mecanismos de ligação da epicloridrina com o suporte.

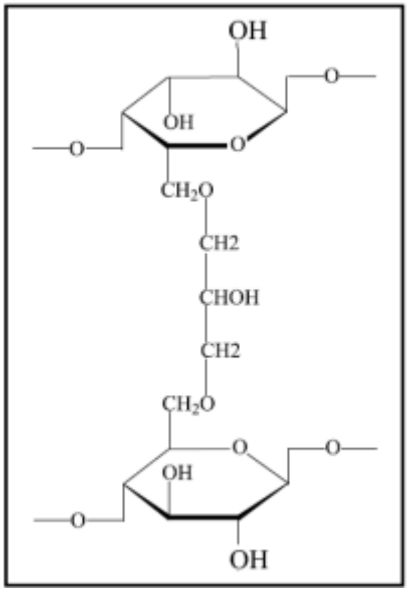


Figura 38. Mecanismo de reticulação do suporte ativado com epicloridrina (Fonte: MENDES et al, 2011).

Fica evidente a dificuldade de um estudo aprofundado da química de imobilização neste trabalho devido, principalmente, a fatores como a complexidade dos suportes utilizados (subprodutos agroindustriais) e da imobilização ocorrer na maioria com extrato bruto. Através do levantamento bibliográfico realizado neste trabalho, constatou-se que apenas 10% dos trabalhos se aprofundam na natureza da ligação da enzima ao suporte. Absolutamente todos esses trabalhos foram realizados com enzima purificada e suportes com composição química bem definida o que permite uma discussão cientificamente fundamentada sobre o fenômeno da imobilização. Entretanto, mesmo diante desses problemas realizou-se uma análise qualitativa das modificações nos suportes após a ativação com os agentes ligantes através de espectrometria de infravermelho (FTIR). As Figuras 39 e 40 apresentam os espectros obtidos dos principais suportes utilizados na imobilização.

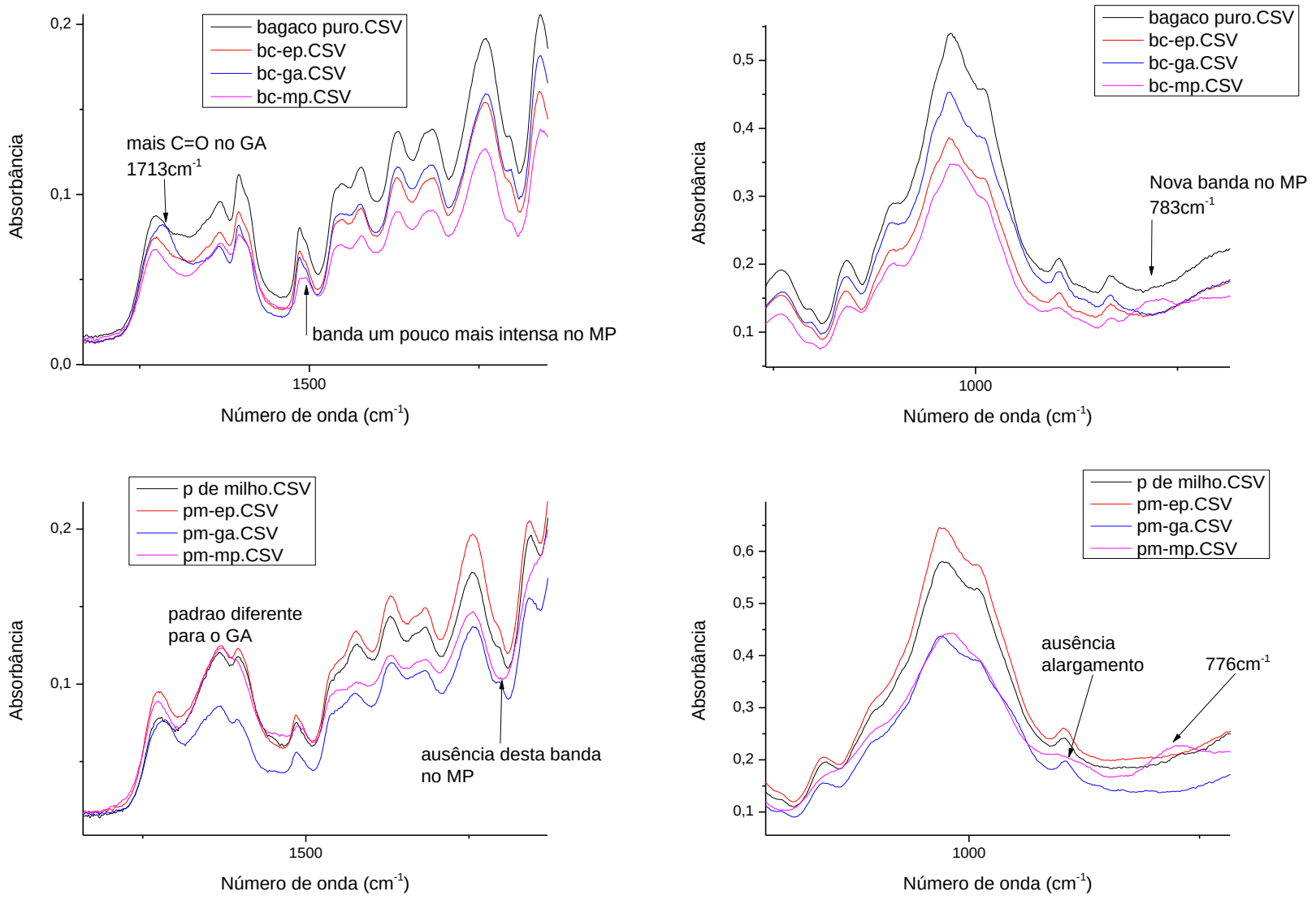


Figura 39. Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) dos suportes puros e pré-ativados: bc: bagaço de cana; pm: palha de milho; ep: epicloridrina; ga: glutaraldeído; mp: metaperiodato de sódio.

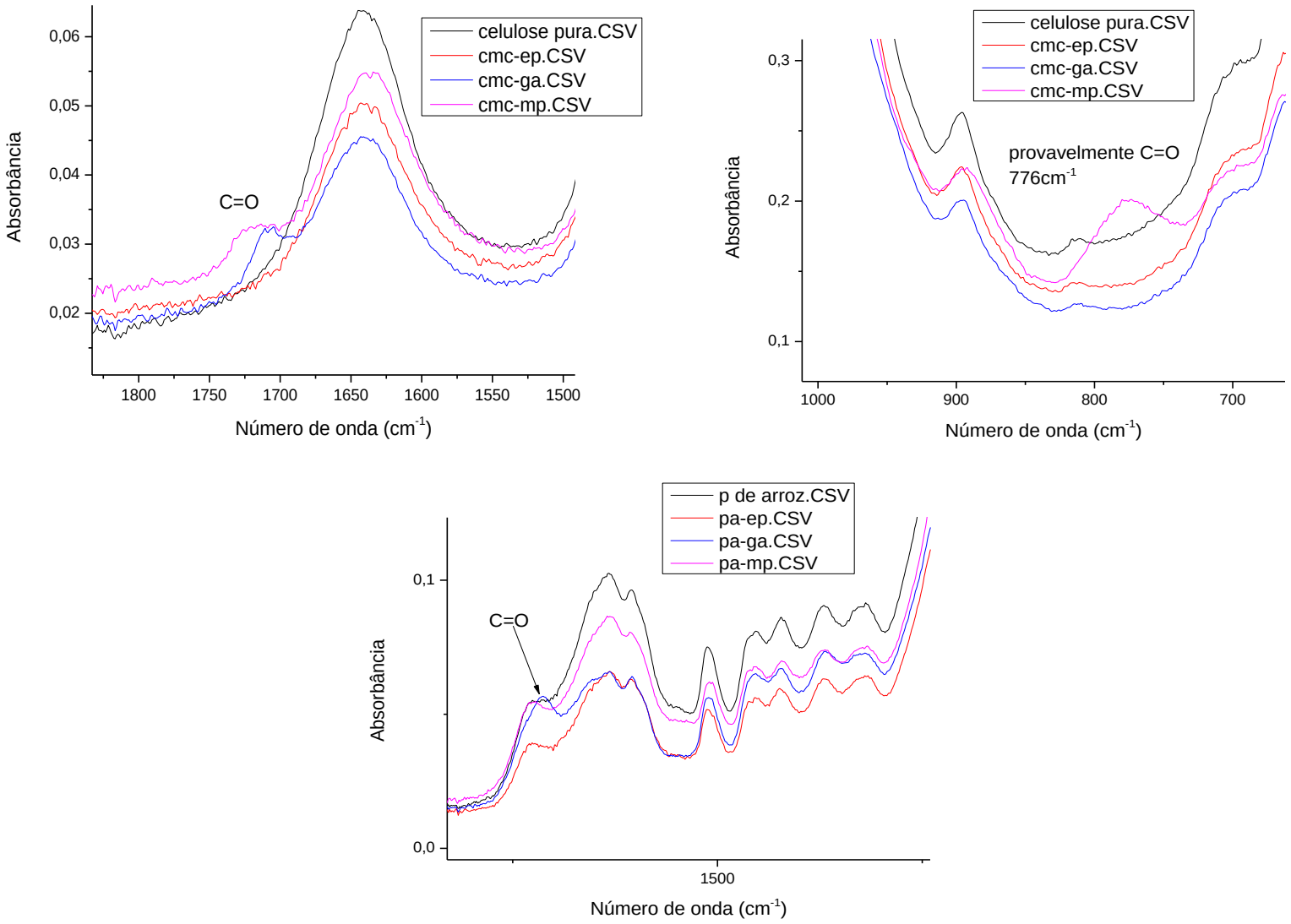


Figura 40. Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) dos suportes puros e pré-ativados: cmc: celulose microcristalina; pa: casca de arroz; epicloridrina; ga: glutaraldeído; mp: metaperiodato de sódio.

Através da análise desses espectros pode-se inferir que houve modificações na estrutura dos suportes após a ativação com os agentes ligantes. O surgimento de novas bandas ou desaparecimento de bandas originais pode ser atribuído à deformação axial dos grupos carbonilas e hidroxilas, sugerindo que os grupos funcionais dos agentes ligantes foram efetivamente inseridos nos suportes. Por exemplo, o metaperiodato de sódio causou modificações visíveis em quase todos os suportes ativados. O aparecimento de novas bandas (C=O) pode ser devido a formação de grupos aldeídos sobre efetiva oxidação de grupos diols presentes no suporte puro por esse agente oxidante. Em teoria, o tratamento dos suportes ligninocelulósicos com periodato leva a oxidação dos carbonos adjacentes nas moléculas de glicose da celulose, que resulta na formação de grupos aldeídos. Em seguida, uma Base de Schiff é formada entre o grupamento aldeído livre com algum grupamento amino livre da enzima.

Pelas informações apresentadas na discussão acima, percebe-se que cada agente ligante interage de forma diferenciada com os suportes. Esse modo particular de interação certamente é uma das causas responsáveis pelas diferenças entre as características dos derivados imobilizados obtidos.

Uma das principais propriedades susceptível à essas diferenças é a atividade catalítica da enzima, seja na retenção da atividade após o processo de imobilização ou durante o período de armazenamento (estabilidade). Levando em consideração os valores de retenção da atividade enzimática e a estabilidade a longo prazo, pode-se afirmar que os agentes ligantes aqui utilizados foram viáveis para a imobilização covalente da enzima estudada. Somando a isso, tem-se o fato da natureza diferenciada do sítio ativo das lipases, o qual muitas vezes é coberto pela tampa hidrofóbica, o qual tem seu mecanismo de abertura/fechamento influenciado pelo processo de imobilização. Esta flexibilidade do centro ativo das lipases faz com que suas propriedades funcionais (atividade, seletividade, especificidade) possam ser facilmente moduladas por meio de diversas técnicas, sendo a imobilização uma das mais promissoras. Como extensivamente mostrado na literatura, qualquer protocolo de imobilização da lipase muito provavelmente trará efeitos positivos ou negativos sobre suas propriedades (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011a; MATEO et al., 2007; GARCIA-GALAN et al., 2011). Desta forma, se uma biblioteca suficientemente grande de biocatalisadores imobilizados for preparada por meio de

diferentes protocolos de imobilização, é muito provável que tenha alguma preparação com boa seletividade contra um determinado substrato.

Por fim, além da influência do tipo de suporte, da enzima e do método de imobilização, que são variáveis importantíssimas para garantir o sucesso do biocatalisador produzido, foi introduzido nesse trabalho diferentes maneiras de desidratar o sistema enzima-suporte. A influência da secagem no processo de imobilização foi evidenciada principalmente pelas diferenças na retenção da atividade enzimática. Os equipamentos de secagem usados, apresentando suas peculiaridades durante o processo de desidratação, mostraram-se viáveis no que se refere ao conteúdo de água do produto final. A secagem em leito de jorro revelou-se como uma excelente alternativa para secagem da enzima imobilizada, uma vez que proporcionou a obtenção de um alto rendimento do produto. Além disso, na maioria dos suportes utilizados a atividade enzimática foi superior comparada com aquela provinda da enzima na forma livre.

5.6 Suporte: quitosana

A lipase produzida a partir da fermentação submersa do fungo endofítico *C. kikuchii* também foi utilizada para avaliação do processo de imobilização usando como suporte o biopolímero quitosana através dos métodos de adsorção, ligação covalente e encapsulação. Além disso, também foram avaliados diferentes métodos de secagem (estufa, liofilizador e leito fluidizado) para obtenção e avaliação da estabilidade do produto final. A seguir serão apresentados os resultados do delineamento experimental realizado nessa etapa.

A Tabela 29 apresenta os resultados do processo de imobilização das lipases pelos métodos de secagem por estufa e por liofilização. A imobilização utilizando o método de ligação covalente, através do uso de glutaraldeído (1,5% v/v) como agente ligante, apresentou os melhores resultados quanto ao rendimento de imobilização e retenção da atividade enzimática para os dois processos de secagem utilizados. Na secagem por estufa, a eficiência de imobilização foi de 61,8% enquanto que a retenção da atividade enzimática foi de 68,6%. O processo de imobilização covalente e secagem por liofilização mostrou resultados ainda mais promissores, com eficiência de imobilização de 84,4% e retenção da atividade

superior a 80,0% (houve diferença estatística ($p<0,05$), quando utilizou-se a liofilização comparando-se ao uso da estufa como equipamento de secagem – Tabela A10). Nesta condição ainda houve a retenção de 66,6% da atividade enzimática após 5 ciclos de reação.

Os dois processos de secagem foram viáveis quando se analisa o conteúdo de água do produto final. A umidade do produto obtido pelo método de estufa apresentou valor médio de 6,5% enquanto que a atividade de água teve média de 0,33. As amostras obtidas através da liofilização tiveram umidade média de 8,0% e atividade de água com média de 0,29. Esses valores são adequados para garantir a estabilidade da enzima a longo prazo e consequentemente manter a atividade enzimática.

Tabela 29. Resultados do processo de imobilização em microesferas de acetato de quitosana da lipase do fungo *C. kikuchii*: secagem em estufa e por liofilização.

Secador	EI (%)	R_{AE} (%)	Umidade (%)	A_w (-)
		Adsorção		
Estufa	54,0	53,73 ± 0,60	6,9 ± 0,25	0,31 ± 0,04
Liofilizador	62,6	74,17 ± 0,85	8,7 ± 0,85	0,23 ± 0,08
		Ligação Covalente		
Estufa	61,8	68,60 ± 0,46	6,1 ± 0,20	0,35 ± 0,01
Liofilizador	84,4	81,33 ± 0,83	7,5 ± 0,73	0,24 ± 0,02

EI: Eficiência da imobilização; R_{AE}: Retenção da atividade enzimática; A_w: atividade de água

Durante o processo de secagem por liofilização, a perda de água ocorre em um tempo maior do que na secagem por estufa. Devido à etapa de congelamento, as partículas obtidas por liofilização preservam o tamanho original das mesmas resultando em tamanhos maiores e estrutura mais porosa. No método de secagem por estufa de circulação as partículas ficam menores e mais compactas. Essas diferenças afetam diretamente a capacidade de carreamento do suporte evidenciado pelos valores de eficiência de imobilização. No suporte obtido por liofilização a capacidade de carreamento (eficiência de imobilização) foi 22,6% superior ao valor obtido por aquele seco em estufa, o que afetou diretamente na atividade enzimática do produto obtido.

Foram realizados os testes de estabilidade e retenção da atividade enzimática após os ciclos de reação para os derivados obtidos (Tabela 30). O tipo de imobilização e o método de secagem usados influenciaram nas respostas analisadas. A estabilidade dos derivados obtidos por ligação covalente foi maior do que aqueles obtidos por adsorção. Como era de se esperar, a ligação covalente também favoreceu na retenção da atividade enzimática após cinco ciclos de reação. Para a amostra seca em estufa a retenção da atividade foi de quase 55,0% enquanto que a obtida após a liofilização manteve 66,6% da atividade inicial.

Tabela 30. Retenção da atividade enzimática das lipases imobilizadas em quitosana e no período de armazenamento durante 6 meses a 5°C e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato.

Tipos de Imobilização	R_{AE} – 6 meses (%)	R_{AE} – 5 ciclos (%)
Secagem por estufa		
Adsorção	44,6 ± 1,65	31,6 ± 0,45
Ligação Covalente	64,5 ± 0,39	54,6 ± 0,86
Secagem por liofilizador		
Adsorção	48,6 ± 0,85	44,6 ± 0,65
Ligação Covalente	70,3 ± 0,49	66,6 ± 0,29
Enzima em solução aquosa		
-	14,2 ± 0,84	-

R_{AE}: Retenção da atividade enzimática.

A análise morfológica das partículas foi realizada para os derivados imobilizados obtidos através da imobilização por ligação covalente utilizando os dois processos de secagem (estufa e liofilizador). Como apresentado na Tabela 29, os valores para a retenção da atividade enzimática utilizando os processos de secagem por estufa e liofilização, foram bem distintos. A diferença nesses valores pode estar relacionada, entre outros fatores, com a morfologia final do suporte. A superfície da partícula quando se utilizou a liofilização como método de secagem apresentou sulcos e/ou poros, dando um aspecto murcho às esferas (Figura 41). No caso do uso da estufa as partículas apresentaram uma superfície lisa e forma arredondada (Figura 42). O tamanho das partículas obtido por liofilização apresentou diâmetro em torno de 1,2 mm enquanto que aquelas obtidas por secagem em estufa apresentou diâmetro médio de 0,6 mm.

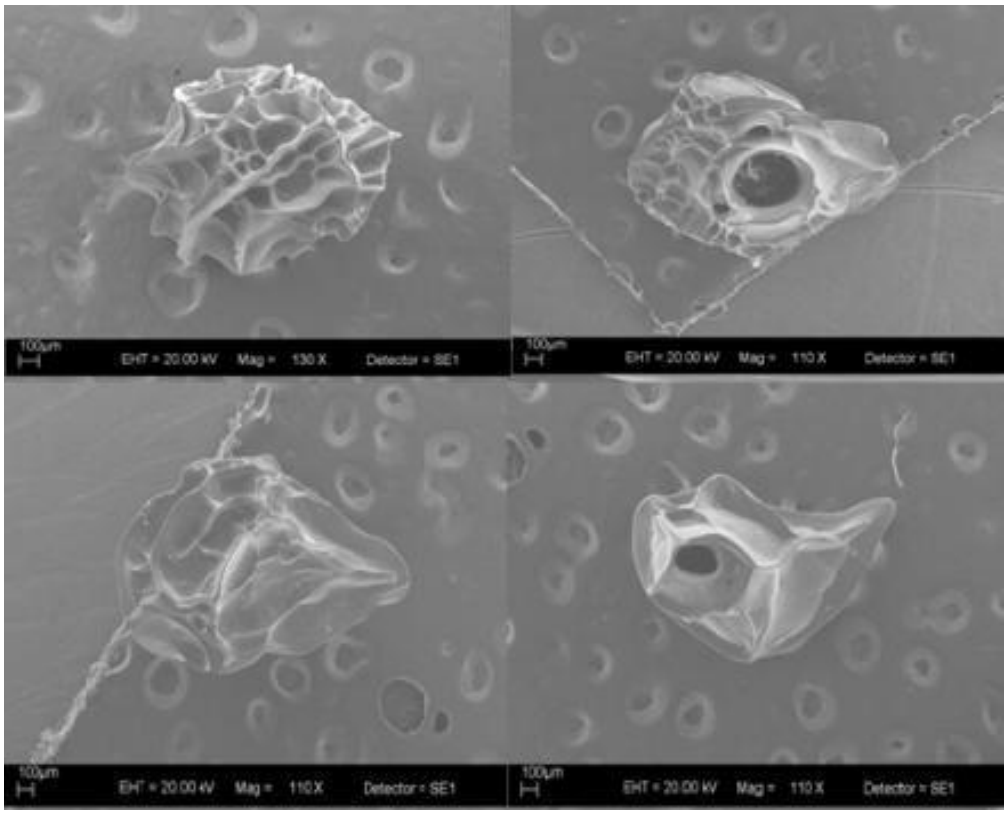


Figura 41. Fotomicrografias do sistema enzima-suporte obtido através do processo de secagem por liofilização.

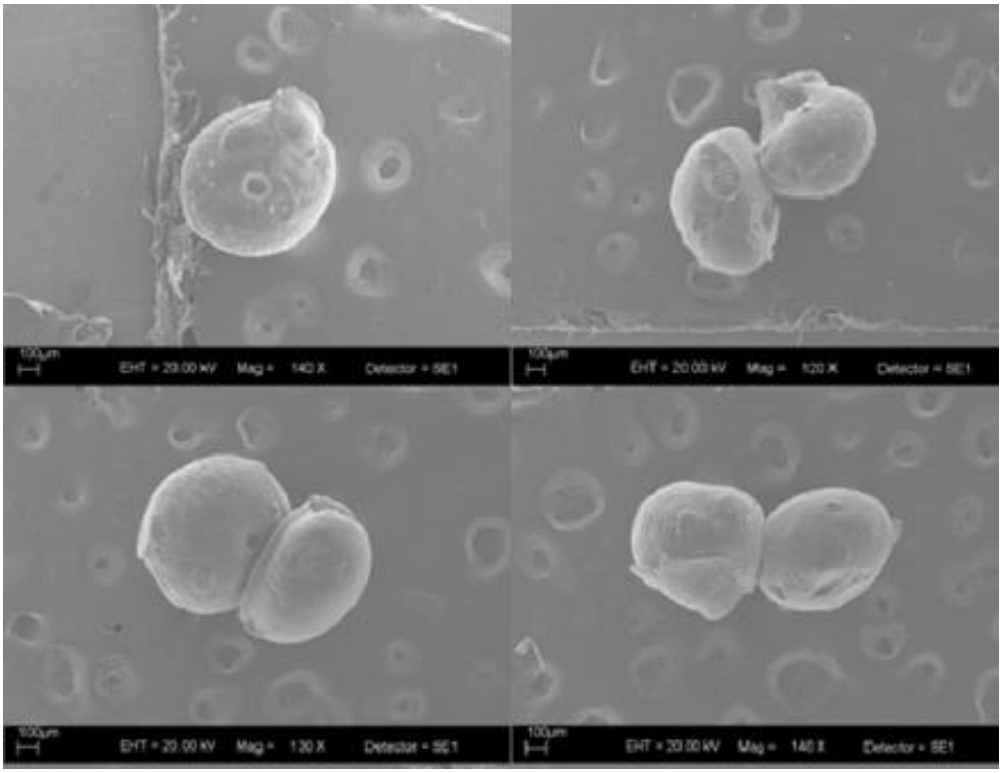


Figura 42. Fotomicrografias do sistema enzima-suporte obtido através do processo de secagem por estufa.

A eficiência do método de imobilização em relação à incorporação de lipase no suporte ativado também foi avaliada por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). A Figura 43 mostra um conjunto de espectros da lipase livre, suporte pré-ativado e derivado imobilizado produzido. A banda característica da lipase livre claramente apareceu na banda 1341 cm^{-1} o que é observado também para o derivado imobilizado (suporte + lipase), sugerindo a fixação da enzima no suporte após o processo de imobilização.

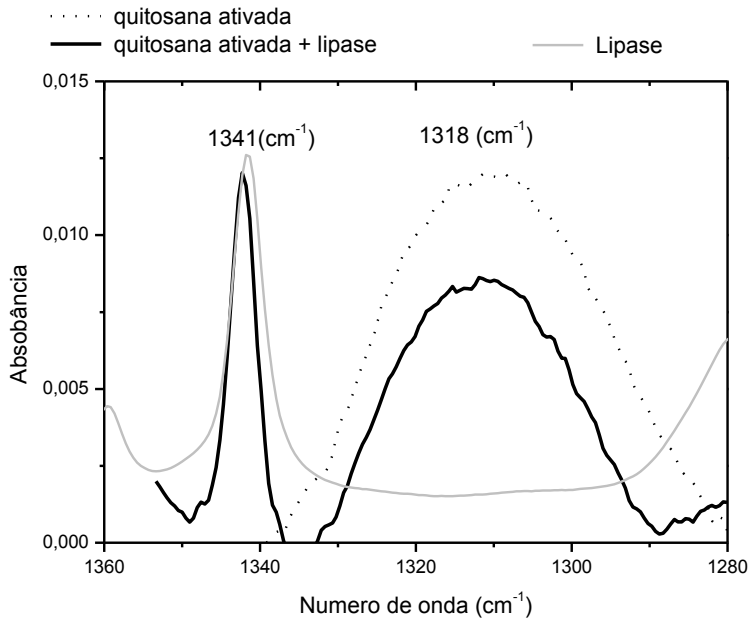


Figura 43. Espectrometria de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para lipase livre, suporte pré-ativado e derivado imobilizado obtido.

O uso leito fluidizado foi o terceiro método de secagem avaliado para obtenção da enzima imobilizada em quitosana. Além disso, o método de imobilização avaliado foi o de ligação covalente e os agentes ligantes foram o glutaraldeído, epicloridrina e metaperiodato de sódio. A concentração de agente ligante utilizado foi de 1,5% (v/v).

A Tabela 31 apresenta os resultados para retenção da atividade enzimática após a secagem e após os ciclos de reação, assim como o conteúdo de água das amostras. A secagem e imobilização utilizando leito fluidizado mostrou-se a mais vantajosa dentre todas as outras, pois apresentou os melhores índices de retenção de atividade enzimática, além de proporcionar uma economia de tempo e recursos, uma vez que a imobilização da enzima e a secagem deste complexo ocorrem

simultaneamente. Além destas vantagens listadas, o leito fluidizado assegura recobrimento uniforme da superfície do suporte, uma vez que facilita a mistura entre sólidos e líquidos e permite a circulação das partículas no interior do sistema.

A utilização do glutaraldeído e leito fluidizado forneceu os melhores resultados para todas as respostas analisadas, principalmente para a retenção da atividade enzimática que apresentou diferença estatística ($p<0,05$) comparado aos valores obtidos com o uso dos demais agentes ligantes e secadores utilizados (Tabelas A11 e A12). Esta vantagem apresentada pelo glutaraldeído se deve à sua capacidade de reagir com os grupos amino da quitosana, formando com esta uma rede polimérica que aprisiona a enzima. Com a utilização dos demais agentes ligantes a retenção da atividade variou de 60,0 a 71,9%. O conteúdo de água também apresentou valores viáveis para auxiliar na estabilização da enzima. A umidade média do produto foi 6,01% enquanto que a atividade de água teve média de 0,12.

Tabela 31. Resultados da imobilização e secagem do sistema enzima-suporte utilizando o leito fluidizado.

Agente ligante	T_{gs} (°C)	T_{gi} (°C)	R_{AE} (%)	Ciclos 5 (%)	A_w (-)	Umidade (%)
Glutaraldeído	43,8	42,1	93,87±0,85	65,5±1,07	0,08±0,07	5,74±1,13
Metaperiodato	42,7	41,5	71,97±0,50	56,2±0,97	0,14±0,06	6,23±1,07
Epicloridrina	43,1	42,5	60,60±0,36	51,2±0,87	0,14±0,04	6,08±0,77

Tg_S: Temperatura de saída; T_{gi}: Temperatura interna; R_{AE}: Retenção da atividade enzimática; A_w: atividade de água

Os derivados imobilizados obtidos pelo uso do glutaraldeído como agente ligante foram usados nos ensaios de caracterização, uma vez que os mesmos apresentaram maiores valores para a retenção da atividade enzimática.

Para analisar a incorporação da enzima nos suportes realizou-se a análise elemental da superfície da quitosana pura e ativada com glutaraldeído assim como do derivado imobilizado obtido (quitosana+enzima). A Tabela 32 apresenta o conteúdo de CHN das amostras analisadas. Mais uma vez a presença da enzima no suporte foi comprovada pelo aumento da porcentagem dos elementos analisados, principalmente o nitrogênio que é o elemento chave para enzimas. Com a

imobilização houve um aumento de 30,6% de nitrogênio na superfície do suporte ativado confirmando a presença da enzima no produto.

Tabela 32. Resultado da análise elemental realizada para quitosana pura, quitosana ativada e para os derivados imobilizados obtidos pelo uso do glutaraldeído (1,5% v/v) como agente ligante e leito fluidizado como equipamento de imobilização e secagem.

Amostra	Carbono (% m/m)	Hidrogênio (% m/m)	Nitrogênio (% m/m)
Quitosana pura	35,0±1,0	6,6±0,1	3,3±0,1
Quitosana ativada	42,1±0,1	5,8±0,3	4,9±0,1
Quitosana + lipase	44,5±0,2	7,7±0,5	6,4±0,2

A análise morfológica dos derivados imobilizados obtidos revelou uma superfície lisa e na forma de esferas (Figura 44). Isso se deve ao fato de que as esferas de acetato de quitosana utilizadas como partículas sementes no processo de imobilização e secagem em leito fluidizado foram obtidas através do método de coacervação por inversão de fases seguida da secagem em estufa. Como relatado anteriormente, isso confere um formato mais definido e menos poroso do que quando se utilizou a liofilização como processo de secagem.

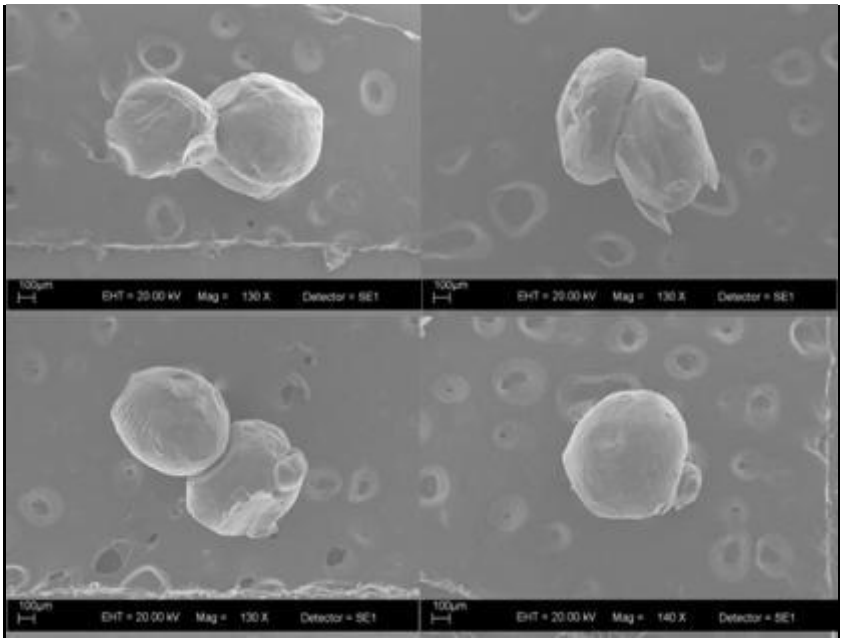


Figura 44. Fotomicrografias do sistema enzima-suporte obtido através do processo de imobilização e secagem em leito fluidizado.

Também realizou-se a análise de infravermelho por transformada de Fourier da lipase livre, suporte ativado com glutaraldeído e do derivado imobilizado obtido após secagem em leito fluidizado (Figura 45). Os resultados obtidos mostram que a banda característica da enzima livre está presente no espectro do sistema enzima-suporte, evidenciando a eficiência do processo de imobilização.

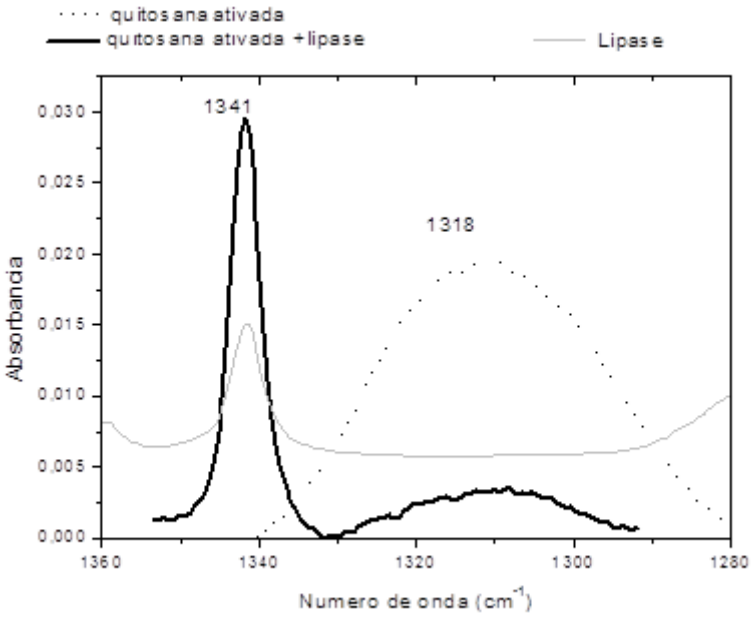


Figura 45. Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para lipase livre, suporte pré-ativado com glutaraldeído e derivado imobilizado obtido após secagem em leito fluidizado.

As constantes de afinidade pelo substrato (K_m) e a velocidade máxima de reação (V_{max}) também foram determinadas para os derivados obtidos (Tabela 33). Para a utilização dos três agentes ligantes, os derivados imobilizados apresentaram valores de K_m maiores do que para a enzima livre. Isso indica que, mediante imobilização, a afinidade da lipase pelo substrato foi reduzida e esse comportamento pode esta relacionado à menor transferência de massa do meio reacional para o sistema imobilizado. Sabe-se que o processo de imobilização reduz a difusão do substrato nos interstícios do suporte (ZANIN et al., 2004). Este é um perfil típico dos sistemas imobilizados, tendo em vista que a enzima livre exerce sua atividade catalítica em um meio homogêneo, enquanto a enzima imobilizada em um suporte sólido deve agir em um meio heterogêneo (ZANIN et al., 2004). Desta forma, o decréscimo da atividade das enzimas imobilizadas pode ser normalmente atribuído

às mudanças conformacionais na sua estrutura terciária ou aos impedimentos estéricos que resultam na dificuldade de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (GOMES et al., 2006). Alguns estudos apontam para uma redução nos valores de K_m para a lipase imobilizada da ordem de 50% em relação ao valor determinado para a lipase em sua forma livre (BALCÃO et al., 1996).

O efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática também foi avaliado para os derivados obtidos com o uso da quitosana como suporte. A influência do processo de imobilização nas propriedades bioquímicas da lipase imobilizada na quitosana foi similar quando se utilizou os subprodutos agrícolas como suporte. Houve um deslocamento do pH ótimo para uma faixa mais alcalina, assim como uma aumento no valor da temperatura máxima de atuação da lipase. Como mostrado na Tabela 34 houve uma proteção maior na estrutura da enzima, quando essa foi imobilizada, visto que houve uma maior retenção da atividade enzimática na determinação de sua termoestabilidade.

Tabela 33. Parâmetros bioquímicos e cinéticos da lipase livre e imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, epicloridrina e metaperiodato de sódio.

Suporte	Agente ligante	Temp. ótima °C	pH ótimo	K_m (mM)	V_{max} (µmol/min/mg)
-	Lipase livre	60,0	6,5	0,212	160,3
Quitosana	Glutaraldeído	70,0	7,5	0,221	97,4
	Epicloridrina	70,0	7,5	0,262	110,1
	Metaperiodato	70,0	7,5	0,230	102,2

Tabela 34. Estabilidade à temperatura da atividade enzimática da lipase livre e imobilizada em quitosana utilizando diferentes agentes ligantes.

Agente ligante	Suporte	Termoestabilidade (R_{AE} %)*
-	Lipase livre	50,0 ± 1,23
Quitosana	Glutaraldeído	74,9 ± 1,12
	Epicloridrina	72,3 ± 1,43
	Metaperiodato	78,7 ± 1,17

*R_{AE}: Retenção da atividade enzimática após duas horas de incubação a 80 °C

A quitosana é um heteropolissacarídeo preparado a partir da reação de *N*-desacetilação da quitina, um dos biopolímeros mais abundantes depois da celulose, extraída principalmente de carapaças e exoesqueletos de crustáceos, considerada um subproduto da indústria pesqueira. Este biopolímero possui uma estrutura molecular quimicamente similar à da celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais. Grupos como as hidroxilas (OH) estão presentes na estrutura geral desses biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino (NH_2) na estrutura da quitosana (Figura 46). A versatilidade química da quitosana resulta principalmente da presença dos grupos amino em sua estrutura, os quais oferecem muitas possibilidades de modificações, tais como, *N*-acetilação, *N*-alquilação, *N*-carboxilação, *N*-sulfonação e formação de bases de Schiff com aldeídos e cetonas (KUMAR, 2000; GUIBAL, 2004). Apesar da maioria das modificações químicas da quitosana ocorrer em seus grupos amino, as hidroxilas em C-3 e C-6 das unidades estruturais do biopolímero também são susceptíveis a reações. As modificações químicas nos grupos hidroxila ocorrem preferencialmente naqueles posicionados em C-6, uma vez que os localizados em C-3 são menos reativos e mais estericamente impedidos (KUMAR, 2000).

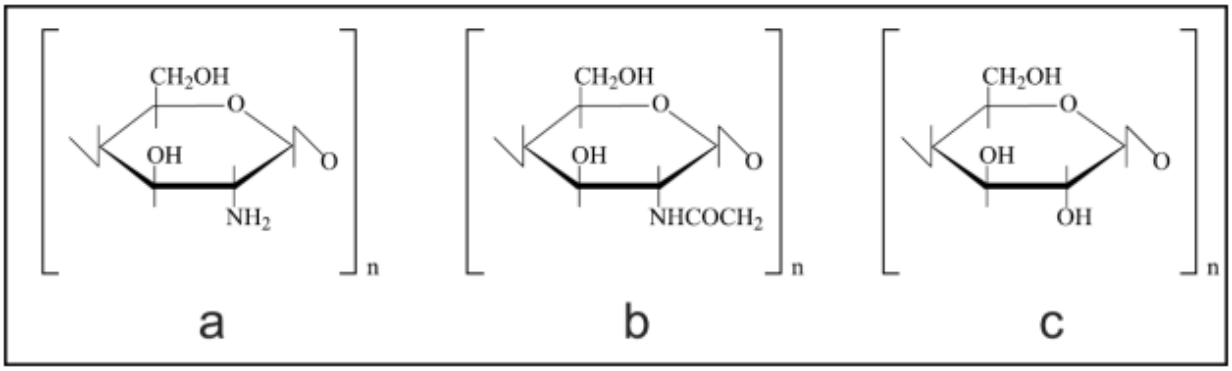


Figura 46. Estrutura dos biopolímeros quitosana (a), quitina (b) e celulose (c) (Fonte: MENDES et al., 2011)

Ao se utilizarem aldeídos bifuncionais, como o glutaraldeído, como agentes de entrecruzamento, a reticulação ocorre via adição nucleofílica da amina da quitosana à carbonila dos agentes. A reação de eliminação subsequente produz as correspondentes aldiminas ou bases de Schiff. Ao se empregar a epicloridrina (haleto de epóxi-alquila) na ativação da quitosana, o processo é iniciado com uma reação de eliminação do haleto, seguida de abertura do epóxido, com consequente formação do entrecruzamento. A epicloridrina então reage apenas com os grupos

hidroxila sob condições alcalinas, mantendo os grupos amino livres. O metaperiodato de sódio também pode ser utilizado para ativação da quitosana pelo processo de oxidação. O esquema de interação de cada agente ligante com o biopolímero de quitosana esta representado na Figura 47. Os agentes ligantes podem formar redes com a quitosana ou fazer a ponte entre o suporte e a enzima.

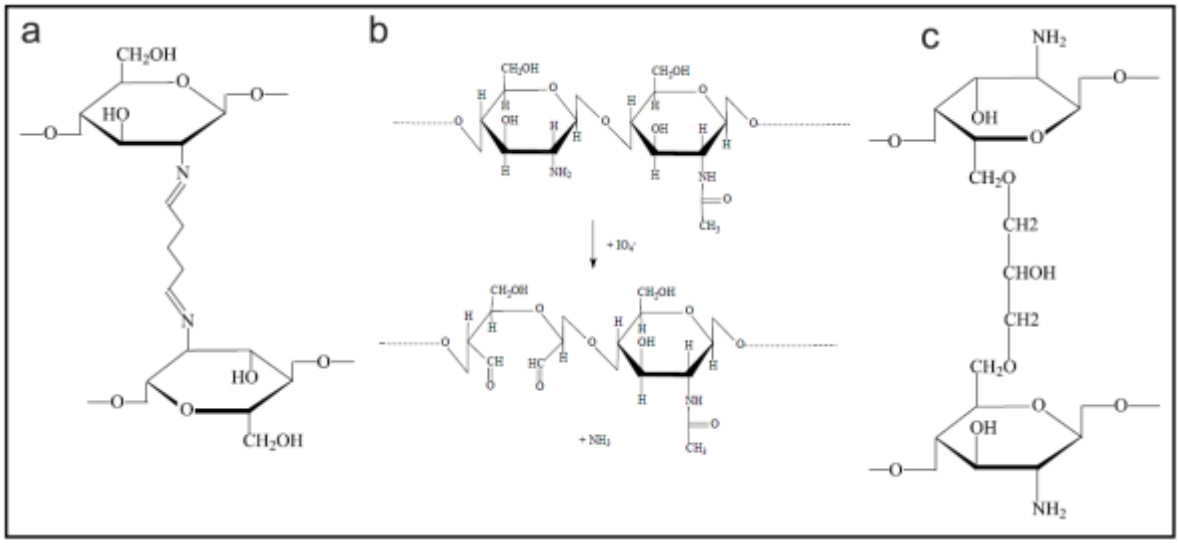


Figura 47. Mecanismos de reticulação e/ou oxidação da quitosana por diferentes agentes ligantes: (a) glutaraldeído, (b) metaperiodato de sódio e (c) epicloridrina (Fonte: MENDES et al., 2011).

Também realizou-se uma análise qualitativa da modificação da quitosana após a ativação pelos agentes ligantes (Figura 48). Mais uma vez percebe-se modificações na estrutura da quitosana pelas diferenças nos espectros (surgimento de novas bandas e/ou desaparecimento de bandas originais).

Todos os resultados obtidos demonstram a importância na escolha do método de secagem e do processo de imobilização, uma vez que estes têm interferência direta na qualidade do produto final, principalmente na retenção da atividade enzimática. A seleção do melhor método de secagem, além de interferir na atividade da enzima, também pode resultar em economia de tempo e energia.

Não há relatos de imobilização de enzimas utilizando microesferas de acetato de quitosana em leito fluidizado como apresentado neste trabalho. A eficiência do processo, comprovado pela alta retenção da atividade enzimática, abre uma grande perspectiva no melhoramento das propriedades das enzimas para que sejam utilizadas de forma viável em escala industrial.

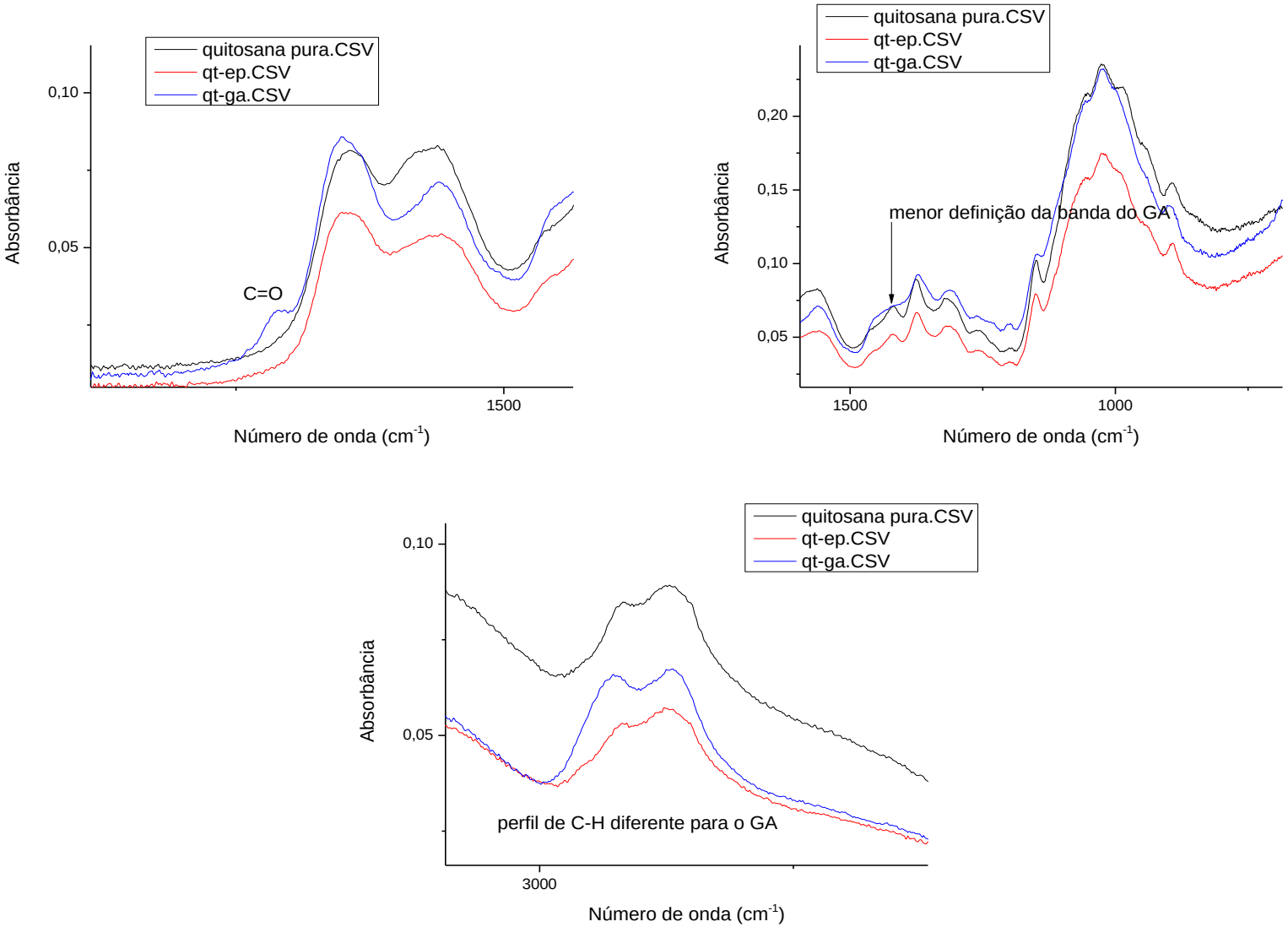


Figura 48. Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) dos suportes puros e pré-ativados: qt: quitosana; ep: epicloridrina; ga: glutaraldeído.

5.6.1 Imobilização por encapsulação: quitosana magnetizada

A escolha da quitosana magnetizada como suporte ocorreu devido a algumas vantagens, dentre elas a facilidade de separação do derivado imobilizado do meio reacional. A Figura 49 mostra o resultado da imobilização da lipase nas partículas de quitosana magnetizada pelo método de “spray dryer” utilizando as formulações A, B e C além das microesferas produzidas pela reticulação utilizando tripolifosfato de sódio (TPP).

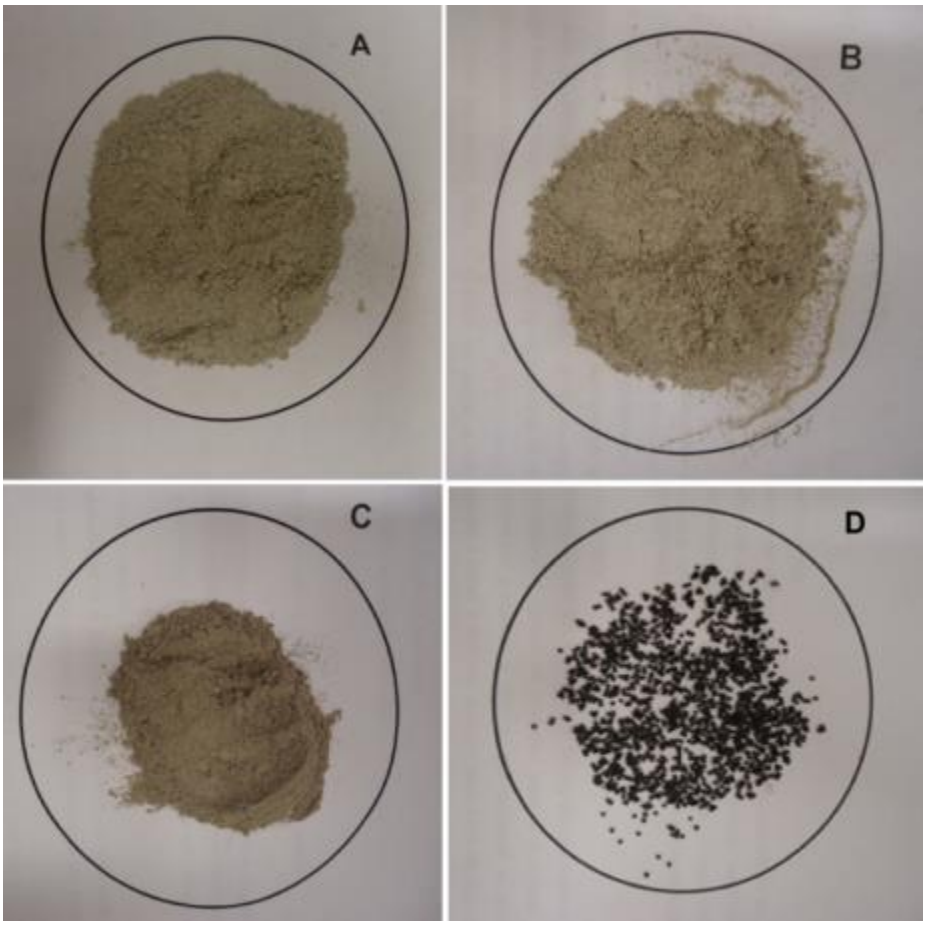


Figura 49. Lipase imobilizada em micropartículas de quitosana magnetizada. A, B e C) Pós produzidos após a secagem por “spray drying”; D) Micropartículas produzidas pela reticulação utilizando tripolifosfato de sódio.

A Tabela 35 mostra os resultados das análises realizadas para as três formulações utilizadas na microencapsulação e secagem em “spray dryer” da lipase em quitosana magnetizada. A formulação A apresentou diferença estatística ($p<0,05$) para os valores de retenção da atividade enzimática para as duas lipases estudadas (produzidas por *C. kikuchii* e *C. rugosa*) frente demais formulações

(Tabelas A13 e A14). Esta formulação, contendo apenas solução de acetato de quitosana magnetizada + lipase, apresentou melhor valor de recuperação do produto após o processo de secagem (53,5%) e também apresentou melhor resultado de retenção da atividade enzimática (85,9%), da atividade de água e de umidade. Entretanto, apesar da formulação C (solução de acetato de quitosana magnetizada + glutaraldeído + lipase) ter apresentado o pior resultado de retenção de atividade enzimática, esta apresentou melhor desempenho na retenção de atividade após 5 ciclos de reação utilizando *p*-NPP como substrato, com o valor de 38,7%. O processo foi adequado uma vez que apresentou valores de umidade entre 5,8 e 6,4% e de atividade de água entre 0,3 e 0,34, os quais são adequados para a estabilidade do produto.

Tabela 35. Resultados da microencapsulação e secagem em "spray dryer" de lipase produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii.*

Spray drying	Formulação A	Formulação B	Formulação C
T_{gs} (°C)	69,0 ± 0,5	70,1 ± 1,3	70,0 ± 0,7
T_{gi} (°C)	55,0 ± 0,9	56,3 ± 0,5	55,3 ± 0,3
R (%)	53,5 ± 1,2	51,4 ± 0,76	47,4 ± 0,54
R_{AE} (%)	85,73 ± 0,67	72,13 ± 0,85	63,53 ± 0,45
A_w (-)	0,30 ± 0,03	0,31 ± 0,06	0,34 ± 0,02
Umidade (%)	5,8 ± 0,5	6,1 ± 1,1	6,4 ± 0,7
5 Ciclos - R_{AE} (%)	25,9 ± 1,1	22 ± 0,8	38,7 ± 1,4

T_{gs}: temperatura de saída; T_{gi}: temperatura interna; R: recuperação; R_{AE}: retenção da atividade enzimática; A_w: atividade de água

Avaliou-se também a imobilização da lipase comercial, produzida pela levedura *C. rugosa*, utilizando as três formulações obtidas para microencapsulação e secagem em "spray dryer". A Tabela 36 mostra os resultados obtidos e é possível observar que, assim como na imobilização da lipase produzida por *C. kikuchii*, a formulação A também apresentou os melhores resultados para a retenção da atividade enzimática. Entretanto, após 5 ciclos reacionais, utilizando *p*-NPP como substrato, a formulação C contendo glutaraldeído novamente apresentou os melhores valores para retenção da atividade enzimática. Isso provavelmente se deve ao fato de que a ligação covalente, proporcionada pelo agente ligante, reteve a enzima no suporte impedindo a dessorção do biocatalizador.

Tabela 36. Resultados da microencapsulação e secagem em "spray dryer" de lipase produzidas pela levedura *Candida rugosa* (sigma).

"Spray drying"	Formulação A	Formulação B	Formulação C
T_{gs} (°C)	72,0±0,2	69,1±1,0	72,0±0,4
R (%)	55,5	53,4	49,4
R_{AE} (%)	92,6±0,8	85,3±1,1	73,1±1,2
A_w (-)	0,25±0,06	0,23±0,05	0,26±0,05
Umidade (%)	4,8±0,3	4,1±0,7	5,0±0,3
5 Ciclos - R_{AE} (%)	30,9±1,3	27,4±0,4	46,7±1,1

T_{gs}: temperatura de saída; R: recuperação; R_{AE}: retenção da atividade enzimática; A_w: atividade de água

Os resultados da microencapsulação das lipases de origem fúngica em acetato de quitosana magnetizada, utilizando tripolifosfato como agente reticulante, estão mostrados na Tabela 37. Observou-se que a retenção da atividade enzimática com o íons (Fe_2O_3) foi muito maior que na ausência destes para ambas as enzimas, desta forma foi escolhido prosseguir apenas com a análise do primeiro suporte. Isso pode ser explicado pelo fato de algumas enzimas serem classificadas como metaloenzimas, as quais têm suas atividades moduladas pela presença de íons (SCHMID e VERGER, 1998).

Tabela 37. Resultados da microencapsulação de lipases de origem fúngica em acetato de quitosana utilizando tripolifosfato como agente reticulante.

"Cross-linking" (TPP)	Lipase	
	Cercospora kikuchii	*Candida rugosa*
Com Fe_2O_3 - R_{AE} (%)	75,60 ± 0,60	85,63 ± 0,60
A_w (-)	0,2 ± 0,02	0,3 ± 0,04
Umidade (%)	3,8 ± 0,8	4,1 ± 1,1
5 Ciclos - R_{AE} (%)	52,8 ± 1,4	57,8 ± 1,2
Sem Fe_2O_3 - R_{AE} (%)	53,57 ± 0,40	54,73 ± 0,55

R_{AE}: retenção da atividade enzimática; A_w: atividade de água.

Dentre os dois métodos de microencapsulação explorados neste trabalho a microencapsulação por "spray drying" apresentou os resultados mais promissores em relação a retenção da atividade enzimática, quando utilizou-se a formulação A para ambas as enzimas. Entretanto, a microencapsulação via "cross-linking" apresentou valores superiores de retenção de atividade enzimática após 5 ciclos reacionais, sendo que no caso da lipase do fungo *C. kikuchii* a retenção utilizando

este método foi mais que o dobro do valor obtido com o uso do “spray dryer” (Tabela 38). A estabilidade da enzima imobilizada por encapsulação, durante o período de armazenamento, foi mais uma vez muito superior à estabilidade da enzima na forma livre e em solução.

Tabela 38. Retenção da atividade enzimática das lipases de *C. kikuchii* imobilizadas em quitosana magnetizada no período de armazenamento e após 5 ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato.

Encapsulação	6 meses - R_{AE} (%)	5 ciclos - R_{AE} (%)
“Spray drying”		
Formulação A	75,4±0,7	25,9±1,4
Formulação B	74,1±1,5	22,0±0,8
Formulação C	83,8±1,2	38,2±1,4
“Cross-linking”		
Tripolifosfato (TTP)	70,8±0,5	52,8±1,4
Enzima livre		
Solução aquosa	14,2±0,9	-

R_{AE}: retenção da atividade enzimática.

Para uma conclusão mais exata da viabilidade de se empregar algum desses métodos de imobilização em escala industrial, torna-se necessário uma análise econômica de todo o processo. Certamente a retenção da atividade enzimática após os ciclos reacionais é um dos fatores primordiais que certamente influenciará na viabilidade econômica dos processos de imobilização e secagem.

A análise morfológica dos produtos obtidos por “spray drying” e pelo método de “cross-linking” está apresentada na Figura 50. As partículas obtidas por “spray drying” não apresentam uma forma definida, apresentando fendas/poros em sua superfície; enquanto que as partículas obtidas pelo método de “cross-linking” apresentaram forma arredondada e bem definida.

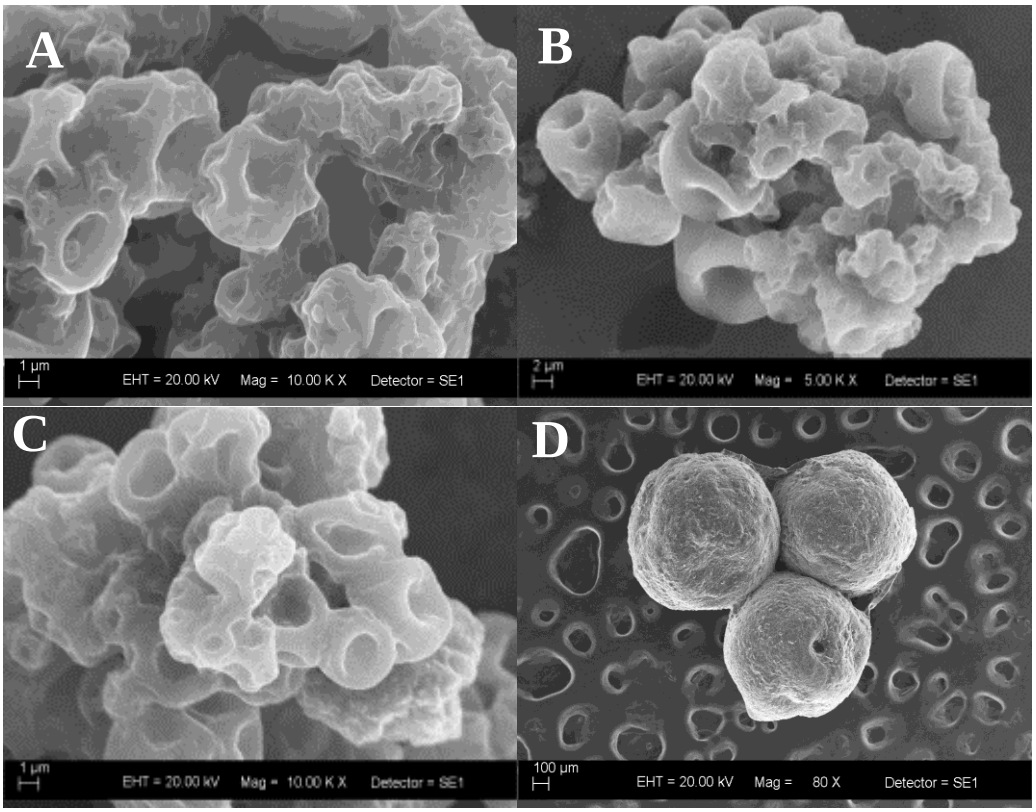


Figura 50. Microfotografias obtidas por MEV da lipase de *C. kikuchhi* imobilizada em quitosana: (A), (B) e (C) – Pós produzidos por “spray dryer” respectivamente Formulação A, B e C. D) micropartículas produzidas por “cross-linking”.

A utilização de partículas magnetizadas abre novas perspectivas na utilização de enzimas imobilizadas, principalmente em reações que necessitam ser interrompidas de forma imediata. Na Figura 51, observa-se que partículas contendo lipase imobilizada dispersas em solução, se agregam de forma rápida (menos de 10 segundos) apenas com a utilização de um campo magnético. Isso auxiliará de forma significativa na separação e recuperação do biocatalizador do meio reacional.

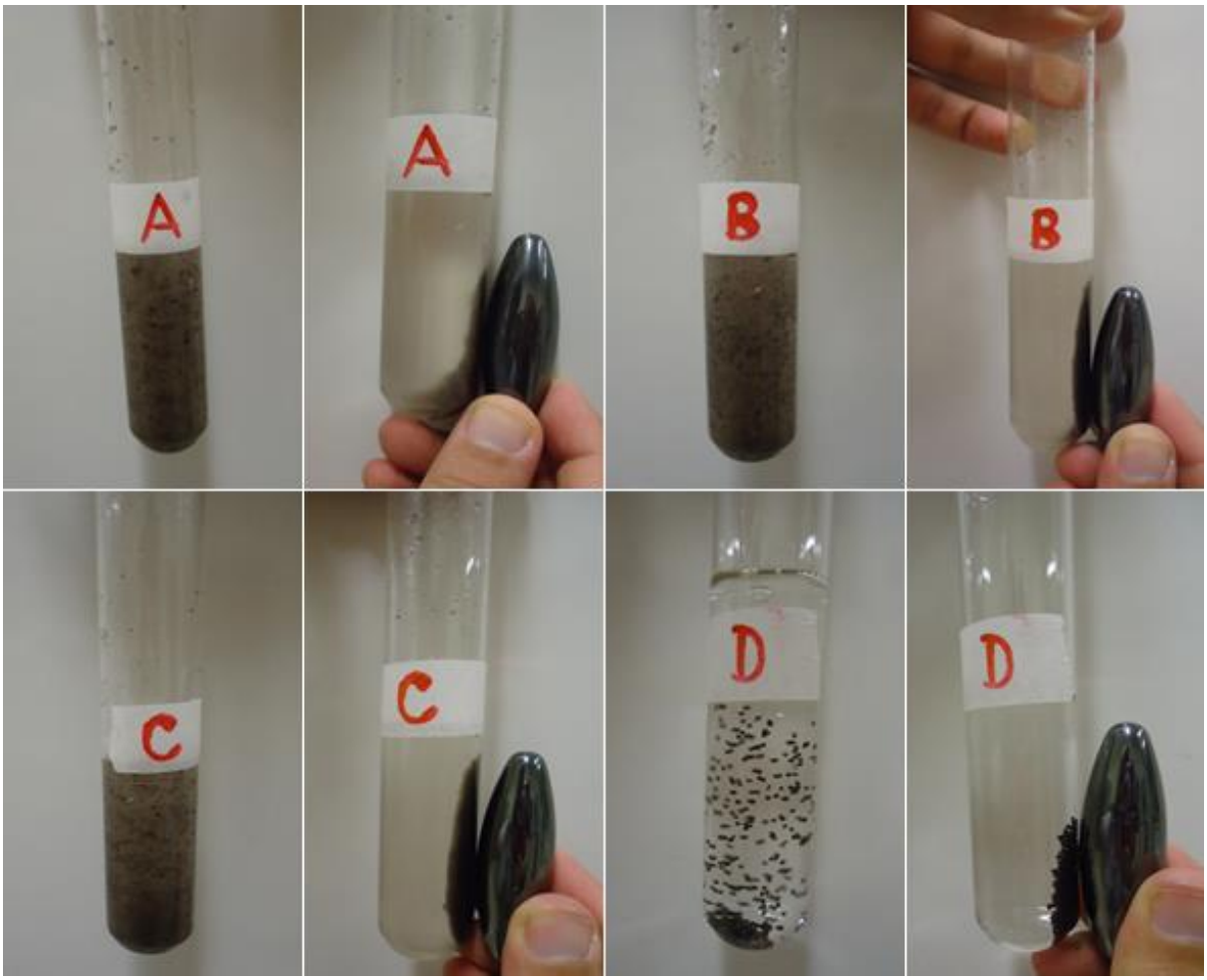


Figura 51. Dispersão e efeito magnético nos derivados imobilizados produzidos: (A), (B) e (C) – Pós produzidos por “spray dryer”: Formulação A, B e C. D) microesferas de quitosana produzidas por “cross-linking”.

5.7 Imobilização de lipases purificadas

A fim de avaliar os protocolos de imobilização aqui estudados, a lipase obtida comercialmente (produzida pela levedura *C. rugosa* - Sigma-Aldrich - Cod. CAS 9001.62.1) e lipase purificada produzida por *C. kikuchii* também foram imobilizadas nos subprodutos agroindustriais e quitosana que propiciaram a maior retenção da atividade enzimática das lipases presentes no extrato bruto. É importante ressaltar que a utilização das três enzimas, de fontes e graus de purificação distintos, foi realizada com a finalidade de avaliar os protocolos de imobilização e secagem aqui avaliados e não para comparação exclusiva da atividade enzimática dessas enzimas.

A Tabela 39 mostra os resultados da imobilização das lipases produzidas pela levedura *Candida rugosa* em subprodutos agroindustriais utilizando diferentes agentes ligantes e leito de jorro como equipamento de secagem. Todos os suportes foram ativados na concentração de 1,5%. Houve diferença estatística ($p<0,05$) para os valores de retenção da atividade enzimática com o uso do glutaraldeído comparando-se aos valores obtidos com o uso dos demais agentes ligantes. Com o glutaraldeído, a casca de arroz foi o melhor suporte para a retenção da atividade enzimática, apresentando diferença estatística ($p<0,05$) entre os valores obtidos com uso dos demais suportes (Tabela A15).

Tabela 39. Resultado da imobilização das lipases produzidas pela levedura *Candida rugosa* em subprodutos agroindustriais utilizando diferentes agentes ligantes.

Suporte	Agente ligante	T_{gs} (°C)	T_{gi} (°C)	R (%)	R_{AE} (%)	A_w (-)	Umidade (%)
Casca de arroz	Glutaraldeído	82,0	55,9	56,1	97,87±0,40	0,36±0,08	6,22±0,33
	Epicloridrina	83,7	57,0	69,0	91,17±1,15	0,31±0,07	4,64±1,00
	Metaperiodato	82,0	55,0	60,0	91,03±0,25	0,27±0,07	6,20±0,27
C. M. C.	Glutaraldeído	82,0	58,0	46,3	92,70±0,66	0,33±0,05	5,50±1,47
	Epicloridrina	84,1	56,1	43,5	84,77±0,71	0,32±0,07	5,33±1,03
	Metaperiodato	85,2	58,8	53,4	75,70±0,70	0,29±0,04	5,80±0,97
Palha de milho	Glutaraldeído	86,3	58,7	63,0	93,70±0,44	0,29±0,02	5,73±0,34
	Epicloridrina	82,1	55,0	63,6	84,73±0,57	0,28±0,06	5,28±0,57
	Metaperiodato	84,0	59,1	68,3	71,80±0,95	0,35±0,04	6,35±1,24

C.M.C.: Celulose microcristalina; T_{gs}: Temp. de saída; T_{gi}: Temp. interna; R: Rendimento; R_{AE}: Retenção da atividade enzimática; A_w: atividade de água.

Os valores médios de umidade e de atividade de água de todos os agentes ligantes e todos os suportes foram respectivamente: 5,67% e 0,31, o que reforça a viabilidade do uso do leito de jorro como equipamento de secagem.

A Tabela 40 apresenta os resultados da imobilização da lipase purificada de *C. kikuchii* em casca de arroz utilizando a leito de jorro na operação de secagem. Semelhante ao extrato bruto, utilizando-se 1,5% (v/v) de glutaraldeído, houve diferença estatística ($p<0,05$) para os valores de retenção da atividade enzimática comparando-se aos valores obtidos com o uso dos demais agentes ligantes (Tabela A16). Entretanto o valor da retenção da atividade enzimática para a enzima purificada (116,2%) foi inferior ao apresentado pelo extrato bruto (173,9%). Uma

explicação possível seria o fato de que outros constituintes, como açúcares, presentes no extrato bruto podem ter contribuído para proteção das lipases durante os processos de imobilização e secagem.

Tabela 40. Resultado da imobilização de lipase purificada produzida pelo fungo *C. kikuchii* em casca de arroz utilizando diferentes agentes ligantes.

Agente ligante	T_{gs} (°C)	T_{gi} (°C)	R (%)	R_{AE} (%)	A_w (-)	Umidade (%)	5 ciclos - R_{AE} (%)
Glutaraldeído	80,0	57,0	66,9	116,17±0,91	0,30±0,08	5,72±0,33	63,8±0,53
Epicloridrina	81,1	56,1	63,1	65,63±0,51	0,31±0,06	4,94±0,90	60,8±1,13
Metaperiodato	80,2	58,5	65,7	74,07±0,21	0,28±0,07	5,20±0,97	65,8±0,88

T_{gs}: Temp. de saída; T_{gi}: Temp. interna; R: Rendimento; R_{AE}: Retenção da atividade enzimática; A_w: atividade de água

Os valores de conteúdo de água e rendimento do processo foram similares aos encontrados para o extrato bruto. A média da atividade de água ficou em 0,29 enquanto que umidade teve média de 5,28%. Os valores da retenção da atividade após cinco ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato apresentou valor médio de 63,4%.

Também avaliou-se a imobilização da lipase purificada em quitosana utilizando a secagem em leito fluidizado (Tabela 41). Novamente houve diferença estatística ($p<0,05$) para os valores de retenção da atividade enzimática com o uso do glutaraldeído comparando-se aos valores obtidos com o uso dos demais agentes ligantes (Tabela A17). O valor do conteúdo de água dos derivados imobilizados produzidos está de acordo com o esperado para estabilização de substâncias biológicas. Os valores da retenção da atividade após cinco ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato apresentou valor médio de 64,1%.

Tabela 41. Resultado da imobilização de lipase purificada produzida pelo fungo *C. kikuchii* em quitosana utilizando diferentes agentes ligantes.

Agente ligante	T_{gs} (°C)	T_{gi} (°C)	R_{AE} (%)	A_w (-)	Umidade (%)	5 ciclos - R_{AE} (%)
Glutaraldeído	43,8	40,9	89,6±0,40	0,30±0,05	5,52±0,43	65,8±1,43
Epicloridrina	43,0	39,0	71,0±0,91	0,31±0,09	5,63±1,11	59,7±0,97
Metaperiodato	42,0	40,0	80,6±0,61	0,29±0,07	5,20±0,87	66,9±1,22

T_{gs}: Temp. de saída; T_{gi}: Temp. interna; R_{AE}: Retenção da atividade enzimática; A_w: atividade de água

5.7.1 Determinação dos parâmetros cinéticos e de estabilidade: lipase pura livre X lipase pura imobilizada

A Tabela 42 apresenta os resultados para a determinação da temperatura e pH ótimo e valores de K_m e V_{max} aparentes para enzima purificada na forma livre e imobilizada. Analisando os resultados obtidos observa-se que houve influência do processo de imobilização nas propriedades originais da lipase pura em todas as respostas analisadas. Houve deslocamento nos valores ótimos de temperatura e pH, assim como alteração nos valores de K_m e V_{max}.

Tabela 42. Parâmetros bioquímicos e cinéticos da lipase purificada livre e imobilizada em casca de arroz e quitosana.

Agente ligante	Suporte	Temp. ótima °C	pH ótimo	K_m mM	V_{max} µmol/min/mg
	Lipase livre	35,0	4,6	0,0324	10,28
Glutaraldeído	Casca de arroz	40,0	5,5	0,0223	73,4
	Quitosana	40,0	5,5	0,0342	63,1

A relação V_{max}/K_m da lipase pura imobilizada em casca de arroz com o uso do glutaraldeído foi 10 vezes maior do que essa mesma relação tomando como base os valores para a enzima pura na forma livre. Como discutido para o resultado obtido com o extrato bruto, isso pode ser explicado pela estabilização da conformação aberta da lipase imobilizada como resultado da abertura da tampa hidrofóbica (SCHRAG, et al., 1997; MONDAL et al., 2006).

Após duas horas de incubação a 80 °C, 70,0% da atividade da enzima livre foi perdida enquanto que para os derivados obtidos com o uso de casca de arroz e quitosana encontrou-se valores de retenção de atividade de 50,0% e 55,7% respectivamente (Tabela 43). Isso sugere que o procedimento de imobilização conferiu à lipase pura e imobilizada maior estabilidade térmica com relação à sua forma livre.

Tabela 43. Estabilidade à temperatura da atividade enzimática da lipase purificada livre e imobilizada em casca de arroz e quitosana.

Agente ligante	Suporte	Termoestabilidade (R_{AE} %)*
-	Lipase livre	30,0 ± 0,23
Glutaraldeído	Casca de arroz	50,0 ± 1,10
	Quitosana	55,7 ± 1,20

*R_{AE}: Retenção da atividade enzimática após duas horas de incubação a 80 °C.

5.8 Avaliação do potencial de aplicação industrial

5.8.1 Síntese de biodiesel

5.8.1.1 Composição química em ácidos graxos da matéria-prima lipídica

O estudo de diferentes matérias-primas lipídicas para a produção de biodiesel é de grande relevância visto que a estrutura molecular dos ésteres alquílicos obtidos pela transesterificação depende das características estruturais dos ácidos graxos da matéria-prima precursora. No presente trabalho foi utilizado como matéria-prima lipídica o óleo coco. A motivação do uso dessa matéria-prima está no fato de apresentar um forte potencial para a produção de óleo combustível, tendo em vista que é de baixo custo e abundantes em localidades carentes de fontes de energia, o que estimula a realização de pesquisas nesta área, procurando benefícios ambientais, energéticos e econômicos.

Os ácidos graxos são caracterizados de acordo com o seu comprimento da cadeia de carbono e seu número de ligações duplas (nível de insaturação). As propriedades físicas e químicas do biodiesel basicamente dependem da composição em ácidos graxos do triglicerídeo utilizado na produção. As propriedades físico-químicas do óleo de coco estão apresentadas na Tabela 44. De acordo com a Tabela 45 que apresenta a composição em ácidos graxos, é possível observar que óleo de coco contém elevados teores de acidos láurico. Esta característica é importante, uma vez que os ésteres láuricos são compostos de cadeias curtas que podem interagir mais facilmente com o agente acilante e com o catalisador

promovendo a reação de transesterificação. O tamanho e o número de insaturações da cadeia de carbono é também um fator decisivo para algumas propriedades do biodiesel. Como exemplo, observa-se que a elevação do número de cetano, calor de combustão (medida de conteúdo energético) e dos pontos de fusão e ebulição do combustível são reflexos do aumento do comprimento da cadeia carbônica dos ésteres.

Tabela 44. Propriedades físico-químicas do óleo de coco utilizado para a produção de biodiesel.

Propriedade	Valores
Viscosidade Cinemática 40 °C (mm^2/s)	29,0
Índice de Acidez (mg KOH/g de óleo)	0,41
Índice de Saponificação (mg KOH/ g óleo)	238
Índice de Iodo (g I_2/ 100 g de óleo)	25,0
Índice de Peróxido (mEq/ kg de óleo)	0,36

Tabela 45. Composição em ácidos graxos do óleo de coco utilizado para a produção de biodiesel.

Composição em ácidos graxos	(%m/m)
Caprílico C8	8,90
Cáprico C10	6,20
Láurico C12	47,10
Mirístico C14	18,80
Palmítico C16	7,80
Esteárico C18	2,58
Oleico C18:1	6,10
Linoleico C18:2	1,60

5.8.1.2 Etanólise dos óleos vegetais

O desempenho dos derivados imobilizados obtidos pela imobilização da lipase em casca de arroz (uso de glutaraldeído e secagem e leito de jorro) e quitosana (uso de glutaraldeído e secagem em leito fluidizado) foi testado na reação de transesterificação do óleo de coco utilizando etanol como agente acilante. O

monitoramento das reações foi efetuado em termos de ésteres etílicos formados em função do tempo de reação, conforme mostrado nas Figuras 52 e 53. Os rendimentos de transesterificação foram calculados com base nos dados de cromatografia gasosa, HPLC e confirmados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN^{1}H) (Tabelas 46 e 47). No produto purificado foram também quantificados os valores de viscosidade e densidade (Tabela 48).

Conforme verificado nas Figuras 52 e 53 os derivados imobilizados foram capazes de transesterificar a matéria lipídica utilizada neste trabalho. Para a lipase imobilizada em casca de arroz o rendimento de transesterificação ficou acima de 96,0% após 72 horas de reação enquanto que para o uso da quitosana como suporte esse valor foi atingido após 120 horas. Verifica-se ainda a correlação entre os ésteres etílicos obtidos e os ácidos graxos que estão em maior proporção na composição do óleo utilizado. Deste modo é possível constatar que os produtos obtidos da transesterificação do óleo de coco estão de acordo com a especificação da ANP de maio de 2012 que instituiu um limite mínimo de 96% m/m de ésteres etílicos (ANP 2013).

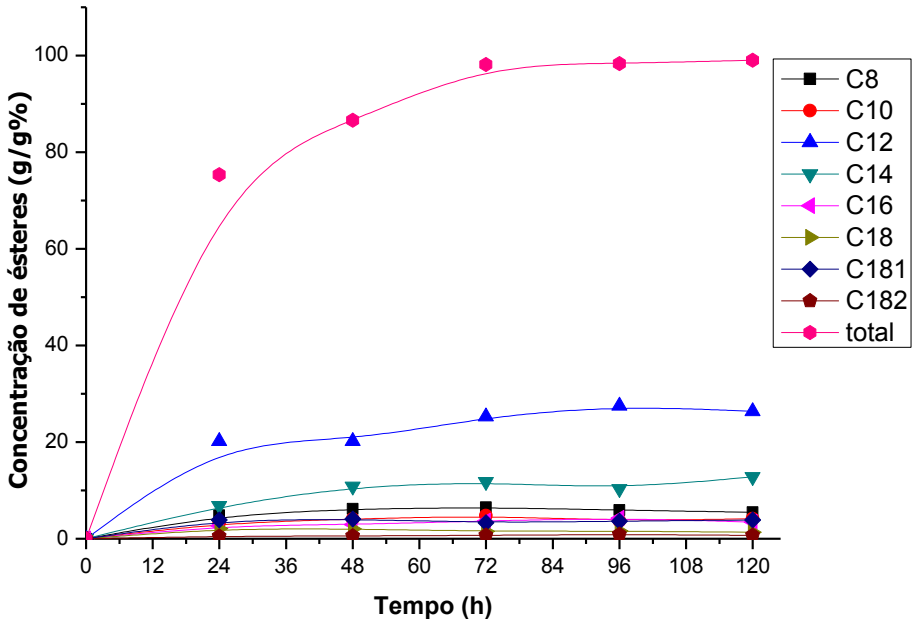


Figura 52. Perfil de formação de ésteres de etila em função do tempo de reação da transesterificação do óleo de coco catalisada pela lipase de *C. kikuchii* imobilizada em casca de arroz.

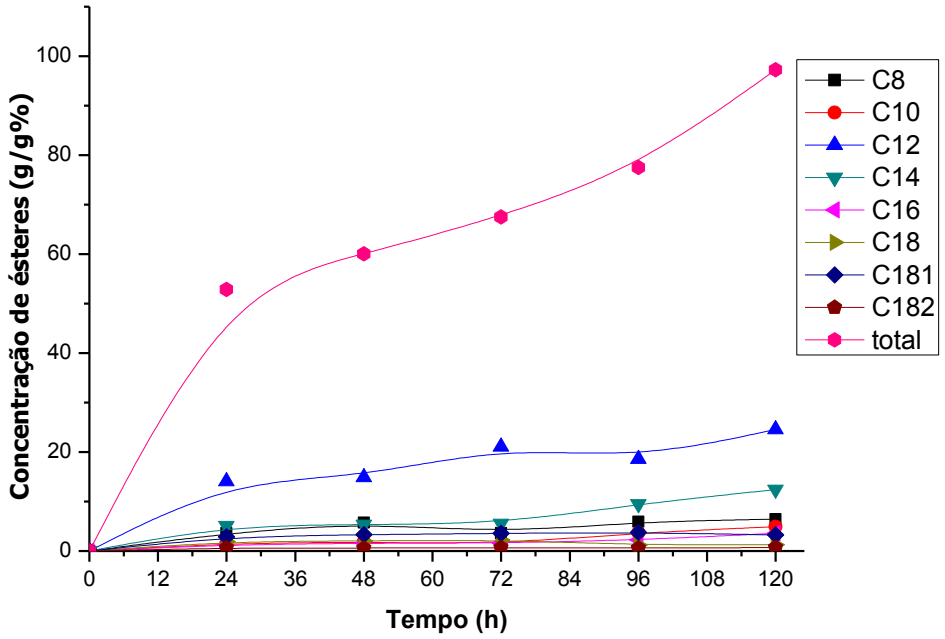


Figura 53. Perfil de formação de ésteres de etila em função do tempo de reação da transesterificação do óleo de coco catalisada pela lipase de *C. kikuchii* imobilizada em quitosana.

Tabela 46. Perfil dos ésteres de etila nas amostras de biodiesel obtidas pela catalise da lipase produzida por *Cercospora kikuchii* imobilizada em casca de arroz.

Ácidos Graxos (%m/m)			**Concentração mássica % (g/g)**				
			24h	**48h**	**72h**	**96h**	**120h**
Octanóico	C8	8,90	4,84	6,16	6,48	5,90	5,47
Cáprico	C10	6,20	3,23	4,05	4,78	3,69	4,11
Láurico	C12	47,10	20,20	20,21	25,31	27,50	26,34
Mirístico	C14	18,80	6,83	10,81	11,80	10,33	12,80
Palmítico	C16	7,80	2,68	2,93	3,70	4,24	3,46
Esteárico	C18	2,58	2,07	2,02	1,54	1,56	1,36
Oléico	C18:1	6,10	3,89	4,10	3,34	3,62	3,90
Linoléico	C18:2	1,60	0,53	0,60	0,69	0,92	0,72
Rendimento Total (%)			**75,36**	**86,62**	**98,13**	**98,33**	**99,03**

Razão Molar (óleo:etanol): 1:12; Temperatura: 40 ºC; Atividade Hidrolítica: 48U; Atividade hidrolítica recuperada: 45U; Reator: Cilíndrico.

Tabela 47. Perfil dos ésteres de etila nas amostras de biodiesel obtidas pela catalise da lipase produzida por *Cercospora kikuchii* imobilizada em quitosana.

Ácidos Graxos (%m/m)			Concentração mássica % (g/g)				
			24h	48h	72h	96h	120h
Octanóico	C8	8,90	3,64	5,70	3,63	5,93	6,40
Cáprico	C10	6,20	1,50	1,82	1,42	3,72	4,87
Láurico	C12	47,1	14,09	14,91	18,63	21,07	24,61
Mirístico	C14	18,8	5,08	5,33	5,52	9,50	12,42
Palmítico	C16	7,80	1,28	1,60	1,57	2,25	3,58
Esteárico	C18	2,58	1,93	2,04	2,20	1,21	1,29
Oléico	C18:1	6,10	2,86	3,29	3,55	3,76	3,27
Linoléico	C18:2	1,60	0,64	0,58	0,71	0,54	0,68
Rendimento Total (%)			**52,84**	**60,08**	**67,53**	**77,53**	**97,24**

Razão Molar (óleo:etanol): 1:12; Temperatura: 40 ºC; Atividade Hidrolítica: 28U; Atividade hidrolítica recuperada: 25U; Reator: Cilíndrico.

A elevada conversão em ésteres etílicos confirmada pela análise em HPLC, ficaram acima de 96% para ambos derivados imobilizados produzidos (Tabela 48). A quantificação de monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos é importante uma vez que a presença desses glicerídeos torna o biodiesel turvo e aumenta sua viscosidade, diminuindo sua qualidade e consequentemente tornando-o incompatível para ser utilizado como combustível. Quanto aos teores de monoglicerídeos e diglicerídeos nenhuma amostra atendeu os limites mínimos estabelecidos pela ANP que são de 0,80 e 0,20% m/m, respectivamente (ANP 2013). No entanto, todas as amostras não apresentaram teores de triglicerídeos mostrando a eficiência do biocatalisador na reação.

Tabela 48. Rendimento de conversão pela analise em HPLC e propriedades do biodiesel.

Perfil analisado	Derivado imobilizado	
	Casca de arroz	Quitosana
MAG (%)	1,19	1,73
DAG (%)	1,74	2,19
Rendimento (%)	97,07	96,08
Viscosidade (mm^2/s)	4,56	5,91
Densidade (kg/m^3)	0,88	0,88

MAG: monoglicerideos; DAG: diglicerídeos.

Os produtos obtidos a partir da transesterificação do óleo testado neste trabalho apresentaram valores de viscosidade dentro do limite especificado pela legislação da ANP (3 - 6 mm^2/s).

Esse desempenho promissor do biocatalisador foi confirmado pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear Protônica (RMN ^1H), que comprovou a elevada conversão das matérias-primas em ésteres etílicos, uma vez que o espectro apresentou o quarteto em 4,1 ppm referente ao desdobramento do pico correspondente ao hidrogênio metilênico presente na estrutura dos ésteres etílicos (PAIVA et al. 2013).

Rosset e colaboradores (2011) também estudaram a técnica de RMN ^1H (Figura 54) e constataram que a região entre 4,00 e 4,40 ppm do espectro é a área padrão de biodiesel, pois exibe sinais gerados por átomos de hidrogênio associados com os grupos metilênico dos ésteres etílicos representado no espectro por um quarteto representado pelo símbolo a”. Além disso, os autores também analisaram um espectro de RMN ^1H de uma amostra de óleo vegetal que apresentou um duplo quarteto referente aos triglicerídeos representados no espectro pelos símbolos (a’) e (a).

Na Figura 55 os espectros de RMN ^1H apresentam sinais na região 4,00-4,40 ppm, associado com os hidrogênios metilênicos de ésteres etílicos de cadeia longa (biodiesel) e os triglicerídeos dos óleos. Os espectros mostram também quintetos nas regiões entre 3,69 e 3,86 ppm e entre 4,86 e 5,15 ppm que são atribuídos aos hidrogênios metilênicos dos monoglicerídeos (MAG) e diglicerídeos (DAG).

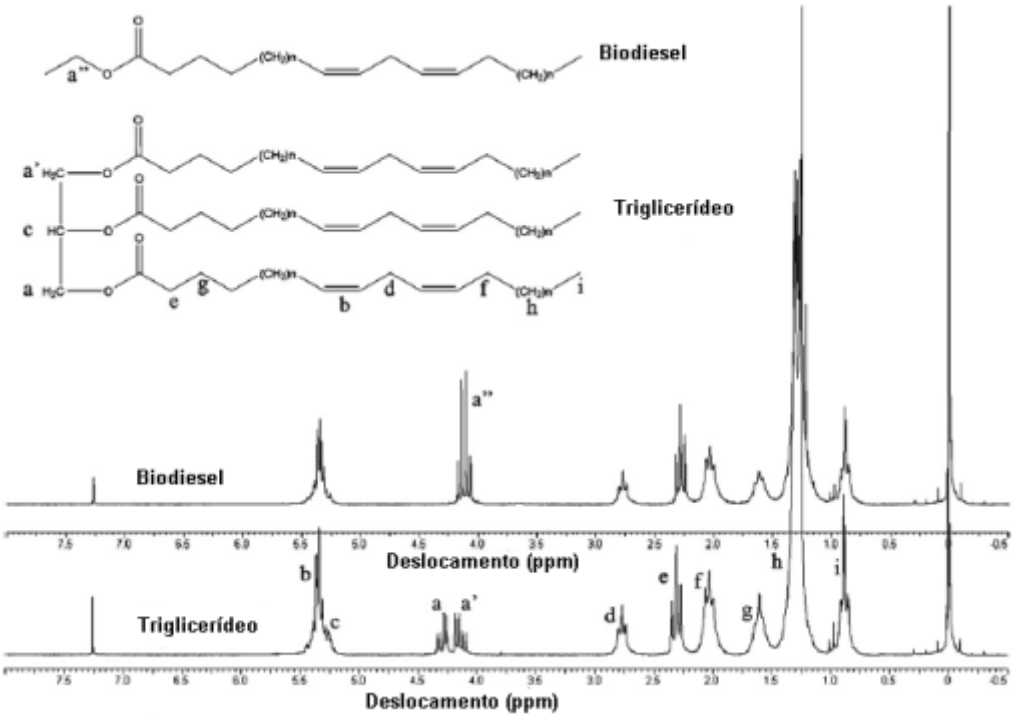


Figura 54. Espectro RMN ^{1}H integrado do biodiesel e triglicerídeo (Fonte: Rosset et al., 2011 adaptado).

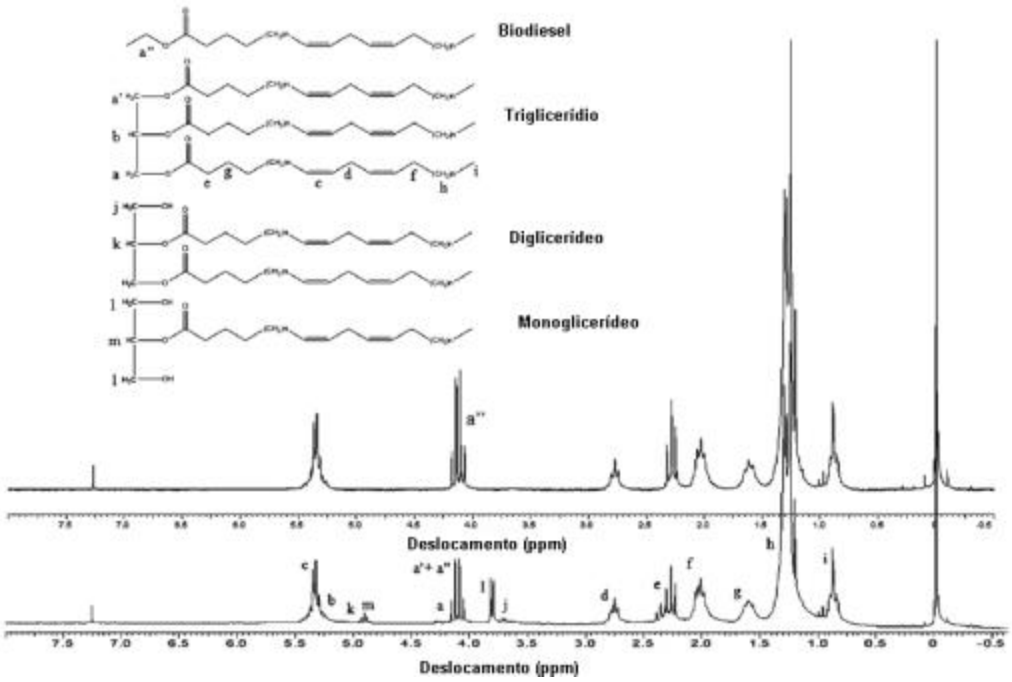


Figura 55. Espectro RMN ^{1}H integrado das regiões de formação de mono-, di-, triglicerídeo e ésteres etílicos (Fonte: ROSSET et al., 2011, adaptado).

Avaliando a Figura 56 é possível observar que os sinais correspondentes a formação de MAG e DAG estão presentes em baixas concentrações quando comparados a concentração de ésteres etílicos representados pelos picos que compõem o quarteto na região entre 4,00 e 4,40 ppm. Esses resultados foram comprovados com a análise realizada em HPLC (Tabela 48), deste modo constatou-se a eficiência das lipases (imobilizadas) presentes no extrato bruto produzido por *C. kikuchii* como biocatalisador nas reações de transesterificação de óleo de coco utilizando etanol como agente acilante. Este resultado é especialmente importante, uma vez que há um interesse considerável no desenvolvimento de sistemas eficientes para a produção de biodiesel por catálise enzimática utilizando etanol obtido a partir de cana-de-açúcar, podendo tornar a produção de biodiesel um processo totalmente inserido nos conceitos de rotas ambientalmente corretas.

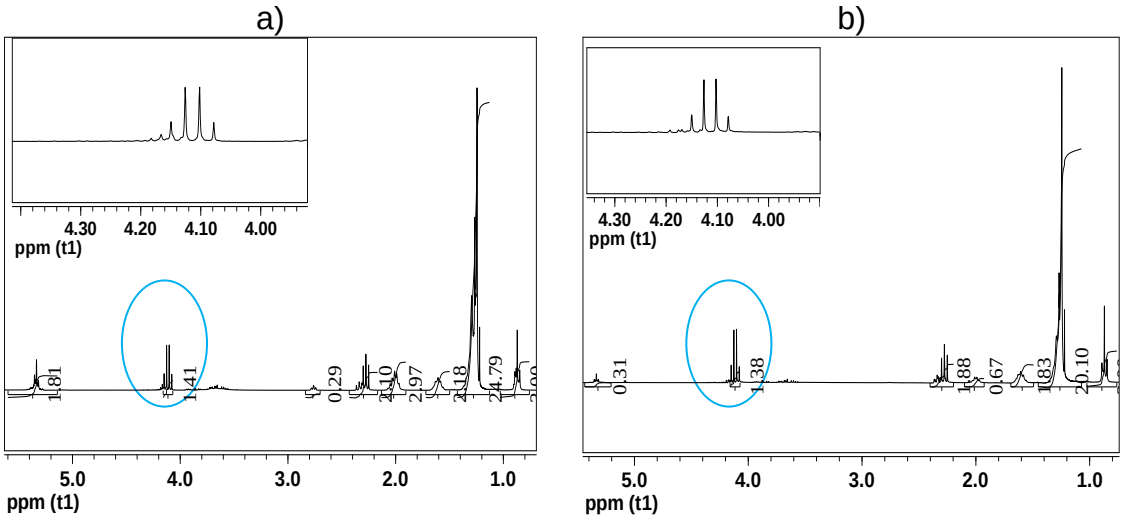


Figura 56. Espectro RMN ^{1}H integrado dos ésteres etílicos obtidos a partir da etanólise do óleo de coco: a) lipase imobilizada em quitosana b) lipase imobilizada em casca de arroz.

Atualmente, a maior parte dos óleos utilizados na produção de biodiesel possui ácidos graxos predominantemente insaturados o que torna esse combustível susceptível à oxidação, principalmente quando estocado por longos períodos. As substâncias geradas pela degradação oxidativa do biodiesel comprometem tanto a qualidade do combustível quanto o funcionamento dos motores que o utilizam. A

Tabela 49 apresenta a composição em ésteres etilícos das amostras de biodiesel obtidas a partir de óleo de coco.

Tabela 49. Composição em ésteres etilícos das amostras de biodiesel obtidas a partir de óleo de coco.

Ésteres (%)	Biodiesel de óleo de coco	
	Derivado imobilizado	
	Casca de Arroz	Quitosana
Octanoato (C_8)	5,90	6,4
Decanoato (C_{10})	3,69	4,8
Laurato (C_{12})	27,50	24,61
Miristato (C_{14})	10,33	12,42
Palmitato (C_{16})	4,24	3,58
Estearato(C_{18})	1,56	1,29
Oleato ($C_{18:1}$)	3,62	3,27
Linoleato ($C_{18:2}$)	0,92	0,68

O conjunto de dados obtidos sugere que a formação de ésteres etílicos a partir do óleo de coco é viável utilizando lipase de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em quitosana e casca de arroz, como catalisador, que atuou de forma eficiente convertendo os ácidos graxos presentes no óleo em ésteres etílicos correspondentes.

5.8.2 Síntese de aromas: butirato de butila

Lipase purificada de *C. kikuchii* foi imobilizada por ligação covalente (glutaraldeído) em casca de arroz (secagem em leito de jorro) e quitosana (secagem em leito fluidizado). O poder catalítico dos derivados imobilizados também foi comparado em termos de atividade de esterificação. Nos testes de esterificação foi adotado o modelo reacional constituído de butanol/ácido butírico/heptano, avaliando a cinética de conversão dos materiais de partida em éster.

A Figura 57 e Tabela 50 mostram os resultados da produção de butirato de butila utilizando quitosana como suporte. A máxima concentração obtida para o butirato de butila foi após 6 horas de reação, correspondendo a uma taxa de conversão de aproximadamente 99,0%.

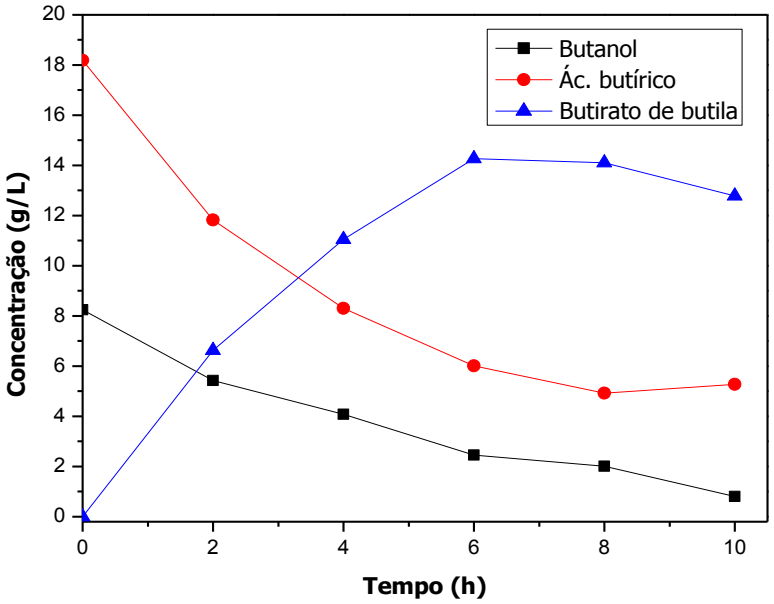


Figura 57. Formação do butirato de butila (▲) a partir do consumo de butanol (■), ácido butírico (●) catalisada por lipase pura de *Cercospora kikuchii* imobilizada em quitosana.

Tabela 50. Síntese de butirato de butila pela lipase purificada de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em quitosana usando leito de jorro para secagem.

Amostra	Tempo (horas)	Butanol			Ácido graxo			Butirato de butila		
		(g/L)	(mM)	(%)	(g/L)	(mM)	(%)	(g/L)	(mM)	(%)
Substrato inicial		8,25	111,31	0,00	18,19	206,45	0,00	0,00	0,00	0,00
Quitosana	0	8,25	111,31	0,00	18,19	206,45	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	5,43	73,26	37,40	11,82	134,15	35,02	6,63	45,97	45,98
	4	4,08	55,05	55,31	8,30	94,20	54,37	11,05	76,62	76,63
	6	2,45	33,05	76,92	6,01	68,21	66,96	14,27	98,95	98,96
	8	2,2	29,68	80,24	4,92	55,84	72,95	14,10	97,77	97,78
	10	0,81	10,93	98,67	5,27	59,81	71,03	12,78	88,62	88,63

A Figura 58 e Tabela 51 mostram os resultados da produção de butirato de butila utilizando casca de arroz como suporte. A máxima concentração de butirato de butila foi obtida também após 6 horas de reação, correspondendo a uma taxa de conversão de 92,51%. A diferença nas taxas de conversão deve-se provavelmente

às influências do tipo de suporte e do teor de água nos derivados imobilizados obtidos.

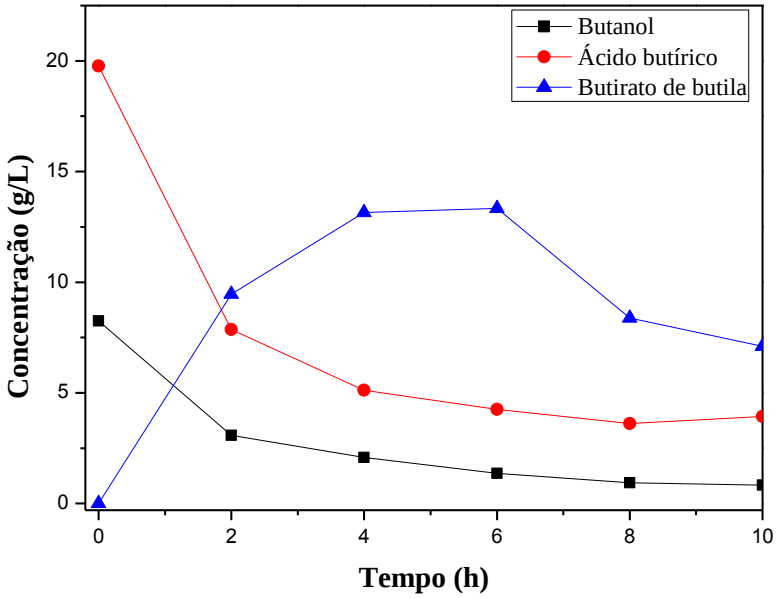


Figura 58. Formação do butirato de butila (▲) a partir do consumo de butanol (■), ácido butírico (●) catalisada por lipase purificada de *Cercospora kikuchii* imobilizada em casca de arroz.

Tabela 51. Síntese de butirato de butila pela lipase purificada de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em casca de arroz usando leito fluidizado na etapa de imobilização e secagem.

Amostra	Tempo (horas)	Butanol			Ácido graxo			Butirato de butila		
		(g/L)	(mM)	(%)	(g/L)	(mM)	(%)	(g/L)	(mM)	(%)
Substrato inicial		8,25	111,31	0,00	19,77	206,32	0,00	0,00	0,00	0,00
Palha de arroz	0	8,25	111,31	0,00	19,77	206,32	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	3,08	41,55	24,93	7,86	134,10	35,00	9,46	65,60	65,60
	4	2,09	28,20	38,06	5,12	94,25	54,32	13,15	91,19	91,19
	6	1,36	18,35	47,75	4,26	68,27	66,91	13,34	92,50	92,51
	8	0,93	12,58	53,41	3,62	59,76	71,04	8,38	58,09	58,09
	10	0,834	11,25	54,72	3,93	55,79	72,96	7,10	49,23	49,24

Diante dos resultados obtidos anteriormente, um planejamento fatorial completo 2^2 com face centrada foi construído com o objetivo de determinar os níveis de temperatura (X_1) e massa de lipase (X_2) que proporcionassem a maior conversão dos materiais de partida (butanol e ácido butírico) em butirato de butila utilizando a lipase purificada imobilizada em quitosana. A Tabela 52 apresenta os resultados experimentais da produção do butirato de butila de acordo com o planejamento experimental utilizado.

Tabela 52. Matriz do planejamento e resultados experimentais obtidos para a síntese do butirato de butila pela lipase de *C. kikuchii* Imobilizada em quitosana.

Ensaio	X_1	X_2	Temperatura (°C)	Massa (g)	Butirato de butila (g/L)
1	-1	-1	32	0,1	4,52
2	+1	-1	42	0,1	4,60
3	-1	+1	32	0,5	10,75
4	+1	+1	42	0,5	11,06
5	-1	0	32	0,3	7,33
6	+1	0	42	0,3	8,38
7	0	-1	37	0,1	5,15
8	0	+1	37	0,5	9,80
9	0	0	37	0,3	9,35
10	0	0	37	0,3	9,16
11	0	0	37	0,3	9,50

Análise de variância foi aplicada aos resultados experimentais empregado-se a soma dos quadrados dos resíduos como estimativa do erro experimental. Primeiramente, avaliou-se o modelo quadrático com o termo de interação linear entre os dois fatores. Os resultados da análise estatística evidenciaram uma boa concordância entre os dados experimentais e valores estimados, sendo o erro médio observado para a maioria dos pontos experimentais inferior a 5%. A análise mostrou significância estatística apenas para o termos Me(L) a um nível de significância de 5%. O termo Me(Q), apresentou um p_{valor} de 0,117, sendo quase significante a um nível de 10%. Entretanto, o modelo apresentou termo de falta de ajuste (lack of fit), também significativo, com $F_{3,2}$ = 35,725, valor 1,86 vezes superior ao valor tabelado,

para um nível de significância de 5% (19,16). O modelo ajustado apresentou R^2 superior a 90%, valor considerado adequado para fins de ajuste.

De forma a melhorar a qualidade do ajuste, os termos não significantes foram removidos do modelo e procedeu-se o ajuste apenas com a variável Me (termo linear e quadrático). A Tabela 53 apresenta os coeficientes de regressão e a Tabela 54 a análise estatística realizada para o modelo ajustado. A Tabela 53 indica que o modelo ajustado apresenta um valor F_{calc} de 49,2 (relativo aos resíduos), ou seja 11 vezes o valor tabelado para um nível de significância de 0,05, sendo portanto altamente significativo do ponto de vista estatístico. O valor de F_{calc} obtido para a falta de ajuste foi de 24,9, sendo apenas 1,27 vezes superior ao valor tabelado para um nível de significância de 0,05. Assim, considerou-se que o modelo pode ser utilizado na descrição dos dados experimentais obtidos. O modelo permite descrever 92,5% da variação observada nos dados experimentais, ante um máximo explicável de 99,9%. Salienta-se entretanto que o modelo ajustado é válido apenas nas faixas utilizadas na obtenção dos dados experimentais. A distribuição dos resíduos não apresentou tendência, indicando também uma boa adequação do modelo ajustado. O erro médio entre os valores experimentais e estimados foi inferior a 6,7 %.

Tabela 53. Coeficientes de regressão, erro padrão e p-valor obtidos para o modelo de regressão ajustado aos resultados experimentais apresentados na Tabela 49.

Termo	Coeficiente ajustado	Erro padrão	p-valor
Média	8,744	0,329	≤ 0,01^{+}
Me_L	2,890	0,301	≤ 0,01^{+}
Me_Q	-1.097	0,446	0,039*

+ termo é significante a 0,01; *termo é significante a 0,05;

++ termo é significante a 0,05

L = Efeito linear; Q = Efeito quadrático ou de curvatura

Tabela 54. Análise estatística para o modelo de regressão ajustado aos dados experimentais de produção de butirato de butila.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	GL	Quadrado médio	F-calc	*p*
Modelo	53,397	2	26,698	49,2	≤ 0,01[+]
Resíduos	5,341	8	0,543	-	-
Falta de ajuste	4,283	6	0,714	24,9	0,04[*]
Erro puro	0,058	2	0,029	-	
Total	57,738	10			
% da variância explicada	92,5				
% máxima de variância explicável	99,9				

+ Significante a 0,01; *Significante a 0,05.

A Figura 59, apresenta a superfície de resposta gerada pelo modelo ajustado, juntamente com os resultados experimentais obtidos. Observa-se na Figura 59, que os dados experimentais apresentam uma boa concordância com os valores estimados, justificando assim, o uso do modelo para fins de determinação de condições ótimas de produção do butirato de butila, empregando as enzimas imobilizadas em quitosana. A análise da superfície mostra que os valores ótimos são obtidos nas reações com massa de enzima de 0,5 gramas e para temperaturas de reação no intervalo de 32 a 42 ºC.

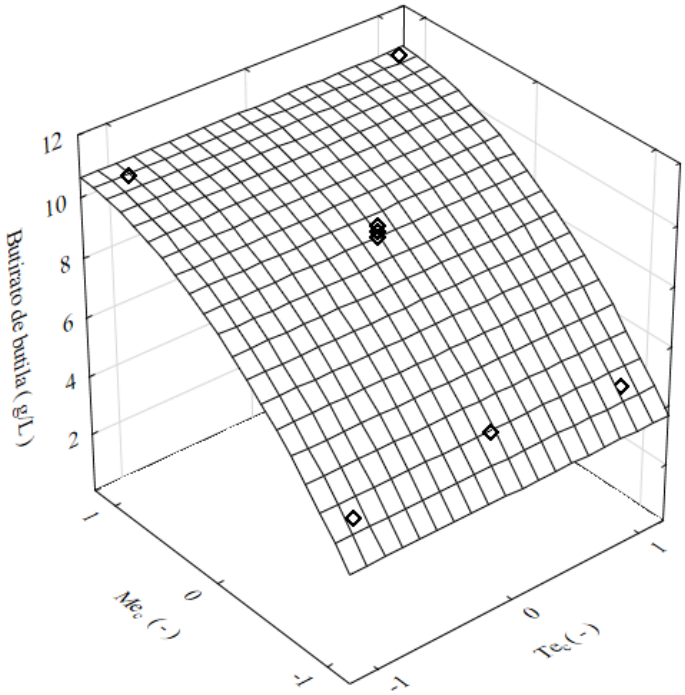


Figura 59. Superfície de resposta gerada pelo modelo ajustado aos dados experimentais.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

Nos últimos anos avanços significativos têm sido efetuados no uso de enzimas em meios não convencionais. Esses avanços impulsionam uma nova era de aplicação de enzimas em síntese orgânica. Tais atividades são de extrema importância para o desenvolvimento de novas rotas de processo, para obtenção de produtos novos ou conhecidos a custos mais competitivos, ampliando simultaneamente, o potencial de aplicação das enzimas em processos industriais. Portanto, o uso industrial de enzimas como catalisadores depende da eficiência de sua imobilização e do emprego de suportes adequados, de tal forma que o investimento inicial em matéria-prima (enzima e suporte) seja compensado pela elevada atividade e estabilidade do derivado imobilizado obtido.

O desenvolvimento deste trabalho levou à obtenção de informações relevantes sobre a tecnologia de imobilização de enzimas. Somado à essa relevante área da tecnologia enzimática, inseriu-se a tecnologia de secagem nas operações de imobilização. Assim, como conclusão geral do trabalho tem-se que a imobilização das lipases produzidas por *C. kikuchii* mostrou-se bastante relevante do ponto de vista do baixo custo dos suportes utilizados, bem como em função dos altos valores de retenção da atividade enzimática tanto após a secagem quanto para o período de armazenamento.

Para a utilização dos subprodutos agroindustriais a ligação covalente foi o método de imobilização mais viável juntamente com a secagem em leito de jorro por apresentar os maiores níveis de atividade enzimática residual. Por outro lado, com o uso da quitosana como suporte, a ligação covalente manteve-se como melhor método de imobilização enquanto o leito fluidizado foi o melhor equipamento de secagem. Por fim, diante desses resultados promissores, a imobilização de outras enzimas também poderá ser avaliada utilizando estes métodos, reforçando assim, o desenvolvimento e a aplicação da tecnologia enzimática no país.

A seguir apresentam-se as principais conclusões obtidas a partir das condições experimentais analisadas.

6.1 Caracterização dos suportes agroindustriais

- Os suportes são constituídos basicamente dos mesmos componentes (celulose, lignina e hemicelulose), diferindo na proporção de cada um;

- Os suportes agroindustriais apresentaram uma área superficial relativamente alta (média de 136,2 m^2/g) o que auxiliou na viabilidade dos métodos de imobilização, principalmente por adsorção;

- Os suportes apresentaram alta porosidade, tendo sua estrutura classificada como macroporosa;

- As densidades analisadas (densidade “bulk”, densidade aparente e densidade real) foram diferentes para cada tipo se suporte, o que pode influenciar na etapa de envase e transporte ou na fluidodinâmica em reatores;

- A análise qualitativa dos suportes após a ativação com os agentes ligantes através de espectrometria de infravermelho (FTIR) mostrou que houve modificações na estrutura dos mesmos devido ao surgimento de novas bandas ou desaparecimento de bandas originais nos espectros.

6.2 Protocolos para imobilização de lipase em subprodutos agroindustriais

6.2.1 Imobilização por adsorção

- A imobilização por adsorção da lipase do fundo *C. kikuchii* mostrou-se viável para todos os métodos de secagem avaliados (estufa, liofilizador e “spray dryer”);

- Na secagem por estufa a retenção da atividade enzimática variou de 64,5% a 89,0% e durante o período de armazenamento a retenção da atividade enzimática dos derivados imobilizados variou de 41,1 a 61,0%. A média de retenção da atividade da enzima após cinco ciclos de reação foi de 46,4%;

- Para a liofilização a retenção da atividade foi superior a 75,0% para todos os suportes avaliados. A média da retenção da atividade no período de armazenamento (3 meses) foi de 78,2% enquanto que a retenção da atividade após cinco ciclos reacionais variou de 37,5 a 48,7%;

- Com o uso do “spray dryer” a atividade enzimática residual foi superior a 85,5% para todos os suportes avaliados. O rendimento médio da produção da enzima imobilizada foi de 57,0%;

- A retenção da atividade enzimática no período de armazenamento apresentou valor médio de 70,0%, sendo o maior valor obtido para o processo de imobilização por adsorção. Os valores da retenção da atividade após cinco ciclos de reação também foram maiores, sendo que houve a manutenção da atividade acima de 50,0% em todos os suportes utilizados.

6.2.2 Imobilização por ligação covalente

- A imobilização por ligação covalente de uma forma geral apresentou valores para retenção da atividade enzimática superiores à imobilização por adsorção;

- O leito de jorro foi a melhor opção no que se refere aos equipamentos de secagem utilizados quando os subprodutos agroindustriais foram os suportes, devido a maior valor da retenção da atividade enzimática;

- Na secagem em leito de jorro e com concentração de glutaraldeído a 1,5% (v/v), os melhores resultados foram obtidos para a celulose microcristalina com retenção da atividade enzimática de 179,1%, seguido da casca de arroz e da palha de milho com 173,9% e 169,8%, respectivamente;

- Os derivados imobilizados obtidos por secagem em leito de jorro e glutaraldeído como agente ligante tiveram uma diminuição da atividade enzimática com uma média de apenas 17,31% enquanto que a forma livre da

enzima perdeu 85,8% de sua atividade inicial após 6 meses de armazenamento. Os valores da retenção da atividade após cinco ciclos de reação usando *p*-NPP como substrato teve uma média de 67,2%;

- O rendimento do processo em termos de recuperação do produto no leito de jorro variou de 55,6 a 80,2% para o uso do glutaraldeído como agente ligante.

- A palha de milho revelou-se como o melhor suporte na imobilização covalente usando a secagem em estufa como método de desidratação do sistema suporte-enzima, uma vez que propiciou a retenção de mais de 90,0% da atividade enzimática inicial;

- Na secagem por liofilização, com o glutaraldeído na concentração de 1,5% (v/v), houve destaque para a casca de arroz (163,5%) seguida de palha de milho (157,5%), bagaço de cana (154,7%) e sabugo de milho (129,4%) no que se refere à retenção da atividade enzimática;

6.3 Protocolos para imobilização de lipases em quitosana

- A técnica de produção das microesferas de acetato de quitosana por coacervação e inversão de fases, se mostrou eficiente, produzindo microesferas de tamanho uniforme e formato esférico, apresentando após o processo de secagem tamanho médio de partículas da ordem de 0,6 mm;

- Para o uso das microesferas de acetato de quitosana como suporte, a secagem utilizando leito fluidizado mostrou-se a mais vantajosa dentre todas as outras (secagem em estufa e liofilizador);

- O valor para a retenção da atividade enzimática foi de 93,9% enquanto que a retenção da atividade após 5 ciclos de reação foi superior a 65,0% para o uso do glutaraldeído como agente ligante;

- Na secagem do sistema quitosana-lipase por estufa, a eficiência de imobilização foi de 61,8% enquanto que a retenção da atividade enzimática foi de 68,6% utilizando ligação covalente;

- A secagem por liofilização apresentou resultados bem promissores, com eficiência de imobilização de 84,4% e retenção da atividade superior a 80,0% para ligação covalente.

6.4 Protocolos para imobilização de lipases em quitosana magnetizada

- A imobilização da lipase em quitosana contendo partículas magnéticas mostrou-se viável tanto pela alta retenção da atividade enzimática, quanto pelos benefícios no processo de recuperação dos derivados imobilizados do meio reacional;

- Dentre os dois métodos de microencapsulação explorados neste trabalho a encapsulação por “spray drying” apresentou os resultados mais promissores em relação a retenção da atividade enzimática, enquanto que a microencapsulação via “cross-linking” apresentou os melhores índices de retenção de atividade após 5 ciclos reacionais da enzima;

- A estabilidade da enzima imobilizada por encapsulação, durante o período de armazenamento, foi mais uma vez muito superior à estabilidade da enzima na forma livre e em solução. Para a enzima imobilizada a média de retenção de atividade após 6 meses foi de 76,0% enquanto que a enzima livre esse valor foi de 14,2%.

6.5 Protocolo de imobilização de lipases purificadas

- Os valores de retenção da atividade enzimática para a enzima pura e imobilizada foi, de uma forma geral, inferior àqueles obtidos para imobilização da enzima na forma bruta;

- Semelhante ao extrato bruto, a imobilização em casca de arroz ativada com 1,5% (v/v) de glutaraldeído proporcionou a maior retenção da atividade enzimática (115,2%);

- A imobilização da lipase purificada em quitosana, ativada com glutaraldeído e utilizando a secagem em leito fluidizado, promoveu a retenção da atividade enzimática em aproximadamente 90,0%.

6.6 Caracterização físico-química dos derivados imobilizados

- As análises por espectrometria de infravermelho e elemental (CNH) evidenciaram a eficiência dos processos de imobilização na incorporação da enzima sobre a superfície dos suportes;

- A banda característica da lipase livre claramente apareceu no número de onda de 1341 cm^{-1} o que é observado também para o derivado imobilizado (suporte + lipase), sugerindo a fixação da enzima no suporte após o processo de imobilização;

- O nitrogênio foi claramente o elemento que mais aumentou na superfície do suporte após a imobilização da enzima, com uma média de aumento de 50,2%;

- Através da análise morfológica constatou-se que os sistemas enzima-suporte apresentaram formas claramente distintas, com predominância de partículas com superfícies irregulares, cilíndricas e estruturas na forma de lascas;

- O estudo das propriedades bioquímicas e cinéticas dos derivados imobilizados mostrou a influência do processo de imobilização nas características das lipases estudadas com deslocamento nos valores ótimos de temperatura e pH, assim como alteração nos valores de K_m e V_{max}.

6.7 Avaliação do potencial de aplicação biotecnológica

- A etanólise do óleo de coco, através do emprego da lipase imobilizada em quitosana e casca de arroz, foi eficiente na conversão da matéria prima-lipídica em ésteres etílicos, promovendo rendimentos superiores a 96,0%;

- A qualidade do produto final (biodiesel) determinada pelas análises, cromatografia gasosa (CG) e RMN^{1}H atendeu aos parâmetros exigidos pelas normas competentes;

- A lipase purificada, imobilizada em casca de arroz e quitosana, foi efetiva para a aplicação na síntese de ésteres empregando butanol e ácido butiríco como substratos com conversões superiores a 92,0%;

- O uso do planejamento fatorial mostrou ser uma ferramenta importante para determinar as condições adequadas para obtenção dos ésteres aromatizantes: os valores ótimos são obtidos nas reações com massa de enzima de 0,5 gramas e para temperaturas de reação no intervalo de 32 a 42 ºC.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor sp.* **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.589–595, 2003.

ABROL, K.; QAZI, G.N.; GHOSHA, A.K. Characterization of an anion-exchange porous polypropylene hollow fiber membrane for immobilization of ABL lipase. **Journal of Biotechnology**, v.128, p.838–848, 2007.

ADLERCREUTZ, P. Immobilized enzymes. In: NAGODAWITHANA, T., REED, G., Eds. **Enzymes in Food Processing**, 3rd ed., Academic Press Inc., San Diego, 1993. p.116.

ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v.42, p.6406-6436, 2013.

AGNES, E.J.; PEREIRA, E.B.; AGUIAR, R.O.; MONDARDO, R.M. Avaliação e comparação da eficiência de imobilização de lipase pancreática em quitosana para produção de ácidos graxos em frascos agitados. **In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica,** 2003.

AGUIAR, R.A.; MONDARDO, R.M.; AGNES, E.J.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B. Avaliação e comparação da eficiência de imobilização de lipase pancreática em quitosana para produção de ácidos graxos em frascos agitados. **Acta Scientiarum Technology**, v.32, p.15-19, 2010.

ALLOUE, W.A.M.; DESTAIN, J.; MEDJOUB, T.E.; GHALFI, H.; KABRAN, P.; THONART, P. Comparison of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilization yield of entrapment, adsorption, and covalent bond techniques. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.150, p.51-63, 2008.

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 3 ed. São Paulo, 1997.

ALMEIDA-NETO, A.F. **Caracterização e avaliação de argilas como adsorventes na remoção e eluição de íons cobre e mercúrio em diferentes sistemas.** Campinas, 2011. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, Unicamp.

ALONSO, F.O.M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50862).** Rio de Janeiro, 2007. 98p. Dissertação de mestrado - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V.; BARATTI, J. Characterization of a thermostable esterase activity from the moderate thermophile *Bacillus licheniformes*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry,** v.63, p.63-70, 1999.

AMORIM, R.V.S.; MELO, E.S.; CANEIRO-DA-CUNHA, M.G.; LEDINGHAN, W.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, v.89, p.35-39, 2003.

AOCS. **American Oil Chemists' Society Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 5th Ed. AOCS Press. (2004).

ARNOLD, A.E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G.S.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v.3, p.267-274, 2000.

ARROYO, M.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v.24, p.3–12, 1999.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, J.W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal Biotechnology**, v.3, p.112-141, 2000.

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

BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. The slow-down of the CALB immobilization rate permits to control the inter and intra molecular modification produced by glutaraldehyde. **Process Biochemistry**, v.47, p.766–74, 2012.

BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica.* **Process Biochemistry**, v.47, p.1220–1227, 2012.

BAUTISTA, F.M.; BRAVO, M.C.; CAMPELO, J.M.; GARC, A.; LUNA, D.; MARINAS, J.M.; ROMERO, A.A. Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on amorphous $AlPO_4$ and other inorganic supports. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v.72, p.249-254, 1998.

BAYMAN, P.; ANGULO-SANDOVAL, P.; BAEZ-ORTIZ, Z.; LODGE, J.D. Distribution and dispersal of Xylaria endophytes in two tree species in Puerto Rico. **Mycological Research**, v.102, p.944-948, 1998.

BEAUCHAT, L.R. Microbial stability as affected by water activity. **Cereal food world**, v.26, p.345-349, 1991.

BERNSTEIN, M.E.; CARROLL, G. Internal fungi in old-growth *Douglas firfoliage*. **Canadian Journal of Botany**, v.55, p.644-653,1977.

BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; MATEO, GD-OC.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme Microbial Technology**, v.39, p.877–82, 2006.

BHUSHAN, I.; PARSHAD, R.; QAZI, G.N.; GUPTA, V.K. Immobilization of lipase by entrapment in ca-alginate beads. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v.23, p.552-562, 2008.

BICKERSTAFF, G.F. **Immobilization of enzymes and cells.** In: SCHMAUDES, H. P. (Ed) Methods in biotechnology. Totowa: Humara press, v.1, p.1-11, 1997.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.156-171, 1976.

BRAGA, L.P.; BRUNO, L.M.; CASTRO, H.F. Uso e reutilização da lipase de candida rugosa imobilizada em suporte híbrido obtido pela técnica sol- gel. **In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 2005.

BRANDY, D.; JORDAAN, J.; SIMPSOM, C.; CHETTY, A.; ARUMUGAM, C.; MOOLMAN, F.S. Spherezymes: A novel structured self-immobilisation enzyme technology. **Bio Medical Center Biotechnology**, v.8, p.123-134, 2008.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Forte crescimento da produção de biodiesel. Boletim mensal dos combustíveis renováveis**, Brasília, n. 37, mar. 2010.

BREM, J.; TURCU, M.C.; PAIZS, C.; LUNDELL, K.; TOSA, M-L.; IRIMIEA, F-D.; KANERVA, L.T. Immobilization to improve the properties of *Pseudomonas fluorescens* lipase for the kinetic resolution of 3-aryl-3-hydroxy esters. **Process Biochemistry**, v.47, p.119–126, 2012.

BRÍGIDA, A.I.S.; PINHEIRO, A.D.T.; FERREIRA, A.L.O.; GONÇALVES, L.R.B. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B by adsorption to green coconut fiber. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.146, p.173-187, 2008.

BRÍGIDA, A.I.S.; PINHEIRO, A.D.T.; FERREIRA, A.L.O.; PINTO, G.A.S.; GONÇALVES, L.R.B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment to green coconut fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.136–140, p.67-80, 2007.

BRINK, L.E.S.; LUYBEN, K.C.H.A.M.; VAN'TRIET, K. Biocatalysis in organic media. **Enzyme Microbiol Technology**, v.10, p.736–74, 1988.

BRUNO, L.M.; LIMA-FILHO, J.L.; CASTRO, H.F. Comparative performance of microbial lipases immobilized on magnetic polysiloxane polyvinyl alcohol particles**.** **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, p.889-896, 2008.

BRUNO, L.M.; SAAVEDRA, G.A.; CASTRO, H.F.; LIMA-FILHO, J.L.; MELO, E.H.M. Variables that affect immobilization of *Mucor miehei* lipase on nylon membrane. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.20, p.371–375, 2004.

BRYJAK, J.; TROCHIMCZUK, A.W. Immobilization of lipase and penicillin acylase on hydrophobic acrylic carriers. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.573–578, 2006.

BRZOZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, U.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, G.G.; LAWSON, D.M.; TURKENBURG, J.P. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase–inhibitor complex. **Nature**, v.351, p.491-494, 1991.

BURKERT, J.F.M. **Otimização das condições de produção da lipase por *Geotrichum candidum* NRLL-Y552**. Campinas, 2002. 95p. Tese de Doutorado - Departamento de Ciências dos Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.

BURKERT, J.F.M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Optimization of extracellular lipase production by Geotrichum sp**.** using factorial design. **Bioresource Technology**, v.91, p.74–84, 2004.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. 3.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2000. 751p.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ROCHA, G.J.M.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; GIULIETTI, M. **Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol.** In: 47° Congresso Brasileiro de Química - CBQ, 2007.

CANMET – Energy Diversification Research Laboratory, 1999, Disponível em: http://cetc-varennes.nrcan.gc.ca/eng/publication/1999-46-47e.pdf. Acesso em fevereiro de 2011.

CANNON, P.F.; SIMMONS, C.M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, v.94, p.210-220, 2002.

CAO, L. **Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design**. 1.ed. The Netherlands: editora WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005, 563p.

CARROLL, G.C.; CARROL, F.E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v.56, p.3034-3043, 1978.

CARVALHO, O.C.; CALAFATTI, S.A.; MARASSI, M.; SILVA, D.M. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Quimica Nova**, v.28, p.614-621, 2005.

CASA, R.M.; GUISAN, J.M.; SANCHES-MONTEROA, J.M.; SINISTERRA, J.V. Modification of the activities of two different lipases from *Candida rugosa* with dextrans. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p.30–40, 2002.

CASTRO, A.M.; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 27, p.181-188, 2010.

CASTRO, H.F.; LIMA, R.; ROBERTO, C.I. Rice straw as a support for immobilization of microbial lipase**. Biotechnology Progress**, v.17, p.1061-1064, 2001.

CASTRO, H.F.; OLIVEIRA, P.C.; SOARES, C.M.F.; ZANIN, G.M. Immobilization of porcine pancreatic lipase on celite for application in the synthesis of butyl butyrate in a nonaqueous system. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, p.147-152, 1999.

CASTRO, H.F.; SILVA, M.L.C.P; SILVA, G.L.J.P. Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.17, p.456-463, 2000

CHANG, S-W.; SHAW, J-F.; YANG, K-H.; CHANG, S-F.; SHIEH, C-J. Studies of optimum conditions for covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(c-glutamic acid) by RSM. **Bioresource Technology**, v.99, p.2800–2805, 2008.

CHATTOPADHYAY, S.; SEN, R. A comparative performance evaluation of jute and eggshell matrices to immobilize pancreatic lipase. **Process Biochemistry**, v.47, p.749–757, 2012.

CHEN, G-J.; KUO, C-H.; CHEN, C-I.; YU, C-C.; SHIEH, C-J.; LIU, Y-C. Effect of membranes with various hydrophobic/hydrophilic properties on lipase immobilized activity and stability. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.113, p.166–172, 2012.

CHEN, J-P.; HWANG, Y-N. Polyvinyl formal resin plates impregnated with lipase-entrapped sol–gel polymer for flavor ester synthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.513–519, 2003.

CHEN, J-P.; LIN, W-S. Sol-gel powders and supported sol-gel polymers for immobilization of lipase in ester synthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.801–811, 2003.

CHIOU, S-H.; WU, W-T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v.25, p.197-204, 2004.

CHOWDARY, G.V.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: multivariate analysis. **Process Biochemistry,** v.186, p.331-339, 2001.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolated of *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.20, p.193–197, 2004.

COLLINS, S.E.; LASSALLE, V.; FERREIRA, M.L. FTIR-ATR characterization of free *Rhizomucor meihei* lipase (RML), Lipozyme RM IM and chitosan-immobilized RML. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.72, p.220– 228, 2011.

COSTAS, L.; BOSIO, V.E.; PANDEY, A.; CASTRO, G.R. Effects of organic solvents on immobilized lipase in pectin microspheres. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.151, p.578–586, 2008.

COSTA-SILVA, T.A. **Caracterização bioquímica e secagem em "spray dryer" de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii.*** Ribeirão Preto, 2010. Dissertação de mestrado. Departamento de Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

COSTA-SILVA, T.A.; NOGUEIRA, M.A.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P.; SAID, S. Lipase production by endophytic fungus C*ercospora kikuchii*: stability of enzymatic activity after spray drying in the presence of carbohydrates. **Drying Technology**, v.29, p.1112 -1219, 2011.

COSTA-SILVA, T.A.; SAID, S.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Stabilization of endophytic fungus *Cercospora kikuchii* lipase by spray drying in presence of maltodextrin and β-cyclodextrin. **Drying Technology**, v. 28, p.1245-1254, 2010.

CRUZ JR, A.; PACHECO, S.M.V.; FURIGO JR, A. Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B em esferas de quitosana para obtenção de biodiesei por transesterificação de óleo de mamona. **In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica,** 2007.

CUI, Y.; LI, Y.; YANG, Y.; LIU, X.; LEI, L.; ZHOU, L.; PAN, F. Facile synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe_3O_4 nanoparticles and application for lipase immobilization. **Journal of Biotechnology**, v.150, p.171–174, 2010.

CUNHA, A.G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; BEVILAQUA, J.V.; DESTAIN, J.; PAIVA, L.M.C.; FREIRE, D.M.G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase - a comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.146, p.49–56, 2008.

D'SOUZA, R.A. Immobilized enzymes in bioprocess. Disponível em: http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles15.htm, Acesso em fevereiro de 2011.

DA RÓS, P.C.M.; SILVA, G.M.M.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; 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. **Bioresource Technology**, v.101, p.5508–5516, 2010.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.D.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, n.4, p.623-630, 2004.

DEMARCHE, P.; JUNGHANNS, C.; NAIR, R.R.; AGATHOS, S.N. Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship, **Biotechnology Advances**, v.30, p.933-953, 2012.

DEREWENDA, U.; BRZOZOWSKI, A.M.; LAWSON, D.M.; DEREWENDA, Z.S. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**, v.31, p.1532–1541, 1992.

DHAKE, K.P.; KAROYO, A.H.; MOHAMED, M.H.; WILSON, L.D.; BHANAGEA, B.M. Enzymatic activity studies of *Pseudomonas cepacia* lipase adsorbed onto copolymer supports containing β-cyclodextrin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.87, p.105–112, 2013.

DHAKE, K.P.; DESHMUKHA, K.M.; PATIL, Y.P.; SINGHAL, R.S.; BHANAGEA, B.M. Improved activity and stability of *Rhizopus oryzae* lipase via immobilization for citronellol ester synthesis in supercritical carbon dioxide. **Journal of Biotechnology**, v.156, p.46– 51, 2011.

DIAS, F.S; QUEIROZ, D.C.; NASCIMENTO, R.F.; LIMA, M.B. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. **Química Nova**, v.31, p.160-163, 2008.

DICKENSHEET, P.A.; CHEN, L.F.; TSAO, G.T. Characterization of yeast invertase immobilised on porous cellulose beads. **Biotechnology and Bioengineering**, v.19, p.365-375, 1977.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D.Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; KESKINLER, B. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, v.100, p.1983–1991, 2009.

DREYFUSS, M.M.; CHAPELA, I.H. **In the discovery of natural products whith terapeutical potential**; Gullo, V.P., Ed. Butterworth-Heinemann, p.49-79, Boston, 1994.

DUMOULIN, E.; BIMBENET, J.J. Mechanical physical and chemical phenomena during fooding drying: consequences on properties of dried products. **Proceedings of International Drying Symposium (IDS'98)**, Halkidiki, Greece, v. A, p.711-718, 1998.

ELNASHAR, M.M.M.; MOSTAFA, H.; MORSY, N.A.; AWAD, G.E.A.A. Biocatalysts: isolation, identification, and immobilization of thermally stable lipase onto three novel biopolymeric supports. **Industrial Engineering Chemical Research**, v.52, p.14760−14767, 2013.

ETZEL, M.R. Enzyme inactivation in a droplet forming a bubble during drying. **Journal of Food Engineering**, v.27, p.17-34, 1996.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, 3rd, Springer-Verlag, Berlin, 1997.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN. P.; SABUQUILLO. P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J.M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.93, p.185-97, 1998.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; GODOY, C.A.; MENDES, A.A.; LOPEZ-GALLEGO, F.; GRAZU, V.; RIVAS, B.; PALOMO, J.M.; HERMOSO, J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose. **Biomacromolecules**, v.9, p.2553–2561, 2008.

FERNÁNEZ-SALGUEIRO, J.; GÓMEZ, R.; CARMONA, M.A. Water activity in selected high-moisture foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.6, p.364-399, 1993.

FORESTI, M.L.; ALIMENTI, G.A.; FERREIRA, M.L. Interfacial activation and bioimprinting of *Candida rugosa* lipase immobilized on polypropylene: effect on the enzymatic activity in solvent-free ethyl oleate synthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.338-349, 2005.

FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.769–777, 2007.

FREITAS, L.; PAULA, A.V.; SANTOS, J.C.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO_2-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.65, p.87–90, 2010.

GANDHI, N.N. Applications of lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.74, p.621-634, 1997.

GAO, S.; WANG, Y.; DIAO, X.; LUO, G.; DAI, Y. Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15. **Bioresource Technology**, v.101, p.3830–3837, 2010.

GARCIA, C.M. **Transesterificação de óleos vegetais**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2006

GARCIA-GALAN, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis & Catalysis,** v.353, p.2885–904, 2011.

GATFIELD, I.L.; HOLZMINDEN, G.R. Enzymatic and microbial generation of flavors. **Perfumer & Flavorist,** v.20, p.5-14, 1995.

GHOSH, P.K.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R.; YADAV, R.P.; DAVIDSON, S. Microbial lipases: production and applications. **Science Progress**, v.79, p.119-157, 1996.

GIESLER, L. J. **Purple seed stain and *Cercospora Blight*.** Disponível em: http://pdc.unl.edu/agriculturecrops/soybean/purpleseedstain. Acessado em 19/02/2013.

GIORNO, L.; D'AMORE, E.; DRIOLI, E.; CASSANO, R.; PICCI, N. Influence of –OR ester group length on the catalytic activity and enantioselectivity of free lipase and immobilized in membrane used for the kinetic resolution of naproxen esters. **Journal of Catalysis**, v.247, p.194–200, 2007.

GODDARD, J.M.; HOTCHKISS, J.H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. **Progress in Polymer Science**, v.32, p.698-725, 2007.

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

GOMES, F.M.; PEREIRA, E.B.; CASTRO, H.F. Immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis. **Biomacromolecules**, v.5, p.17-23, 2004.

GOMES, F.M.; SANTOS, G.S.; CONTE, R.M.; PINATTI, D.G.; CASTRO, H.F. Wood cellulignin as an alternative matrix for enzyme immobilization. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.121–124, p.255–268, 2005.

GREGG, S.J.; SING, K.S.W. **Adsorption, surface area, and porosity**. London, Academic Press, 1982. 303p.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: A review. **Separation and Purification Technlogy**, v.38, p.43-74, 2004.

GUNNLAUGSDOTTIR, H.; WANNERBERGER, K.; SIVIK, B. Alcoholysis and glyceride synthesis with immobilized lipase on controlled pore glass of varying hydrophobicity in supercritical carbon dioxide. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.360–367, 1998.

GUO, L.D.; HYDE, K.D.; LIEW, E.C.Y. Identification of endophytic fungi from *Livistonia chinensis* based on morphology and rDNA sequences. **New Phytologist**, v.147, p.617-630, 2000.

GUO, Z.; BAI, S.; SUN, Y. Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.776–782, 2003.

GUPTA, M.; MATTIASSON, B. Unique applications of immobilized proteins in bioanalytical systems. **Methods of Biochemical Analysis**, v.36, p.1–34, 1992.

GUPTA, P.; DUTT, K.; MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; SAXENA, R.K. Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. **Bioresource Technology**, v.100, p.4074–4076, 2009.

HALLING, P.J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. **Enzyme Microbial Technology**, v.16, p.178–206, 1994.

HARA, P.; HANEFELD, U; KANERVA, L.T. Sol-gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v.*50*, p.80-86, 2008.

HAMES, D.B. An introduction to polyacrilamide gel electrophoresis. In: **Gel electroforesis of proteins**. Hames, D.B. & Rickwood, D., Oxford: IRL Press, 1987. p.290.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.12, p.145-178, 2006.

HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme Microbial Technology**, v.48, p.107–22, 2011a.

HERNANDEZ, K.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene–divinylbenzene beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.446–450, 2011b.

HOLM, H.C.; COWAN, D. The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, p.679–691, 2008.

HORCHANI, H.; BUAZIZ, A.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Immobilized *Staphylococcus xylosus* lipase-catalysed synthesis of ricinoleic acid esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.75, p.35– 42, 2012.

HUANG, X-J.; CHEN, P-C.; HUANG, F.; OU, Y.; CHEN, M-R.; XU, Z-K. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.70, p.95–100, 2011.

HUNG, T-C.; GIRIDHAR, R.; CHIOU, S-H.; WU, W-T. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.26, p.69–78, 2003.

HUTT, A.J.; CALDWELL, J. The importance of stereochemistry in the clinical pharmacokinetics of the 2-arypropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Clinical Pharmacokinet**, v.9, p.371-373, 1984.

HWANG, S.; AHN, J.; LEE, S.; LEE, T.G.; HAAM, S.; LEE, K.; AHN, I-S.; JUNG, J-K. Evaluation of cellulose-binding domain fused to a lipase for the lipase immobilization. **Biotechnology Letters**, v.26, p.603–605, 2004.

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry. Physical Chemistry Division. Commission on colloid and surface chemistry. Recommendations for the characterization of porous solids. **Pure and Applied Chemistry**, v.66, p.1739-1758, 1994.

JACOB, S.; SHIRWAIKAR, A.A.; SRINIVASAN, K.K.; ALEX, J.; PRABU, S.L.; MAHALAXMI, R.; KUMAR, R. Stability of proteins in aqueous solution and solid state. **Indian Journal Pharmaceutical Sciencie**, v.68, p.154-163, 2006.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends and Biotechnology**, v.16, p.396-403, 1998.

JENJOB, S.; SUNINTABOON, P.; INPRAKHON, P.; ANANTACHOKE, N.; REUTRAKUL, V. Chitosan-functionalized poly(methyl methacrylate) particles by spinning disk processing for lipase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v.89, p.842– 848, 2012.

JESUS, P.C.; JOÃO, J.J.; SILVA, P.L.F.; BURLIN, G.; NASCIMENTO, M.G. Organo-gel: um novo sistema para a imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica. **QUÍMICA NOVA**, v.20, p.664-672, 1997.

JÚNIOR, P.C.A.; CORRÊA, P.C.; SILVA, F.S.; RIBEIRO, D.S. Water activity, microbiological increase and dry matter loss of the coffee grains (*Coffea arabica*) in different storage conditions. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.5, p.17-24, 2003.

KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v.40, p.1525-1530, 2005.

KAMORI, M.; HORI, T.; YAMASHITA, Y.; HIROSE, Y.; NAOSHIMA, Y. Immobilization of lipase on a new inorganic ceramics support, toyonite, and the reactivity and enantioselectivity of the immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.9, p.269–274, 2000.

KANG, Y.; HE, J.; GUO, X.; SONG, Z. Influence of pore diameters on the immobilization of lipase in SBA-15. **Industrial Engineering Chemical Research,** v.46, p.4474-4479, 2007.

KARAGOZ, B.; BAYRAMOGLU, G.; ALTINTAS, B.; BICAK, N.; M. ARICA, M.Y. Poly(glycidyl methacrylate)-polystyrene diblocks copolymer grafted nanocomposite microspheres from surface-initiated atom transfer radical polymerization for lipase immobilization: application in flavor ester synthesis. **Industrial Engineering Chemical Research,** v.49, p.9655–9665, 2010.

KARTAL, F.; JANSSEN, M.H.A.; HOLLMANN, F.; SHELDON, R.A.; KILINC, A. Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.71, p.85–89, 2011.

KASCHE, V.; HAUFLER, U.; RIECHMANN, L. Kinetically controlled semisynthesis of β-lactam antibiotics and peptides. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.434, p.99-105, 1984.

KATZBAUER, B.; NARODOSLAWSKY, M.; MOSER, A. Classification system for immobilisation techniques. **Bioprocess Engeneering**, v.12, p.173–179, 1995.

KENNEDY, J.F.; WHITE, C.A.; MELO, E.H.M. The immobilization of enzymes and cells. **Chimica Oggi**, v.5, p.21–29, 1988.

KIM, S.; JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, C.; DALE, E. Enzymes for pharmaceutical applications—a cradle-to-gate life cycle assessment. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v.14, p.392-400, 2009.

KIM, M.H.; AN, S.; WON, K.; KIM, H.J.; LEE, S.H. Entrapment of enzymes into cellulose–biopolymer composite hydrogel beads using biocompatible ionic liquid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.75, p.68– 72, 2012.

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

KIM, S.H.; KIM, S-J.; PARK, S.; KIM, H.K. Biodiesel production using cross-linked *Staphylococcus haemolyticus* lipase immobilized on solid polymeric carriers. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.85– 86, p.10–16, 2013.

KNEZEVIC, Z.; MOJOVIC, L.; ADNADJEVIC, B. Palm oil hydrolysis by lipase from *Candida cylindracea* immobilized on zeolite type Y. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.275-280, 1998.

KONDO, T. The relationship between intramolecular hydrogen bonds and certain physical properties of regioselectively substituted cellulose derivatives. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v.35, p.717-723, 1997.

KRAMER, M.; CRUZA, J.C.; PFROMA, P.H.; REZACA, M.E.; CZERMAKA, P. Enantioselective transesterification by *Candida antarctica* lipase B immobilized on fumed silica. **Journal of Biotechnology**, v.150, p.80–86, 2010.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v.46, p.1-27, 2000.

KUMAR, A.; KANWAR, S.S. Synthesis of ethyl ferulate in organic medium using celite-immobilized lipase. **Bioresource Technology**, v.102, p.2162–2167, 2011.

KUMAR, D.; NAGAR, S.; BHUSHAN, I.; KUMAR, L.; PARSHAD, R.; GUPTA, V.K. Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v.87, p.51-61, 2013.

KUO, C-H.; LIU, Y-C.; CHANG, C-M.J.; CHEN, J-H.; CHENG, C.; SHIEH, C-J. Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe_3O_4 nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.2538– 2545, 2012.

LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LARA, P.V.; PARK, E.Y. Potential application of waste actived bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p.270-277, 2004.

LEE, D.H.; PARK, C.H.; YEO, J.M.; KIM, S.W. Lipase immobilization on silica gel using a cross-linking method. **Journal Industrial Engineering Chemical**, v.12, p. 777-782, 2006.

LEI, L.; BAI, Y.; LI, Y.; YI, L.; YANG, Y.; XIA, C. Study on immobilization of lipase on to magnetic microspheres with epoxy groups. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.321, p.252–258, 2009.

LEUENBERGER, H.G.W., Biotransformations - A Useful tool in organic chemistry. **Pure & Applied Chemistry**, v.62. p.753–768, 1990.

LIMA, L.N.; ARAGONA, C.C.; MATEO, C.; PALOMO, J.M.; GIORDANO, R.L.C.; TARDIOLI, P.W.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent attachment. **Process Biochemistry**, v.48, p.118–123, 2013.

LÓPEZ, N.; PÉREZ, R.; VÁZQUEZ, F.; VALERO, F.; SÁNCHES, A. Immobilisation of different lipases by adsorption onto polypropylene powder: application to chiral synthesis of ibuprofen and trans-2-phenyl-1-cyclohexanol esters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.77, p.175-182, 2002.

LÓPEZ-SERRANO, P.; CAO, L.; RANTWIJK, F.; SHELDON, R.A. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. **Biotechnology Letters**, v.24, p.1379–1383, 2002.

LUSTOSA, C.F.P. **Aplicação do extrato e dos resíduos das folhas de *Tithonia diversifolia* como adubo orgânico e agente anti-edematogênico em edema de planta induzido por carragenina e veneno de *Bothrops jararaca.*** São Jose dos Campos, 2005, 72p. Dissertação de mestrado. Universidade do Vale do Paraíba.

MA, L.; PERSSON, M.; ADLERCREUTZ, P. Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.1024-1029, 2002.

MAA, Y.F.; HSU, C.C. Protein denaturation by combined effect of shear and air-liquid interface. **Biotechnology and Bioengineering**, v.54, p.503-512, 1997.

MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Ciências e Tecnologia dos Alimentos**, v.17, p.115-119, 1997.

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 Biochemistry**, v.38, p.715-721, 2002.

MAHMOOD, I.; GUO, C.; XIA, H.; MA, J.; JIANG, Y.; LIU, H. Lipase immobilization on oleic acid-pluronic (L-64) block copolymer coated magnetic nanoparticles, for hydrolysis at the oil/water interface. **Industrial Engineering Chemical Research**, v.47, p.6379–6385, 2008.

MALCATA, F.X.; REYES, H.R.; GARCIA, H.S.; HILL, C.G.; AMUNDSON, C.H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – A review. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.67, p.890-910, 2009.

MANRICH, A.; GALVÃO, C.M.A.; JESUS, C.D.F.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C. Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.43, p.54-61, 2008.

MARKOGLOU, N.; WAINER, I. **Bioanalytical separations**. WILSON, I. D., ed. Elsevier Science: New York, cap. 7, 2003.

MARKOGLOU, N.; WAINER, I.W. **Methods in enzymology immobilized enzymes**. Academic Press: New York, vol. 44, 1976.

MARTINS, T.S. **Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50862).** Rio de Janeiro, 2007. 101p. Dissertação de mestrado - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microbial Technology**, v.40, p.1451–63, 2007.

MATSUSHIMA, A.; KODERA, Y.; HIROTO, M.; NISHIMURA, H.; INADA, Y.; Bioconjugates of proteins and polyethylene glycol: potent tools in biotechnological processes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.2, p.1-17,1996.

MAYORDOMO, I.; RANDEZ-GIL, F.; PIETRO, J.A. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulas.* **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.105-109, 2000.

MEHER, L.C.; DHARMAGADDA, V.S.S.; NAIK, S.N. Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Ongomia pinnata* oil for production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v.97, p.1392-1397, 2006.

MENDES, A.A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para síntese enzimática de biodiesel**. São Carlos, 2009. 225p. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos.

MENDES, A.A.; BARBOSA, B.C.M.; SILVA, M.L.C.; CASTRO, H.F. Morphological, biochemical and kinetic properties of lipase from *Candida rugosa* immobilized in zirconium phosphate. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, p.393-400, 2007.

MENDES, A.A.; BARBOSA, B.C.M.; SOARES, C.M.F.; SILVA, M.L.C.P.; CASTRO, H.F. Atividade e estabilidade operacional de lipase imobilizada em fosfato de zircônio na ausência e presença de polietilenoglicol. **Acta Science Technology**, v. 28, p.133-140, 2006.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; JÚNIOR, A.F. Aplicações de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v.28, p.296-305, 2005.

MENDES, A.A.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C.; CASTRO, H.F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.68, p.109–115, 2011.

MENG, X.; XU, G.; ZHOU, Q-L.; WU, J-P.; YANG, L-R. Improvements of lipase performance in high-viscosity system by immobilization onto a novel kind of poly(methylmethacrylate-co-divinylbenzene) encapsulated porous magnetic microsphere carrier. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.89, p.86–92, 2013.

MENONCIN, S.; DOMINGUES, N.M.; FREIRE, D.M.G.; OLIVEIRA, J.V.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciências e Tecnologia dos Alimentos**, v.29, p.440-443, 2009.

MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M.J.; WALDRON, K.C. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **Biotechniques**, v.37, p.790–802, 2004.

MIRANDA, M.; SILVA, M.L.C.P.; CASTRO, H.F. Optimised immobilisation of microbial lipase on hydrous niobium oxide. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, p.566–572, 2006.

MOJOVIĆ, L., KNEŽEVIĆ, Z. AND S. JOVANOVIĆ. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on a polymer support. **First Balkan Conference of Microbiology**, Plovdiv, Bulgaria, Book of Abstracts AM 30, p.234-239, 1999.

MONDAL, K.; MEHTA, P.; MEHTA, B.R.; VARANDANI, D.; GUPTA, M.N. A bioconjugate of *Pseudomonas cepacia* lipase with alginate with enhanced catalytic efficiency. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1764, p.1080–1086, 2006.

MONTERO, S.; BLANCO, A.; VIRTO, M.D.; LANDETA, L.C.; AGUD, I.; SOLOZABAL, R.; LASCARAY, J.M.; RENOBALES, M.; LLAMA, M.J.; SERRA, J.L. Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. **Enzyme and Microbiol Technology**, v.15, p.239-247, 1993.

MOREAU, V.H. Produção experimental de biodiesel por transesterificação enzimática. **Revista da Rede de Ensino Ftc**, n.12, p.1-14, 2008.

MOREIRA, A.B.R.; PEREZ, V.H.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica–PVA composite. **Energy & Fuels**, v.21, p.3689–3694, 2007.

MURALIDHAR, R.V.; CHIRUMAMILLA, R.R.; MARCHANT, R.; RAMACHANDRAN, V.N.; WARD, O.P.; NIGAM, P. Understanding lipase stereoselectivity, **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.18, p.81-97, 2002.

MURGATROYD, K.; BUTLER, L.D.; KINNARNEY, K.; MONGER, P. **Good pharmaceutical freeze-drying practice**, Peter Cameron (ed.), 1997.

NADRUZ, W.; LEÃO, I.C.; KRIEGER, N.; PIMENTEL, M.C.B.; LEDINGHAM, W.M.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L.; KENNEDY, J.F. Characterisation of *Candida rugosa* lipase immobilised on alkyl-amine glass beads. **Genetic Engineering and Biotechnology**, v.14, p.143-148, 1994.

NIELSEN, P.M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, p.692–700, 2008.

NIETO, I.; ROCCHIETTI, S.; UBIALI, D.; SPERANZA, G.; MORELLI, C.F.; FUENTES, I.E.; ALCANTRA, A.R.; TERRENI, M. Immobilization of different protein fractions from *Rhizomucor miehei* lipase crude extract enzymatic resolution of (R,S)-2-tetralol. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.514–520, 2005.

NORENÃ, C.Z.; HUBINGER, M.D.; MENEGALLI, F.C. Técnicas básicas de determinação de atividade de água: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.91-96, 1996.

OLIVEIRA, A.C.; ROSA, M.F.; AIRES–BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Enzymatic esterification of ethanol by an immobilised *Rhizomucor miehei* lipase in a perforated rotating disc bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.446–450, 2000a.

OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; CASTRO, H. F. Immobilization studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. **Biochemical Engineering Journal**, v.5, p.63-71, 2000b.

OLIVEIRA, P.C.; ALVES, G.M.; MEI, L.H.I.; CASTRO, H.F. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, v.23, p.345-352, 2000c.

ORREGO, C.E.; SALGADO, N.; VALENCIA J.S.; GIRALDO, G.I.; GIRALDO, O.H.; CARDONA, C.A. Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: Characterization aspects. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p.9–16, 2010.

OSBOURN, A. Host-microbe interactions: molecular intimacy exposed: probing plant-fungus interactions. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 4, p. 363-364, 2001.

OXENBØLL, K.; ERNST, S. Environment as a new perspective on the use of enzymes in the food industry. **Food Science and Technology**, v.22, p.35–37, 2008.

OZYILMAZ, G. The effect of spacer arm on hydrolytic and synthetic activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on silica gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v.56, p.231–236, 2009.

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.

PAIVA, E.J.M. **Estudo da produção de biodiesel a partir de óleo de babaçu e etanol utilizando a transesterificação alcalina tradicional com agitação mecânica e assistida por ultrassons**. 173 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

PAIVA, E.J.M.; DA SILVA, M.L.C.P.; BARBOZA, J.C.S.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F.; GIORDANI, D.S. Non-edible babassu oil as a new source for energy production - a feasibility transesterification survey assisted by ultrasound, **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p.833-838, 2013.

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

PALOMO, J.M.; SEGURA, R.L.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Glutaraldehyde modification of lipases adsorbed on aminated supports: A simple way to improve their behaviour as enantioselective biocatalyst. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.704–707, 2007.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R.; NIGAN, P. Solid state fermentation for production of industrial enzyimes. **Current Science**, v.77, p.1153-1159, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products. **Process biochemistry**, v.35, p.1153-1169, 2000.

PARK, E. Y.; SATO, M.; KOJIMA, S. Fatty acid methyl ester production using lipase-immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.889-896, 2006.

PAULA, A.V.; MOREIRA, A.B.R.; BRAGA, L.P.; BRUNO, L.M.; CASTRO, H.F. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Quimica Nova**, v.31, p.35-40, 2008.

PAULA, A.V.; NUNES, G.F.M.; FREITAS, L.; CASTRO, F.H.; SANTOS, J.C. Interesterification of milkfat and soybean oil blends catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.65, p.117–121, 2010.

PENG, Y.; ZHU-PING, H.; YONG-JUAN, X.; PENG-CHENG, H.; JI-JUN, T. Effect of support surface chemistry on lipase adsorption and activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.94, p.69–76, 2013.

PEREIRA, E.B.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Esterification activity and stability of *Candida rugosa* lipase immobilized into chitosan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98, p.997-986, 2002.

PEREIRA, E.B.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Kinetic studies of lipase from C*andida rugosa*: A comparative study between free and immobilized enzyme onto porous chitosan beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.91, p.739-752, 2001.

PEREIRA, E.B.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.20, p.343-355, 2003.

PEREZ, V.H.; SILVA, G.S.; GOMES, F.M.; CASTRO, H.F. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, p.13–19, 2007.

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. **In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, p.1-5, 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**, v.52–53, p.27–33, 2008a.

PINHEIRO, R.C.; SOARES, C.M.F.; SANTOS, O.A.A.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Response surface methodology as an approach to determine optimal activities of lipase entrapped in sol–gel matrix using different vegetable oils. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.146, p.203–214, 2008b.

POPPE, J.K.; COSTA, A.P.O.; BRASIL, M.C.; RODRIGUES, R.C.; AYUB, M.A. Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: Characterization and application in transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.94, p.57– 62, 2013.

POSPISKOVAA, K.; SAFARI, I. Low-cost, easy-to-prepare magnetic chitosan microparticles for enzymes immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v.96, p.545–548, 2013.

RAMANI, K.; KARTHIKEYANA, S.; BOOPATHYA, R.; KENNEDYB, L.J.; MANDALA, A.B.; SEKARANA, G. Surface functionalized mesoporous activated carbon for the immobilization of acidic lipase and their application to hydrolysis of waste cooked oil: Isotherm and kinetic studies. **Process Biochemistry**, v.47, p.435–445, 2012.

RANJBAKHSH, E.; BORDBARA, A.K.; ABBASIA, M.; KHOSROPOURA, A.R.; SHAMSA, E. Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v.179, p.272– 276, 2012.

REN, Y.; RIVERA, J.G.; HE, L.; KULKARNI, H.; LEE, D-K.; MESSERSMITH, P.B. Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. **Bio Medical Center Biotechnology**, v.11, p.55-63, 2011.

RESLOW, M.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. On the importance of the support material for bioorganic synthesis: Influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water-poor reaction media. **European Jounal of Biochemistry**, v.172, p.573-578, 1988.

RODRIGUES, D.S.; MENDESA, A.A.; ADRIANO, W.S.; GONÇALVES, L.R.B.; GIORDANO, R.L.C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.51, p.100–109, 2008.

RODRIGUES, F.A. **Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de bagaço de cana**. Campinas, 2007. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.

RODRIGUES, R.C.; BERENGUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v.353, p.2216–38, 2011.

ROMDHANE, I.B.B.; ROMDHANE, Z.B.; GARGOURI, A., BELGHITH, H. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.68, p.230–239, 2011.

RORRER, G.L., HSIEN, T.Y.; Way, J.D. Synthesis of porous-magnetic chitosan beads for removal of cadmium ions from waste water. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.32, p.2170-2178, 1993.

ROSSET, I.G.; TAVARES, M.C.H.; ASSAF, E.M.; PORTO, A.L.M. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and ^{1}H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General**, v.392, p.136-142, 2011.

ROY, A.; CHAWLA, H.P.S. Biocatalysis in organic solvents: a process for multigram synthesis of 1,4:3,6-dianhydro-D-glucitol 2-acetate and its isomeric 5-acetate using immobilized lipase from *Pseudomonas* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.490–493, 2001.

RUBINI, M.R.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; POMELLA, A.W.; MAKI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; SANTOS, D.R.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International J. Biological Sciences**, v.72, p.24-33, 2005.

RUIZ, M.; GALVIS, M.; BARBOSA, O.; ORTIZ,C.; TORRES, R.; Fernandez-Lafuente, R. Solid-phase modification with succinic polyethyleneglycol of aminated lipase B from *Candida antarctica*: Effect of the immobilization protocol on enzyme catalytic properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.87, p.75–82, 2013.

SAFARIK, I.; HORSKA, K.; POSPISKOVA, K.; SAFARIKOVA, M. One-step preparation of magnetically responsive materials from non-magnetic powders. **Powder Technology**, v.23, p.122-129, 2012.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Cap. 1, p. 1 – 7, Ed. Legis Summa, 2004.

SALAZAR, R.F.S.; SILVA, G.L.P.; SILVA, M.L.C.P. **Estudo da composição da palha de milho para posterior utilização como suporte na preparação de compósitos**. In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Unicamp, 2005.

SANCHES, E.M.; BELLE, J.F.; ROIG, M.G.; BURGUILLO, F.J.; MORENO, J.M.; SINISTERRA, J.V. Kinetic and enantioselective behavior of the lipase from *Candida cylindracea*: A comparative study between the soluble enzyme and the enzyme immobilized on agarose and silica gels. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.468-476, 1996.

SANTOS, F.A.; QUEIRÓZ, J.H.; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova***,* v.35, p.1004-1010, 2012.

SANTOS, J.C.; MIJONE, P.D.; NUNES, G.F.M.; PEREZ, V.H.; CASTRO, H.F. Covalent attachment of *Candida rugosa* lipase on chemically modified hybrid matrix of polysiloxane–polyvinyl alcohol with different activating compounds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.61, p.229–236, 2008b.

SANTOS, J.C.; NUNES, G.F.M.; MOREIRA, A.B.R.; PEREZ, V.H.; CASTRO, H.F. Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized on poly(n-methylolacrylamide) and its application in butyl butyrate synthesis. **Chemical Engineering Technology**, v.30, p.1255–1261, 2007.

SANTOS, J.C.; PAULA, A.V.; NUNES, G.F.M.; CASTRO, H.F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane–polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.52–53, p.49–57, 2008c.

SANTOS, J.C.; PAULA, A.V.; ROCHA, C.G.F.; NUNES, G.F.M.; CASTRO, H.F. Morphological and mechanical properties of hybrid matrices of polysiloxane–polyvinyl alcohol prepared by sol–gel technique and their potential for immobilizing enzyme. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v.354, p.4823–4826, 2008a.

SAXENA, R.K. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v.52, p.1-18, 2003.

SAXENA, R.K.; GHOSH, P.K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W.S.; BRADOO, S.; GULATI, R. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**, 77, p.101-115, 1999.

SCHALL, R. **Estimation in generalized linear models with random effects**. Biometrika. Vol. 78, nº. 4, 719-727, 1991.

SCHMID, R.D.; VERGER, R. **Interfacial enzymes with attractive applications**. Angewandte Chemie International Edition, v.37, p.1608-33,1998.

SCHRAG, J.D.; LI, Y.; CYGLER, M.; LANG, D.; BURGDORF, T.; HECHT, H.J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDE, T.J.; OLIVER, J.D.; STRICKLAND, L.C.; DUNAWAY, C.M.; LARSON, S.B.; DAY,J.; MCPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas lipase*. **Structure**, v.5, p.187–202, 1997.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R.M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.9, p.199-210, 1998.

SCHULTZ, N.; SYLDATK, C.; FRANZREB, M.; HOBLEY, T.J. Integrated processing and multiple re-use of immobilised lipase by magnetic separation technology. **Journal of Biotechnology**, v.132, p.202–208, 2007.

SCHULTZ, N.; SYLDATK, C.; FRANZREB, M.; HOBLEY, T.J. Integrated processing and multiple re-use of immobilised lipase by magnetic separation technology. **Journal of Biotechnology**, v.132, p.202–208, 2013.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, Cambridge, v.106, p.996-1004, 2002.

SEBRÃO, D.; SILVA, V.D.; NASCIMENTO, M.G.; MOREIRA, M.A. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. **Química Nova**, v.30, p.1182-1187, 2007.

SÉVERAC, E.; GALY, O.; TUROND, F.; PANTELE, C.A.; CONDORETE, J-S.; MONSANA, P.; MARTY, A. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. **Enzyme and Microbial Technology**, v.48, p.61–70, 2011.

SHAKERI, M.; KAWAKAMI, K. Significant changes in the transesterification activity of free and mesoporous-immobilized *Rhizopus oryzae* lipase in ionic liquids. **Journal of Biotechnology**, v.145, p.281–283, 2010.

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

SHELDON, R.A. Enzyme Immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v.349, p.1289-1307, 2007.

SHIBATA, T.M.M. **Atividade de água no controle microbiológico**. 2013. Disponível em: http://aqualab.decagon.com.br/noticias/seminario/ . Acesso em: 15 mar. 2013.

SHU, C.; CAIA, J.; HUANGA, L. ZHUA, X.; XUA, Z. Biocatalytic production of ethyl butyrate from butyric acid with immobilized *Candida rugosa* lipase on cotton cloth. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.72, p.139–144, 2011.

SILVA, G.S.; INOUE, D.Y.; DORS, G.; FURIGO-JUNIOR, A.; CASTRO, H.F. Desempenho de diferentes lipases imobilizadas na síntese de biodiesel de óleo de palma. **Acta Scientiarum Technology**, v.33, p.197-203, 2011.

SIMÕES, A.S.; MORI, R.Y.; FARIA, R.; CASTRO, H.F.; MENDES, A.A. Desempenho da matriz híbrida SiO_2-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa.* **Química Nova**, v.34, p.33-38, 2011.

SIÓDMIAKA, T.; ZIEGLER-BOROWSKAB, M.; MARSZAŁŁA, M.P. Lipase-immobilized magnetic chitosan nanoparticles for kinetic resolution of (R,S)-ibuprofen. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.94, p.7–14, 2013.

SOARES, C.M.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.77, p.745-756, 1999.

SOARES, C.M.; CASTRO, H.F.; SANTANA, M.H.A.; ZANIN, G.M. Intensification of lipase performance for long-term operation by immobilization on controlled pore silica in presence of polyethylene glycol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98–100, p.863-874, 2002.

SOARES, C.M.F.; CASTRO, H.F.; ITAKO, J.E.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Characterization of sol-gel bioencapsulates for ester hydrolysis and synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121–124, p.845-858, 2005.

SOARES, C.M.F.; CASTRO, H.F.; SANTANA, M.H.A.; ZANIN, G.M. Selection of stabilizing additive for lipase immobilization on controlled pore silica by factorial design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.9, p.703-718, 2001.

SOARES, C.M.F.; SANTANA, M.H.A.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F. Covalent coupling method for lipase immobilization on controlled pore silica in the presence of nonenzymatic proteins. **Biotechnology Progress**, v.19, p.803-807, 2003.

SOARES, C.M.F.; SANTANA, M.H.A.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, v.26, p.832-838, 2003.

SOARES, C.M.F.; SANTOS, O.A.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Studies on immobilized lipase in hydrophobic sol-gel. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.113–116, p.307-319, 2004.

SOARES, C.M.F.; SANTOS, O.A.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Characterization of sol–gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.39, p.69–76, 2006.

SOUZA, C.R.F. **Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bahinia forficata* Link pelos processos de *spray-dryer* e leito de jorro.** Ribeirão Preto, 2003. 180p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

SOUZA, C.R.F. **Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras: estudo da viabilidade técnica e econômica do processo de leito de jorro**. Ribeirão Preto, 2007. 219p. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

STAMAKIS, H.; XANAKIS, A. Biocatalysis using microemulsion-based polymer gels containing lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.6, p.399-406, 1999.

STROBEL, G.A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, p.315-333, 2002.

STROBEL, G.A.; BRYN, D.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal Natural Products**, v.67, p.257-268, 2004.

SVAROVSKY, Y.L. **Powder testing guide methods of measuring the physicals properties of bulk powders.** New York: Elsevier Applied Science, 1987, 146 p.

SYNOWIECKI, J.; SIONDALSKA, S.A.; El-BEDAWEY, A.F. Adsorption of enzymes on krill chitin modified with carbon disulfide. **Biotechnology Bioengineering,** v.29, p.352-354, 1987.

TAIPA, M.A.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Purification of lipases. **Journal of Biotechnology**, v.26, p.111–142, 1992.

TANG, Z-X.; QIAN, J-Q.; SHI, L-E. Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles. **Materials Letters**, v.61, p.37–40, 2007.

TATTINI JR, V.; PARRA, D.F.; PITOMBO, R.N.M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, p.127-136, 2006.

TRAN, D-T.; CHEN, C-L.; CHAN, J-S. Immobilization of *Burkholderia* sp. lipase on a ferric silica nanocomposite for biodiesel production. **Journal of Biotechnology**, v.158, p.112–119, 2012.

TRAN, D.N.; BALKUS-JR, K.J. Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. **Catalysis**, v.1, p.956–968, 2011.

TREVISAN, H.C. Lipases. In: Said S.; Pietro R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**, Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004, Cap.6, p.115-135.

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 a-pinene. **Bioresource Technology**, v.101, p.1587–1594, 2010.

URIOSTE, D.; CASTRO, M.B.A.; BIAGGIO, F.C.; CASTRO, H.F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, v.31, p.407-412, 2008.

URSINI, A.; MARAGNI, P.; BISMARA, C.; TAMBURINI, B. Enzymatic method of preparation of optically active trans-2-amino cyclohexanol derivatives. **Synth Commun**, v.29, p.1369–1377, 1999.

VAIDYA, A.; GERA, G.; RAMAKRISHNA, S. Evaluation and optimization of immobilized lipase for esterification of fatty acid and monohydric alcohol. **World Journal Microbiol Biotechnology**, v.24, p.2987–2995, 2008a.

VAIDYA, B.K.; INGAVLE, G.C.; PONRATHNAM, S.; KULKARNI, B.D.; NENE, S.N. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles. **Bioresource Technology**, v.99, p.3623–3629, 2008b.

VERGER R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v.15, p.32–8, 1997.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v.25, p.515-536, 2007.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic**, v.9, p.143-148, 2000.

VISENTAINER, J.V.; FRANCO, M.R.B. **Ácidos graxos em óleos e gorduras: Identificação e quantificação**, São Paulo: Varela, 2006, p. 120.

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genet Bull***,* v.13, p.42-43, 1956.

VULFSON, N.E. Enzymatic synthesis of food ingredients in low water media.**Trends in Food Science & Technology,** v.4, p.209-215, 1993.

XIE, W.; MA, N. Immobilized lipase on Fe_3O_4 nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production. **Energy & Fuels**, v.23, p.1347-1353, 2009.

WALT, D.R.; AGAYN, V.I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. **Trends in Analytical Chemistry**, v.13, p.425–30, 1994.

WANG, J-Y.; MA, C-L.; BAO, Y-M.; XU, P-S. Lipase entrapment in protamine-induced bio-zirconia particles: Characterization and application to the resolution of (R,S)-1-phenylethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, v.51, p.40–46, 2012.

WANG, W.; JIANG, Y.; ZHOU, L.; GAO, J. Comparison of the properties of lipase immobilized onto mesoporous resins by different methods. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.164, p.561–572, 2011.

WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v.55, p.798–806, 1997.

WILSON, L.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ILLANES, A.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of the functional properties of a thermostable lipase from alcaligenes sp. via strong adsorption on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.975–980, 2006.

WILSON, M.B.; NAKANE, P.K. The covalent coupling of proteins to periodate-oxidized sephadex: a new approach to immunoadsorbent preparation. **Journal of Immunological Methods**, v.12, p.171-181, 1976.

WONG, S.S.; WONG, L.J.C. Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. **Enzyme Microbial Technology**, v.14, p.866–74, 1992.

WU, C.; ZHOU, G.; JIANG, X.; MA, J.; ZHANG, H.; SONG, H. Active biocatalysts based on *Candida rugosa* lipase immobilized in vesicular silica. **Process Biochemistry**, v.47, p.953–959, 2012.

WU, Y.; WANG, Y.; LUO, G.; DAI, Y. In situ preparation of magnetic Fe_3O_4-chitosan nanoparticles for lipase immobilization by cross-linking and oxidation in aqueous solution. **Bioresource Technology**, v.100, p.3459–3464, 2009.

XIN, J.Y.; LI, S.B.; XU, Y.; CHUI, J.R.; XIA, C.G. Dynamic enzymatic resolution of naproxen methyl ester in a membrane bioreactor. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v.76, p.579-585, 2001.

YAN, J.; YAN, Y.; LIU, S.; HU, J.; WANG, G. Preparation of cross-linked lipase-coated micro-crystals for biodiesel production from waste cooking oil. **Bioresource Technology**, v.102, p.4755–4758, 2011.

YANG, G.; WU, J.; XU, G.; YANG, L. Improvement of catalytic properties of lipase from *Arthrobacter* sp. by encapsulation in hydrophobic sol–gel materials. **Bioresource Technology**, v.100, p.4311–4316, 2009.

YANG, J.; LIU, L.; CAO, X. Combination of bioimprinting and silane precursor alkyls improved the activity of sol–gel-encapsulated lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.257–261, 2010.

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

YILMAZ, E.; CAN, K.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester. **Bioresource Technology**, v.102, p.499–506, 2011.

YÜCEL, Y. Biodiesel production from pomace oil by using lipase immobilized onto olive pomace. **Bioresource Technology**, v.102, p.3977–3980, 2011.

ZANIN, G.M. **Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada**. 454 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1989.

ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. **Em Enzimas como Agentes Biotecnológicos**; Said, S.; Pietro, R.C.L.R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004, cap. 4.

ZHANG, L.Q.; ZHANG, Y.D.; XU, L.; LI, X.L.; GAO, H.Y.; DU, W.B. Lipase-catalyzed synthesis of RGD diamide in aqueous water-miscible organic solvents. **Enzyme Microbial Technology**, v.29, p.29-35, 2001.

Apêndice

A seguir estão apresentadas as tabelas referentes às análises estatísticas dos resultados obtidos pelas diferentes técnicas de imobilização desenvolvidas neste trabalho.

Tabela A-1. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada em subprodutos agroindustriais por adsorção e secagem em estufa de convecção forçada de ar.

Efeito	Suporte	Secagem	Suporte	Secagem	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	Estufa	Casca de Arroz	Estufa	0,4667	0,3953	-0,6334	1,5667
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	Estufa	Casca de Coco	Estufa	3,4667	**<,0001**	2,3666	4,5667
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	Estufa	Celulose M. Cristalina	Estufa	-4,9667	**<,0001**	-6,0667	-3,8666
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	Estufa	Palha de Milho	Estufa	9,7000	**<,0001**	8,6000	10,8000
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	Estufa	Sabugo de Milho	Estufa	3,4000	**<,0001**	2,3000	4,5000
Suporte*Secagem	Casca de Arroz	Estufa	Casca de Coco	Estufa	3,0000	**<,0001**	1,9000	4,1000
Suporte*Secagem	Casca de Arroz	Estufa	Celulose M. Cristalina	Estufa	-5,4333	**<,0001**	-6,5334	-4,3333
Suporte*Secagem	Casca de Arroz	Estufa	Palha de Milho	Estufa	9,2333	**<,0001**	8,1333	10,3334
Suporte*Secagem	Casca de Arroz	Estufa	Sabugo de Milho	Estufa	2,9333	**<,0001**	1,8333	4,0334
Suporte*Secagem	Casca de Coco	Estufa	Celulose M. Cristalina	Estufa	-8,4333	**<,0001**	-9,5334	-7,3333
Suporte*Secagem	Casca de Coco	Estufa	Palha de Milho	Estufa	6,2333	**<,0001**	5,1333	7,3334
Suporte*Secagem	Casca de Coco	Estufa	Sabugo de Milho	Estufa	-0,06667	0,9029	-1,1667	1,0334
Suporte*Secagem	Celulose M. Cristalina	Estufa	Palha de Milho	Estufa	14,6667	**<,0001**	13,5666	15,7667
Suporte*Secagem	Celulose M. Cristalina	Estufa	Sabugo de Milho	Estufa	8,3667	**<,0001**	7,2666	9,4667
Suporte*Secagem	Palha de Milho	Estufa	Sabugo de Milho	Estufa	-6,3000	**<,0001**	-7,4000	-5,2000

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior

Tabela A-2. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada em subprodutos agroindustriais por adsorção e secagem em liofilizador.

Efeito	Suporte	Secagem	Suporte	Secagem	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	Liofilização	Casca de Arroz	Liofilização	-15,7000	**<,0001**	-16,8000	-14,6000
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	Liofilização	Casca de Coco	Liofilização	-0,4667	0,3953	-1,5667	0,6334
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	Liofilização	Celulose M. Cristalina	Liofilização	-16,1000	**<,0001**	-17,2000	-15,0000
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	Liofilização	Palha de Milho	Liofilização	-8,0000	**<,0001**	-9,1000	-6,9000
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	Liofilização	Sabugo de Milho	Liofilização	-12,9333	**<,0001**	-14,0334	-11,8333
Suporte*Secagem	Casca de Arroz	Liofilização	Casca de Coco	Liofilização	15,2333	**<,0001**	14,1333	16,3334
Suporte*Secagem	Casca de Arroz	Liofilização	Celulose M. Cristalina	Liofilização	-0,4000	0,4656	-1,5000	0,7000
Suporte*Secagem	Casca de Arroz	Liofilização	Palha de Milho	Liofilização	7,7000	**<,0001**	6,6000	8,8000
Suporte*Secagem	Casca de Arroz	Liofilização	Sabugo de Milho	Liofilização	2,7667	**<,0001**	1,6666	3,8667
Suporte*Secagem	Casca de Coco	Liofilização	Celulose M. Cristalina	Liofilização	-15,6333	**<,0001**	-16,7334	-14,5333
Suporte*Secagem	Casca de Coco	Liofilização	Palha de Milho	Liofilização	-7,5333	**<,0001**	-8,6334	-6,4333
Suporte*Secagem	Casca de Coco	Liofilização	Sabugo de Milho	Liofilização	-12,4667	**<,0001**	-13,5667	-11,3666
Suporte*Secagem	Celulose M. Cristalina	Liofilização	Palha de Milho	Liofilização	8,1000	**<,0001**	7,0000	9,2000
Suporte*Secagem	Celulose M. Cristalina	Liofilização	Sabugo de Milho	Liofilização	3,1667	**<,0001**	2,0666	4,2667
Suporte*Secagem	Palha de Milho	Liofilização	Sabugo de Milho	Liofilização	-4,9333	**<,0001**	-6,0334	-3,8333

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior

Tabela A-3. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada em subprodutos agroindustriais por adsorção e secagem em “spray dryer”.

Efeito	Suporte	Secagem	Suporte	Secagem	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	*spray dryer*	Casca de Arroz	*spray dryer*	-2,0667	**0,0005**	-3,1667	-0,9666
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	*spray dryer*	Casca de Coco	*spray dryer*	8,7667	**<,0001**	7,6666	9,8667
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	*spray dryer*	Celulose M. Cristalina	*spray dryer*	-4,2667	**<,0001**	-5,3667	-3,1666
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	*spray dryer*	Palha de Milho	*spray dryer*	0,5333	0,3320	-0,5667	1,6334
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	*spray dryer*	Sabugo de Milho	*spray dryer*	3,7667	**<,0001**	2,6666	4,8667
Suporte*Secagem	Casca de Arroz	*spray dryer*	Casca de Coco	*spray dryer*	10,8333	**<,0001**	9,7333	11,9334
Suporte*Secagem	Casca de Arroz	*spray dryer*	Celulose M. Cristalina	*spray dryer*	-2,2000	**0,0003**	-3,3000	-1,1000
Suporte*Secagem	Casca de Arroz	*spray dryer*	Palha de Milho	*spray dryer*	2,6000	**<,0001**	1,5000	3,7000
Suporte*Secagem	Casca de Arroz	*spray dryer*	Sabugo de Milho	*spray dryer*	5,8333	**<,0001**	4,7333	6,9334
Suporte*Secagem	Casca de Coco	*spray dryer*	Celulose M. Cristalina	*spray dryer*	-13,0333	**<,0001**	-14,1334	-11,9333
Suporte*Secagem	Casca de Coco	*spray dryer*	Palha de Milho	*spray dryer*	-8,2333	**<,0001**	-9,3334	-7,1333
Suporte*Secagem	Casca de Coco	*spray dryer*	Sabugo de Milho	*spray dryer*	-5,0000	**<,0001**	-6,1000	-3,9000
Suporte*Secagem	Celulose M. Cristalina	*spray dryer*	Palha de Milho	*spray dryer*	4,8000	**<,0001**	3,7000	5,9000
Suporte*Secagem	Celulose M. Cristalina	*spray dryer*	Sabugo de Milho	*spray dryer*	8,0333	**<,0001**	6,9333	9,1334
Suporte*Secagem	Palha de Milho	*spray dryer*	Sabugo de Milho	*spray dryer*	3,2333	**<,0001**	2,1333	4,3334

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior

Tabela A-4. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada em subprodutos agroindustriais por adsorção: comparação da secagem em liofilizador, “spray dryer” e estufa.

Efeito	Suporte	Secagem	Suporte	Secagem	Estimativa	Valor p	L.I.	L.S.
Suporte*Secagem	Casca de Arroz	Estufa	Casca de Arroz	Liofilização	-16,5667	**<,0001**	-17.6667	-15.4666
Suporte*Secagem	Casca de Arroz	Estufa	Casca de Arroz	spray dryer	-22,2333	**<,0001**	-23,3334	-21,1333
Suporte*Secagem	Casca de Arroz	Liofilização	Casca de Arroz	spray dryer	-5,6667	**<,0001**	-6,7667	-4,5666
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	Estufa	Bagaço de Cana	Liofilização	-0,4000	0,4656	-1,5000	0,7000
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	Estufa	Bagaço de Cana	spray dryer	-19,7000	**<,0001**	-20,8000	-18,6000
Suporte*Secagem	Bagaço de Cana	Liofilização	Bagaço de Cana	spray dryer	-19,3000	**<,0001**	-20,4000	-18,2000
Suporte*Secagem	Casca de Coco	Estufa	Casca de Coco	Liofilização	-4,3333	**<,0001**	-5,4334	-3,2333
Suporte*Secagem	Casca de Coco	Estufa	Casca de Coco	spray dryer	-14,4000	**<,0001**	-15,5000	-13,3000
Suporte*Secagem	Casca de Coco	Liofilização	Casca de Coco	spray dryer	-10,0667	**<,0001**	-11,1667	-8,9666
Suporte*Secagem	Celulose M. Cristalina	Estufa	Celulose M. Cristalina	Liofilização	-11,5333	**<,0001**	-12,6334	-10,4333
Suporte*Secagem	Celulose M. Cristalina	Estufa	Celulose M. Cristalina	spray dryer	-19,0000	**<,0001**	-20,1000	-17,9000
Suporte*Secagem	Celulose M. Cristalina	Liofilização	Celulose M. Cristalina	spray dryer	-7,4667	**<,0001**	-8,5667	-6,3666
Suporte*Secagem	Palha de Milho	Estufa	Palha de Milho	Liofilização	-18,1000	**<,0001**	-19,2000	-17,0000
Suporte*Secagem	Palha de Milho	Estufa	Palha de Milho	spray dryer	-28,8667	**<,0001**	-29,9667	-27,7666
Suporte*Secagem	Palha de Milho	Liofilização	Palha de Milho	spray dryer	-10,7667	**<,0001**	-11,8667	-9,6666
Suporte*Secagem	Sabugo de Milho	Estufa	Sabugo de Milho	Liofilização	-16,7333	**<,0001**	-17,8334	-15,6333
Suporte*Secagem	Sabugo de Milho	Estufa	Sabugo de Milho	spray dryer	-19,3333	**<,0001**	-20,4334	-18,2333
Suporte*Secagem	Sabugo de Milho	Liofilização	Sabugo de Milho	spray dryer	-2,6000	**<,0001**	-3,7000	-1,5000

Tabela A-5. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em subprodutos agroindustriais utilizando metaperiodato de sódio e secagem em leito de jorro.

Efeito	Suporte	Agente ligante	Conc	Suporte	Agente ligante	Conc	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Metaperiodato	1,5	Casca de Arroz	Metaperiodato	1,5	-16,2667	**<,0001**	-17,1157	-15,4177
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Metaperiodato	1,5	Casca de Coco	Metaperiodato	1,5	11,9333	**<,0001**	11,0843	12,7823
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Metaperiodato	1,5	Celulose M. C.	Metaperiodato	1,5	-10,4667	**<,0001**	-11,3157	-9,6177
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Metaperiodato	1,5	Palha de Milho	Metaperiodato	1,5	-13,0000	**<,0001**	-13,8490	-12,1510
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Metaperiodato	1,5	Sabugo de Milho	Metaperiodato	1,5	-10,6000	**<,0001**	-11,4490	-9,7510
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Metaperiodato	1,5	Casca de Coco	Metaperiodato	1,5	28,2000	**<,0001**	27,3510	29,0490
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Metaperiodato	1,5	Celulose M. C.	Metaperiodato	1,5	5,8000	**<,0001**	4,9510	6,6490
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Metaperiodato	1,5	Palha de Milho	Metaperiodato	1,5	3,2667	**<,0001**	2,4177	4,1157
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Metaperiodato	1,5	Sabugo de Milho	Metaperiodato	1,5	5,6667	**<,0001**	4,8177	6,5157
Suporte*Agente*Conc	Casca de Coco	Metaperiodato	1,5	Celulose M. C.	Metaperiodato	1,5	-22,4000	**<,0001**	-23,2490	-21,5510
Suporte*Agente*Conc	Casca de Coco	Metaperiodato	1,5	Palha de Milho	Metaperiodato	1,5	-24,9333	**<,0001**	-25,7823	-24,0843
Suporte*Agente*Conc	Casca de Coco	Metaperiodato	1,5	Sabugo de Milho	Metaperiodato	1,5	-22,5333	**<,0001**	-23,3823	-21,6843
Suporte*Agente*Conc	Celulose M. C.	Metaperiodato	1,5	Palha de Milho	Metaperiodato	1,5	-2,5333	**<,0001**	-3,3823	-1,6843
Suporte*Agente*Conc	Celulose M. C.	Metaperiodato	1,5	Sabugo de Milho	Metaperiodato	1,5	-0,1333	0,7562	-0,9823	0,7157
Suporte*Agente*Conc	Palha de Milho	Metaperiodato	1,5	Sabugo de Milho	Metaperiodato	1,5	2,4000	**<,0001**	1,5510	3,2490

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior

Tabela A-6. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em subprodutos agroindustriais utilizando epicloridrina e secagem em leito de jorro.

Efeito	Suporte	Agente ligante	Conc	Suporte	Agente ligante	Conc	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Epicloridrina	1,5	Casca de Arroz	Epicloridrina	1,5	-22,8333	**<,0001**	-23,6823	-21,9843
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Epicloridrina	1,5	Casca de Coco	Epicloridrina	1,5	-11,8000	**<,0001**	-12,6490	-10,9510
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Epicloridrina	1,5	Celulose M. C.	Epicloridrina	1,5	-17,6667	**<,0001**	-18,5157	-16,8177
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Epicloridrina	1,5	Palha de Milho	Epicloridrina	1,5	-21,7333	**<,0001**	-22,5823	-20,8843
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Epicloridrina	1,5	Sabugo de Milho	Epicloridrina	1,5	-20,0000	**<,0001**	-20,8490	-19,1510
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Epicloridrina	1,5	Casca de Coco	Epicloridrina	1,5	11,0333	**<,0001**	10,1843	11,8823
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Epicloridrina	1,5	Celulose M. C.	Epicloridrina	1,5	5,1667	**<,0001**	4,3177	6,0157
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Epicloridrina	1,5	Palha de Milho	Epicloridrina	1,5	1,1000	**0,0116**	0,2510	1,9490
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Epicloridrina	1,5	Sabugo de Milho	Epicloridrina	1,5	2,8333	**<,0001**	1,9843	3,6823
Suporte*Agente*Conc	Casca de Coco	Epicloridrina	1,5	Celulose M. C.	Epicloridrina	1,5	-5,8667	**<,0001**	-6,7157	-5,0177
Suporte*Agente*Conc	Casca de Coco	Epicloridrina	1,5	Palha de Milho	Epicloridrina	1,5	-9,9333	**<,0001**	-10,7823	-9,0843
Suporte*Agente*Conc	Casca de Coco	Epicloridrina	1,5	Sabugo de Milho	Epicloridrina	1,5	-8,2000	**<,0001**	-9,0490	-7,3510
Suporte*Agente*Conc	Celulose M. C.	Epicloridrina	1,5	Palha de Milho	Epicloridrina	1,5	-4,0667	**<,0001**	-4,9157	-3,2177
Suporte*Agente*Conc	Celulose M. C.	Epicloridrina	1,5	Sabugo de Milho	Epicloridrina	1,5	-2,3333	**<,0001**	-3,1823	-1,4843
Suporte*Agente*Conc	Palha de Milho	Epicloridrina	1,5	Sabugo de Milho	Epicloridrina	1,5	1,7333	**<,0001**	0,8843	2,5823

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior

Tabela A-7. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em subprodutos agroindustriais utilizando glutaraldeído e secagem em leito de jorro.

Efeito	Suporte	Agente ligante	Conc	Suporte	Agente ligante	Conc	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Glutaraldeído	1,5	Casca de Arroz	Glutaraldeído	1,5	-17,2333	**<,0001**	-18,0823	-16,3843
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Glutaraldeído	1,5	Casca de Coco	Glutaraldeído	1,5	54,2000	**<,0001**	53,3510	55,0490
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Glutaraldeído	1,5	Celulose M. C.	Glutaraldeído	1,5	-22,8000	**<,0001**	-23,6490	-21,9510
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Glutaraldeído	1,5	Palha de Milho	Glutaraldeído	1,5	-13,0667	**<,0001**	-13,9157	-12,2177
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Glutaraldeído	1,5	Sabugo de Milho	Glutaraldeído	1,5	13,8667	**<,0001**	13,0177	14,7157
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Glutaraldeído	1,5	Casca de Coco	Glutaraldeído	1,5	71,4333	**<,0001**	70,5843	72,2823
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Glutaraldeído	1,5	Celulose M. C.	Glutaraldeído	1,5	-5,5667	**<,0001**	-6,4157	-4,7177
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Glutaraldeído	1,5	Palha de Milho	Glutaraldeído	1,5	4,1667	**<,0001**	3,3177	5,0157
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Glutaraldeído	1,5	Sabugo de Milho	Glutaraldeído	1,5	31,1000	**<,0001**	30,2510	31,9490
Suporte*Agente*Conc	Casca de Coco	Glutaraldeído	1,5	Celulose M. C.	Glutaraldeído	1,5	-77,0000	**<,0001**	-77,8490	-76,1510
Suporte*Agente*Conc	Casca de Coco	Glutaraldeído	1,5	Palha de Milho	Glutaraldeído	1,5	-67,2667	**<,0001**	-68,1157	-66,4177
Suporte*Agente*Conc	Casca de Coco	Glutaraldeído	1,5	Sabugo de Milho	Glutaraldeído	1,5	-40,3333	**<,0001**	-41,1823	-39,4843
Suporte*Agente*Conc	Celulose M. C.	Glutaraldeído	1,5	Palha de Milho	Glutaraldeído	1,5	9,7333	**<,0001**	8,8843	10,5823
Suporte*Agente*Conc	Celulose M. C.	Glutaraldeído	1,5	Sabugo de Milho	Glutaraldeído	1,5	36,6667	**<,0001**	35,8177	37,5157
Suporte*Agente*Conc	Palha de Milho	Glutaraldeído	1,5	Sabugo de Milho	Glutaraldeído	1,5	26,9333	**<,0001**	26,0843	27,7823

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior

Tabela A-8. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em subprodutos agroindustriais utilizando glutaraldeído e secagem em estufa.

Efeito	Suporte	Secagem	Conc	Suporte	Secagem	Conc	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Estufa	1,5	Casca de Arroz	Estufa	1,5	-0,2000	0,8339	-2,0941	1,6941
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Estufa	1,5	Casca de Coco	Estufa	1,5	30,7667	**<,0001**	28,8726	32,6607
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Estufa	1,5	Celulose M. C.	Estufa	1,5	6,7333	**<,0001**	4,8393	8,6274
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Estufa	1,5	Palha de Milho	Estufa	1,5	-28,3667	**<,0001**	-30,2607	-26,4726
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Estufa	1,5	Sabugo de Milho	Estufa	1,5	8,4333	**<,0001**	6,5393	10,3274
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Estufa	1,5	Casca de Coco	Estufa	1,5	30,9667	**<,0001**	29,0726	32,8607
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Estufa	1,5	Celulose M. C.	Estufa	1,5	6,9333	**<,0001**	5,0393	8,8274
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Estufa	1,5	Palha de Milho	Estufa	1,5	-28,1667	**<,0001**	-30,0607	-26,2726
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Estufa	1,5	Sabugo de Milho	Estufa	1,5	8,6333	**<,0001**	6,7393	10,5274
Suporte*Agente*Conc	Casca de Coco	Estufa	1,5	Celulose M. C.	Estufa	1,5	-24,0333	**<,0001**	-25,9274	-22,1393
Suporte*Agente*Conc	Casca de Coco	Estufa	1,5	Palha de Milho	Estufa	1,5	-59,1333	**<,0001**	-61,0274	-57,2393
Suporte*Agente*Conc	Casca de Coco	Estufa	1,5	Sabugo de Milho	Estufa	1,5	-22,3333	**<,0001**	-24,2274	-20,4393
Suporte*Agente*Conc	Celulose M. C.	Estufa	1,5	Palha de Milho	Estufa	1,5	-35,1000	**<,0001**	-36,9941	-33,2059
Suporte*Agente*Conc	Celulose M. C.	Estufa	1,5	Sabugo de Milho	Estufa	1,5	1,7000	0,0778	-0,1941	3,5941
Suporte*Agente*Conc	Palha de Milho	Estufa	1,5	Sabugo de Milho	Estufa	1,5	36,8000	**<,0001**	34,9059	38,6941

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior

Tabela A-9. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em subprodutos agroindustriais utilizando glutaraldeído e secagem em liofilizador.

Efeito	Suporte	Secagem	Conc	Suporte	Secagem	Conc	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Liofilizador	1,5	Casca de Arroz	Liofilizador	1,5	-8,7333	**<,0001**	-10,6274	-6,8393
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Liofilizador	1,5	Casca de Coco	Liofilizador	1,5	64,7333	**<,0001**	62,8393	66,6274
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Liofilizador	1,5	Celulose M. C.	Liofilizador	1,5	69,1000	**<,0001**	67,2059	70,9941
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Liofilizador	1,5	Palha de Milho	Liofilizador	1,5	-2,8000	**0,0043**	-4,6941	-0,9059
Suporte*Agente*Conc	Bagaço de Cana	Liofilizador	1,5	Sabugo de Milho	Liofilizador	1,5	25,3667	**<,0001**	23,4726	27,2607
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Liofilizador	1,5	Casca de Coco	Liofilizador	1,5	73,4667	**<,0001**	71,5726	75,3607
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Liofilizador	1,5	Celulose M. C.	Liofilizador	1,5	77,8333	**<,0001**	75,9393	79,7274
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Liofilizador	1,5	Palha de Milho	Liofilizador	1,5	5,9333	**<,0001**	4,0393	7,8274
Suporte*Agente*Conc	Casca de Arroz	Liofilizador	1,5	Sabugo de Milho	Liofilizador	1,5	34,1000	**<,0001**	32,2059	35,9941
Suporte*Agente*Conc	Casca de Coco	Liofilizador	1,5	Celulose M. C.	Liofilizador	1,5	4,3667	**<,0001**	2,4726	6,2607
Suporte*Agente*Conc	Casca de Coco	Liofilizador	1,5	Palha de Milho	Liofilizador	1,5	-67,5333	**<,0001**	-69,4274	-65,6393
Suporte*Agente*Conc	Casca de Coco	Liofilizador	1,5	Sabugo de Milho	Liofilizador	1,5	-39,3667	**<,0001**	-41,2607	-37,4726
Suporte*Agente*Conc	Celulose M. C.	Liofilizador	1,5	Palha de Milho	Liofilizador	1,5	-71,9000	**<,0001**	-73,7941	-70,0059
Suporte*Agente*Conc	Celulose M. C.	Liofilizador	1,5	Sabugo de Milho	Liofilizador	1,5	-43,7333	**<,0001**	-45,6274	-41,8393
Suporte*Agente*Conc	Palha de Milho	Liofilizador	1,5	Sabugo de Milho	Liofilizador	1,5	28,1667	**<,0001**	26,2726	30,0607

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior

Tabela A-10. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada Quitosana: secagem em estufa e liofilizador.

Efeito	Imobilização	Secagem	Agente ligante	Imobilização	Secagem	Agente ligante	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Imob*Secagem*Agente	Adsorção	Estufa	ausente	Adsorção	Liofilizador	Ausente	-20,4333	**<,0001**	-21,5981	-19,2686
Imob*Secagem*Agente	Adsorção	Estufa	ausente	Ligação Covalente	Estufa	Glutaraldeído	-14,8667	**<,0001**	-16,0314	-13,7019
Imob*Secagem*Agente	Adsorção	Estufa	ausente	Ligação Covalente	Liofilizador	Glutaraldeído	-27,6000	**<,0001**	-28,7648	-26,4352
Imob*Secagem*Agente	Adsorção	Liofilizador	ausente	Ligação Covalente	Estufa	Glutaraldeído	5,5667	**<,0001**	4,4019	6,7314
Imob*Secagem*Agente	Adsorção	Liofilizador	ausente	Ligação Covalente	Liofilizador	Glutaraldeído	-7,1667	**<,0001**	-8,3314	-6,0019
Imob*Secagem*Agente	Ligação Covalente	Estufa	Glutaraldeído	Ligação Covalente	Liofilizador	Glutaraldeído	-12,7333	**<,0001**	-13,8981	-11,5686

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior

Tabela A-11. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em quitosana e secagem em leito fluidizado.

Efeito	Imobilização	Secagem	Agente ligante	Imobilização	Secagem	Agente ligante	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Imob*Secagem*Agente	Ligação Covalente	Leito fluidizado	Epicloridrina	Ligação Covalente	Leito fluidizado	Glutaraldeído	-33,2667	**<,0001**	-34,4314	-32,1019
Imob*Secagem*Agente	Ligação Covalente	Leito fluidizado	Epicloridrina	Ligação Covalente	Leito fluidizado	Metaperiodato	-11,3667	**<,0001**	-12,5314	-10,2019
Imob*Secagem*Agente	Ligação Covalente	Leito fluidizado	Glutaraldeído	Ligação Covalente	Leito fluidizado	Metaperiodato	21,9000	**<,0001**	20,7352	23,0648

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior

Tabela A-12. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em quitosana utilizando glutaraldeído: comparação dos secadores.

Efeito	Imobilização	Secagem	Agente ligante	Imobilização	Secagem	Agente ligante	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Imob*Secagem*Agente	Ligação Covalente	Estufa	Glutaraldeído	Ligação Covalente	Leito fluidizado	Glutaraldeído	-25,2667	**<,0001**	-26,4314	-24,1019
Imob*Secagem*Agente	Ligação Covalente	Estufa	Glutaraldeído	Ligação Covalente	Liofilizador	Glutaraldeído	-12,7333	**<,0001**	-13,8981	-11,5686
Imob*Secagem*Agente	Ligação Covalente	Leito fluidizado	Glutaraldeído	Ligação Covalente	Liofilizador	Glutaraldeído	12,5333	**<,0001**	11,3686	13,6981

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior

Tabela A-13. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. kikuchii* imobilizada em quitosana magnetizada e secagem em “spray dryer”: comparação das formulações de secagem.

Efeito	Secagem	Enzima	Formulação	Secagem	Enzima	Formulação	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Secagem*Enzima*Formul	*Spray dryer*	*C. kikuchii*	A	*Spray dryer*	*C. kikuchii*	B	13,6000	**<,0001**	12,6045	14,5955
Secagem*Enzima*Formul	*Spray dryer*	*C. kikuchii*	A	*Spray dryer*	*C. kikuchii*	C	22,2000	**<,0001**	21,2045	23,1955
Secagem*Enzima*Formul	*Spray dryer*	*C. kikuchii*	B	*Spray dryer*	*C. kikuchii*	C	8,6000	**<,0001**	7,6045	9,5955

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior

Tabela A-14. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. rugosa* imobilizada em quitosana magnetizada e secagem em "spray dryer": comparação das formulações de secagem.

Efeito	Secagem	Enzima	Formulação	Secagem	Enzima	Formulação	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Secagem*Enzima*Formul	*Spray dryer*	*C. rugosa*	A	*Spray dryer*	*C. rugosa*	B	6,7333	**<,0001**	5,7378	7,7289
Secagem*Enzima*Formul	*Spray dryer*	*C. rugosa*	A	*Spray dryer*	*C. rugosa*	C	19,3667	**<,0001**	18,3711	20,3622
Secagem*Enzima*Formul	*Spray dryer*	*C. rugosa*	B	*Spray dryer*	*C. rugosa*	C	12,6333	**<,0001**	11,6378	13,6289

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior

Tabela A-15. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase de *C. rugosa* imobilizada em subprodutos agroindustriais e secagem em leito de jorro.

Efeito	Secagem	Enzima	Agente ligante	Suporte	Secagem	Enzima	Agente ligante	Suporte	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Secagem*Agente*Suporte	Leito de jorro	*C. rugosa*	Glutaraldeído	Casca de Arroz	Leito de jorro	*C. rugosa*	Glutaraldeído	Celulose M. C.	5,1667	**<,0001**	4,0371	6,2963
Secagem*Agente*Suporte	Leito de jorro	*C. rugosa*	Glutaraldeído	Casca de Arroz	Leito de jorro	*C. rugosa*	Glutaraldeído	Palha de Milho	4,1667	**<,0001**	3,0371	5,2963
Secagem*Agente*Suporte	Leito de jorro	*C. rugosa*	Glutaraldeído	Celulose M. C.	Leito de jorro	*C. rugosa*	Glutaraldeído	Palha de Milho	-1,0000	0,0806	-2,1296	0,1296

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior

Tabela A-16. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase purificada de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em casca de arroz e secagem em leito de jorro.

Efeito	Secagem	Enzima	Agente ligante	Suporte	Secagem	Enzima	Agente ligante	Suporte	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Secagem*Agente*Suporte	Leito de jorro	*C. kikuchii*	Epicloridrina	Casca de Arroz	Leito de jorro	*C. kikuchii*	Glutaraldeído	Casca de Arroz	-50,5333	**<,0001**	-51,6629	-49,4037
Secagem*Agente*Suporte	Leito de jorro	*C. kikuchii*	Epicloridrina	Casca de Arroz	Leito de jorro	*C. kikuchii*	Metaperiodato	Casca de Arroz	-8,4333	**<,0001**	-9,5629	-7,3037
Secagem*Agente*Suporte	Leito de jorro	*C. kikuchii*	Glutaraldeído	Casca de Arroz	Leito de jorro	*C. kikuchii*	Metaperiodato	Casca de Arroz	42,1000	**<,0001**	40,9704	43,2296

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior

Tabela A-17. Resultado da análise estatística para retenção da atividade enzimática da lipase purificada de *C. kikuchii* imobilizada covalentemente em quitosana e secagem em leito fluidizado.

Efeito	Secagem	Enzima	Agente ligante	Suporte	Secagem	Enzima	Agente ligante	Suporte	Estimativa	Valor *p*	L.I.	L.S.
Secagem*Agente	Leito fluidizado	*C. kikuchii*	Epicloridrina	Quitosana	Leito fluidizado	*C. kikuchii*	Glutaraldeído	Quitosana	-18,6667	**<,0001**	-19,7963	-17,5371
Secagem*Agente	Leito fluidizado	*C. kikuchii*	Epicloridrina	Quitosana	Leito fluidizado	*C. kikuchii*	Metaperiodato	Quitosana	-9,6667	**<,0001**	-10,7963	-8,5371
Secagem*Agente	Leito fluidizado	*C. kikuchii*	Glutaraldeído	Quitosana	Leito fluidizado	*C. kikuchii*	Metaperiodato	Quitosana	9,0000	**<,0001**	7,8704	10,1296

L.I.: limite inferior; L.S.: limite superior