

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:

SISTEMAS DE PROCESSOS QUÍMICOS E INFORMÁTICA

**CARACTERIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E
ENCAPSULAMENTO DE LIPASE DE *Burkholderia cepacia***

Autora: Giovana da Silva Padilha

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Co-orientador: Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Maio/2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

P134c Padilha, Giovana da Silva
Caracterização, purificação e encapsulamento de lipase de Burkholderia cepacia / Giovana da Silva Padilha. --Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Elias Basile Tambourgi, Ranulfo Monte Alegre.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Lipase. 2. Sistemas aquosos bifásicos. 3. Gelificação iônica. 4. Purificação. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Alegre, Ranulfo Monte. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Characterization, purification and encapsulation of lipase from Burkholderia cepacia

Palavras-chave em Inglês: Lipase, Aqueous biphasic systems, Ionic gelation, Purification

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Alexandre Nunes Ponezi, Moacir Jorge Elias, Ana Paula Brescancini Rabelo, Alexandre Tadeu Paulino

Data da defesa: 28/05/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado, defendida por Giovana da Silva Padilha, em 28 de maio de 2010 e aprovada pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Dr. Elias Basile Tambourgi – orientador



Dr. Alexandre Nunes Ponezi



Dr. Moacyr Jorge Elias



Dra. Ana Paula Brescancini Rabelo



Dr. Alexandre Tadeu Paulino

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several fluid, overlapping loops and strokes, positioned above the name of the professor.

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi – orientador

Dedico este trabalho à minha família e em especial á minha mãe CECÍLIA e ao meu pai LUIZ ALBERTO “in memorian”, pelo grande incentivo aos estudos e por estarem sempre presentes em minha vida... Papai, a NANA conseguiu...

AGRADECIMENTOS

À Deus por me ajudar a alcançar mais um objetivo.

Ao meu querido orientador Elias Basile Tambourgi pela orientação, dedicação, amizade, confiança, incentivo e oportunidades proporcionadas durante o desenvolvimento deste trabalho que foram de grande valia para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu querido co-orientador Ranulfo Monte Alegre pela paciência, incentivo e horas passadas no laboratório na tentativa do trabalho ser o melhor possível. Dedico a este grande mestre grande parte dos resultados obtidos.

À amiga Juliana Ferrari Ferreira, muito obrigada pelo constante apoio e dedicação.

Ao meu irmão científico José Carlos Curvelo Santana pela paciência, grandes ensinamentos e algumas broncas que serviram para melhoria dos resultados.

Aos alunos do laboratório de Processos de Separação II da Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP pela ajuda, apoio e incentivo, em especial ao Petrus Pires Marques e Thayse Alves de Lima e Silva.

À Iara e Igor Bresolin pelas análises de eletroforese e ponto isoelétrico, além da amizade e constante ajuda.

À Claudia de Oliveira Viana do laboratório de Processos Fermentativos e Tratamento de Águas Residuárias da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP por toda a paciência e ajuda prestada durante os experimentos.

Aos alunos do Laboratório de Processos Fermentativos e Tratamento de Águas Residuárias da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP por terem gentilmente cedido

espaço para a realização deste trabalho, em especial, aos alunos de doutorado César Augusto Piedrahita-Aguirre e Renato Sano Coelho.

Ao professor Carlos Raimundo Ferreira Grosso do Departamento de Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP por abrir espaço para dúvidas e utilização do seu laboratório.

À Yara Fagnani Honório do laboratório do Departamento de Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP pelo apoio e ajuda dispensada no processo de encapsulamento da enzima.

À Kelly Roberta de Palma Souza do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração da Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao amigo Everaldo Leme da Siva pelo constante apoio.

À Silvia Rosana Módena Martini pelo apoio e boas conversas durante as viagens Mogi Guaçu/UNICAMP.

Ao meu irmão Rodrigo, por me aceitar e sempre acreditar em mim.

Às tias Vera e Léa e aos primos pelo apoio e incentivo.

À minha avó Odete (hoje com 94 anos) pelo apoio financeiro que me propiciou à formação de engenheira.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP por me abrirem as portas.

Ao Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos - DESQ - FEQ - UNICAMP pela oportunidade de continuar os meus estudos e a todos os professores e seus alunos que direta e indiretamente colaboraram com a execução deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que passaram pela minha vida acadêmica e que de alguma forma doaram um pouco de si para que minha formação universitária e conclusão deste trabalho se tornassem possíveis. Muito obrigada!!!

*Morre lentamente
quem se transforma em escravo do hábito,
repetindo todos os dias os mesmos trajetos, quem não muda de marca
não se arrisca a vestir uma nova cor ou não conversa com quem não conhece.*

*Morre lentamente
quem faz da televisão o seu guru.*

*Morre lentamente
quem evita uma paixão,
quem prefere o preto no branco
e os pingos sobre os "is" em detrimento de um redemoinho de emoções,
justamente as que resgatam o brilho dos olhos, sorrisos dos bocejos,
corações aos tropeços e sentimentos.*

*Morre lentamente
quem não vira a mesa quando está infeliz com o seu trabalho,
quem não arrisca o certo pelo incerto para ir atrás de um sonho,
quem não se permite pelo menos uma vez na vida, fugir dos conselhos sensatos.*

*Morre lentamente
quem não viaja, quem não lê,
quem não ouve música,
quem não encontra graça em si mesmo.*

*Morre lentamente
quem destrói o seu amor-próprio,
quem não se deixa ajudar.*

*Morre lentamente,
quem passa os dias queixando-se da sua má sorte
ou da chuva incessante.*

*Morre lentamente,
quem abandona um projeto antes de iniciá-lo,
não pergunta sobre um assunto que desconhece
ou não responde quando lhe indagam sobre algo que sabe*

*Evitemos a morte em doses suaves,
recordando sempre que estar vivo exige um esforço muito maior
que o simples fato de respirar. Somente a perseverança fará com que conquistemos
um estágio esplêndido de felicidade.*

PABLO NERUDA

RESUMO

O presente trabalho foi dividido em três etapas e teve como objetivo a caracterização, purificação e encapsulamento da lipase a partir da cepa de *Burkholderia cepacia*. Para produção da enzima, o microorganismo foi cultivado em meio contendo sais, extrato de levedura, peptona bacteriológica e 6% de óleo de soja, por fermentação líquida em biorreator do tipo Bioflo III. As fermentações foram conduzidas a 150 rpm em 30°C. Após 96 horas de cultivo, o sobrenadante foi separado das células por centrifugação e foi utilizado como extrato enzimático, uma vez que a *Burkholderia cepacia* produz lipase extracelular. O extrato bruto apresentou atividade usando azeite de oliva como substrato. Na primeira etapa do trabalho, analisou-se as condições ótimas de trabalho e estabilidade sob condições diversas e na presença de diferentes íons. A temperatura ótima foi a 37°C, no entanto a 50°C a enzima perdeu 10% da atividade em relação à temperatura em 37°C. O cálculo de energia de ativação, seguindo a equação de ARRHENIUS, foi de 10,1 kJ/mol. O efeito do pH sobre a hidrólise do azeite de oliva pela lipase foi investigado com diferentes tampões na faixa de pH entre 3 e 11. Foram mantidas aproximadamente 80% da atividade entre os pHs 5 e 7, com atividade máxima no pH 8. Atividades razoáveis foram obtidas mesmo nos valores mais ácidos de pH e menores atividades nos valores entre 9 e 11. No entanto, no pH 11 observou-se queda de 80% de atividade em relação à atividade ótima da lipase. A estabilidade da atividade enzimática em diferentes tampões e valores de pH 5, 8 e 11 também foi investigada, onde nas 4 horas de incubação a diferentes valores de pH, a enzima mostrou-se bastante estável. Um estudo de estabilidade com diferentes íons por incubação da lipase durante 30 dias também foi realizado. Íons como Mn^{2+} , Co^{2+} , I^- e Ca^{2+} mantiveram ou aumentaram a atividade enzimática, mas a enzima foi inibida na presença de Fe^{2+} , Hg^{2+} e Al^{3+} . À temperatura de 37 °C e pH 8 foi feita a determinação dos parâmetros cinéticos. Os dados obtidos experimentalmente permitiram a obtenção da curva cinética, que mostrou a influência da emulsão óleo e água contendo diferentes proporções de azeite de oliva (0,1 a 50% v/v) na velocidade de hidrólise pela lipase. De acordo com a metodologia de LINEWEAVER-BURK, calculou-se os valores de K_m e $V_{máx}$ de 43,90 mg/mL e 0,0258 U/mg, respectivamente. A segunda etapa foi purificar a lipase de *Burkholderia cepacia* em sistema bifásico aquoso polietileno glicol (PEG)/fosfato. Foram

preparadas soluções estoques de PEG com massas molares de 1500, 4000 e 6000 Da (50% m/m) e tampão fosfato nos pHs 6, 7 e 8 (20% m/m de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$). Um planejamento fatorial 2^3 foi feito para avaliar a massa molecular do PEG, pH e comprimento da linha de amarração (tie-line) no coeficiente de partição da atividade específica da lipase. Os resultados mostraram que maiores valores de atividade específica foram obtidos ao usar a menor massa molecular de PEG (1500 Da) em pH 6 e 8 e maior comprimento da linha de amarração. Após a purificação, determinou-se 33 kDa a massa molecular e 6,0 o ponto isoelétrico da lipase de *Burkholderia cepacia*. Na terceira etapa do trabalho, a enzima foi encapsulada por gelificação iônica usando alginato de sódio e cloreto de cálcio. Para a encapsulação foi feito um planejamento fatorial 2^2 variando o tamanho do bico atomizador (2 e 0,5 mm) e a concentração de CaCl_2 (2 e 4% m/v). A enzima imobilizada foi caracterizada quanto à eficiência de encapsulamento, estabilidade, tamanho médio e sua distribuição e morfologia. No estudo de estabilidade verificou-se, em todas as condições de processo, que a enzima imobilizada manteve maior estabilidade em relação ao extrato bruto durante os 28 dias analisados. Nas análises de microscopia óptica, as microcápsulas formadas apresentaram formas esféricas, com média de tamanho de 400 e 100 μm para os bicos de 2 e 0,5 mm, respectivamente. Nas análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), as microcápsulas foram secas em estufa e mantiveram as formas esféricas, com redução de tamanho, mesmo após esse processo de secagem. Usando o bico atomizador de 2 mm nas concentrações de 2 e 4% (m/v) de CaCl_2 , a microcápsula seca apresentou um tamanho de 139 e 150 μm , respectivamente, contra a média de 400 μm das hidratadas. Para o bico atomizador de 0,5 mm nas concentrações de 2 e 4% (m/v) de CaCl_2 , as microcápsulas apresentaram tamanhos de 15 e 6 μm , respectivamente.

Palavras chave: lipase, *Burkholderia cepacia*, sistema bifásico aquoso, gelificação iônica.

ABSTRACT

This work was divided into three stages and aimed the characterization, purification and encapsulation of the lipase from a strain of *Burkholderia cepacia*. For enzyme production, the microorganism was grown in medium containing salts, yeast extract, bacteriological peptone and 6% soybean oil, liquid fermentation in bioreactor type Bioflo III. The fermentations were performed at 150 rpm and 30°C. After 96 hours, the supernatant was separated from the cells by centrifugation and it was used as enzyme extract, since the *Burkholderia cepacia* produces extracellular lipase. In the first stage of this work, the enzymatic activity and stability were analyzed under different conditions and in the presence of different ions. The crude extract showed activity using olive oil as substrate. The optimum temperature was 37°C, however at 50°C the enzyme remained activity, with loss of activity of 10% compared to activity at 37°C. The calculation of activation energy, ARRHENIUS equation, was 10.1 kJ/mol. The effect of pH on hydrolysis of olive oil by lipase was investigated in the pH range between 3 and 11. About 80% of the activity was kept in the pH range between 5 and 7, with maximum activity at pH 8. Reasonable activities were obtained even in the more acidic pH values and lower activities in the values between 9 and 11. At pH 11 we observed a decrease of 80% of activity relative to the optimal activity of the enzyme. The stability of the enzyme activity of the crude extract in different buffers and pH values of 5, 8 and 11 was also investigated, where the 4 hour incubation at different pH values, the enzyme was stable. A stability study with different ions for incubation the lipase for 30 days was also realized. Ions such as Mn^{2+} , Co^{2+} , I^- and Ca^{2+} remained stable or increased enzyme activity but the enzyme was inhibited in the presence of Fe^{2+} , Hg^{2+} and Al^{3+} . The determination of kinetic parameters was performed at 37°C and pH 8. The data obtained experimentally allowed obtaining the kinetic curve, which showed the influence of oil-water emulsion containing different proportions of olive oil (0.1 to 50% v/v) at the rate of hydrolysis by the lipase. According to the method of LINEWEAVER-BURK, it was calculated K_m and V_{max} values of 43.90 mg/mL and 0.0258 U/mg, respectively. The second step was to purify the lipase from *Burkholderia cepacia* in a polyethylene glycol (PEG)/phosphate aqueous two-phase system. Stock solutions were prepared with PEG molecular mass of 1500, 4000 and 6000 Da (50% w/w) and phosphate buffer in pHs 6, 7 and 8 (20% w/w KH_2PO_4/K_2HPO_4). A factorial design 2^3 was made to

evaluate the molecular mass of PEG, pH and length of the tie-line in the partition coefficient of the enzyme specific activity. The results showed that higher values of specific activity of the enzyme were obtained when using the lower molecular mass PEG (1500 Da) at pH 6 and 8 and greater tie-line length. After purification, 33 kDa was determined for the molecular mass and 6.0 for the isoelectric point of the lipase from *Burkholderia cepacia*. In the third stage, the enzyme was encapsulated by ionic gelation using sodium alginate and calcium chloride. For the encapsulation, a factorial design 2^2 was made with 2 and 0.5 mm atomizer sizes and CaCl₂ (2 and 4% w/v) concentration. The immobilized enzyme was characterized as to its encapsulation efficiency, stability, size and distribution size, and morphology. In the 28 day stability study, it was found in all process conditions that the immobilized enzyme remained more stable compared to the crude extract. In optical microscopy, the formed microspheres were spherical with average size of 400 and 100 μm for the 2 and 0.5 mm nozzles respectively. In the scanning electron microscope (SEM) analyses, the microspheres were dried in oven and maintained their spherical shapes with size reduction, even after the drying process. Using a 2 mm atomizer in the 2 and 4% (w/v) CaCl₂ concentrations, the dry microcapsule presented a size of 139 and 150 μm respectively, against the average of hydrated 400 μm . For the 0.5 mm atomizer in 2 and 4% (w/v) concentrations the dry microcapsules were 15 and 6 μm , respectively.

Key words: lipase, *Burkholderia cepacia*, aqueous two-phase system, ionic gelation.

ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

- 1) PADILHA, G.S., FERREIRA, J.F., CASTIGLIONI, G.L., MONTE ALEGRE, R., TAMBOURGI, E.B. Evaluation of an extracellular lipase from *Pseudomonas cepacia* for purification in aqueous two-phase system. Aceito para publicação na revista *Ciência e Tecnologia de Alimentos* em 2010.
- 2) PADILHA, G.S., CURVELO SANTANA, J.C., ALEGRE, R.M., TAMBOURGI, E.B. Partitioning optimization of lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG 1500/phosphate aqueous two-phase system. Aceito para publicação na *Research & Reviews in BioSciences* em 2010.
- 3) PADILHA, G.S., FERREIRA, J.F., MONTE ALEGRE, R., TAMBOURGI, E.B. Efeitos do pH e massa molar do polímero sobre o sistema bifásico aquoso PEG/fosfato. Aceito para publicação na revista *Acta Scientiarum Technology* em 2011.

ARTIGOS PUBLICADOS

- 1) FERREIRA, J.F., PADILHA, G.S., TAMBOURGI, E.B. Efeitos da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/fosfatos. *Exacta*, v.7, n.1, p. 49 - 56, 2009.
- 2) PADILHA, G.S., CURVELO SANTANA, J.C., ALEGRE, R.M., TAMBOURGI, E. B. Expanded bed adsorption of an alkaline lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Journal of Chromatography B*, v.877, p. 521-526, 2009. [doi:10.1016/j.jchromb.2008.12.061](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.12.061)
- 3) PADILHA, G.S., CASTIGLIONI, G.L., ALEGRE, R.M., TAMBOURGI, E.B. Avaliação de diferentes íons na atividade da lipase de *Pseudomonas cepacia*. *Exacta*, v. 7, n.2, p. 181-186, 2010.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XVII
LISTA DE TABELAS	XX
NOMENCLATURA E ABREVIACÕES	XXI
CAPITULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1 Introdução.....	1
1.1 Objetivos.....	5
2.1 Enzimas.....	7
2.2 Lipase	13
2.2.1 Aspectos Gerais	13
2.2.2 Fontes de obtenção	18
2.2.2.1 <i>Burkholderia cepacia</i>	20
2.2.3 Atividade das lipases.....	21
2.2.4 Especificidade das lipases	23
2.2.5 Aplicação das lipases	24
2.3 Técnicas de purificação de produtos biotecnológicos	28
2.3.2 Sistemas de duas Fases Aquosas.....	30
2.3.2.1 Aspectos gerais	30
2.3.2.2 Componentes dos sistemas bifásicos aquosos.....	37
2.3.2.2.1 Polietileno glicol	37
2.3.2.2.2 Sistema PEG/sal.....	38
2.3.3 Distribuição de biomoléculas nos SBAs	40
2.3.4 Recuperação dos sais e polímeros.....	42
2.4 Encapsulação de enzimas	44
2.4.1 Microencapsulação	45
2.4.2 Microencapsulação por gelificação iônica	50
2.4.3 Materiais encapsulantes	51
2.4.2.1 Alginato de sódio	54
CAPITULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1 Materiais.....	57
3.1.1 Microorganismos	57
3.1.2 Equipamentos.....	57
3.1.3 Reagentes.....	57
3.2 Métodos.....	59
3.2.1 Preparo do inóculo e sistema fermentativo	59
3.2.2 Obtenção do extrato enzimático	60
3.2.3 Determinação da atividade lipolítica.....	60
3.2.4 Efeito da temperatura na atividade.....	61
3.2.5 Efeito do pH na atividade e estabilidade.....	61
3.2.6 Efeito dos íons na atividade e estabilidade.....	61
3.2.7 Efeito do tempo na atividade	62
3.2.8 Efeito dos parâmetros cinéticos na atividade	62
3.2.9 Determinação do teor de proteínas.....	62
3.3 Métodos para preparação das soluções para purificação	62

3.3.1 Solução estoque sal fosfato	62
3.3.2 Solução estoque de PEG	63
3.3.3 Determinação do diagrama de equilíbrio de fases.....	63
3.3.4 Determinação das linhas de amarração	63
3.3.5 Obtenção do coeficiente de partição da lipase	64
3.3.6 Eletroforese SDS-PAGE e focalização isoelétrica (Isoelectric Focusing – IEF)	66
3.4 Métodos para encapsulamento da enzima lipase	67
3.4.1 Solução de alginato de sódio.....	67
3.4.2 Solução de cloreto de cálcio.....	67
3.4.2 Produção das microcápsulas por gelificação.....	67
3.4.3 Secagem das microcápsulas	68
3.4.4 Estabilidade da lipase antes e após a encapsulação.....	68
3.4.5 Caracterização físico-química.....	69
3.4.5.1 Distribuição de tamanho e diâmetro médio.....	69
3.4.3.1 Morfologia e microestrutura	69
4.1 Caracterização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	71
4.1.1 Efeito da temperatura na atividade.....	71
4.1.2 Efeito do pH na atividade e na estabilidade	73
4.1.3 Estabilidade com diferentes íons.....	74
4.1.4 Efeito do tempo em relação a atividade lipolítica	76
4.1.5 Cinética da reação de hidrólise do azeite de oliva por lipases de <i>Burkholderia cepacia</i>	77
4.2 Purificação da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	79
4.2.1 Diagrama de fases	79
4.2.1.1 Efeito da massa molecular do PEG sobre o diagrama de fases	79
4.2.1.2 Efeito do pH sobre o diagrama de fases	81
4.2.2 Estudo do comportamento das tie-lines	82
4.2.3 Avaliação do coeficiente de partição (K) da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	83
4.2.4 Eletroforese SDS-PAGE e de focalização isoelétrica (IEF).....	90
4.3 Encapsulamento da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	92
4.3.1 Estabilidade da lipase antes e após o processo de gelificação iônica.....	92
4.3.3 Morfologia e microestrutura	94
<i>CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES.....</i>	<i>101</i>
<i>CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</i>	<i>107</i>
<i>CAPITULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	<i>109</i>
ANEXO A	121
ANEXO B	122

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Modelo chave-fechadura.	8
FIGURA 2. Reação de hidrólise catalisada por lipases.	13
FIGURA 3. Reações químicas catalisadas por lipases	14
FIGURA 4. Comportamento catalítico das esterases e lipases.	15
FIGURA 5. Estrutura da lipase de <i>Burkholderia aeruginosa</i>	16
FIGURA 6. Modelo estrutural da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	21
FIGURA 7. Reação de hidrólise do pNPP por lipases.	22
FIGURA 8. Diagrama de fase, expresso em coordenadas triangulares e retangulares, para sistemas aquosos bifásicos.	35
FIGURA 9. Método de imobilização de enzimas.	44
FIGURA 10. Diferentes tipos de micropartículas.	45
FIGURA 11. Representação da fermentação submersa.	59
FIGURA 12. Equipamento usado na gelificação iônica.	68
FIGURA 13. Diâmetro dos bicos atomizadores A) 2mm; B) 0,5mm.	68
FIGURA 14. Efeito da temperatura na atividade da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> (5,0 mL de emulsão de azeite de oliva 7,5% e goma arábica 2,5% em tampão fosfato de sódio 10mM pH 8).	72
FIGURA 15. Determinação da energia de ativação pelo gráfico de ARRHENIUS da reação de hidrólise do azeite de oliva por lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> . Equação da reta tangente: $y = - 1214 x - 2,385$	72
FIGURA 16. Efeito do pH na atividade da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> (5,0 mL de emulsão de azeite de oliva 7,5% e goma arábica 2,5% a 37°C).	74
FIGURA 17. Efeito na estabilidade do pH da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> (5,0 mL de emulsão de azeite de oliva 7,5% e goma arábica 2,5% a 37°C).	74
FIGURA 18. Efeito dos íons na atividade da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> (5,0 mL de emulsão de azeite de oliva 7,5% e goma arábica 2,5% em tampão fosfato de sódio 10mM pH 8 a 37°C).	75

FIGURA 19. Efeito do tempo de incubação na atividade da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> (5,0 mL de emulsão de azeite de oliva 7,5% e goma arábica 2,5% em tampão fosfato de sódio 10mM pH 8 a 37°C).....	77
FIGURA 20. Efeito da concentração de substrato na atividade da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> (5,0 mL de emulsão de azeite de oliva e goma arábica com diferentes concentrações em tampão fosfato de sódio 10mM pH 8 a 37°C).....	78
FIGURA 21. Gráfico de LINEAWEAVER-BURK para a lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> (5,0 mL de emulsão de azeite de oliva e goma arábica com diferentes concentrações em tampão fosfato de sódio 10mM pH 8 a 37°C).	79
FIGURA 22. Comportamento do SBA PEG/fosfato a pH 6 para diferentes massas moleculares de PEG.....	80
FIGURA 23. Comportamento do SBA PEG/fosfato a pH 7 para diferentes massas moleculares de PEG.....	80
FIGURA 24. Comportamento do SBA PEG/fosfato a pH 8 para diferentes massas moleculares de PEG.....	81
FIGURA 25. Comportamento do SBA PEG1500/fosfato em diferentes pHs.....	81
FIGURA 26. Comportamento do SBA PEG4000/fosfato em diferentes pHs.....	82
FIGURA 27. Comportamento do SBA PEG6000/fosfato em diferentes pHs.....	82
FIGURA 28. Correlação dos valores observados da lipase na forma normal e linearizada em relação aos valores previstos.	85
FIGURA 29. Correlação dos valores observados da proteína na forma normal e linearizada em relação aos valores previstos.	85
FIGURA 30. Correlação dos valores observados da atividade específica na forma normal e linearizada em relação aos valores previstos.....	86
FIGURA 31. Estimativa dos efeitos através do gráfico de Pareto - variável resposta do coeficiente de partição (K) da atividade específica da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	88
FIGURA 32. Avaliação RSM das influências da massa molecular do polímero e do pH sobre a atividade específica da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	89
FIGURA 33. Avaliação RSM das influências da massa molecular do polímero e da tie-line sobre a atividade específica da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	90

FIGURA 34. Avaliação RSM das influências da tie-line e pH do sistema sobre a atividade específica da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	90
FIGURA 35. Eletroforese SDS-PAGE em gel de 12,5%, amostra em condições desnaturantes e redutoras. (LMW) marcador de baixa massa molecular; (1) amostra de lipase purificada em sistema bifásico aquoso PEG/fosfato; (2) lipase comercial de <i>Burkholderia cepacia</i> ; (3) extrato enzimático bruto.....	91
FIGURA 36. Eletroforese de focalização isoeletrica em pHs de 3 a 9. (IEF): marcador de ponto isoeletrico; (L): amostra de lipase purificada em sistema bifásico aquoso PEG/fosfato.	92
FIGURA 37. Estabilidade da lipase imobilizada em comparação ao extrato bruto durante 28 dias.....	94
FIGURA 38. Imagem obtida por microscopia óptica das microcápsulas de alginato produzidas por atomização com bico de 2 mm(A) 2% de CaCl ₂ (B) 4% de CaCl ₂	94
FIGURA 39. Imagem obtida por microscopia óptica das microcápsulas de alginato produzidas por atomização com bico de 0,5 mm (A) 2% de CaCl ₂ (B) 4% de CaCl ₂	95
FIGURA 40. Aspecto morfológico das microcápsulas secas e distribuição de tamanho das microcápsulas hidratadas com bico atomizador de 2 mm.	96
FIGURA 41. Aspecto morfológico das microcápsulas secas e distribuição de tamanho das microcápsulas hidratadas com bico atomizador de 0,5 mm.	97
FIGURA ANEXO A1. Curva de calibração pelo método de Bradford.....	121
FIGURA ANEXO B1. Linhas de amarração PEG 1500 pH 6.....	122
FIGURA ANEXO B2. Linhas de amarração PEG 1500 pH 7.....	122
FIGURA ANEXO B3. Linhas de amarração PEG 1500 pH 8.....	123
FIGURA ANEXO B4. Linhas de amarração PEG 4000 pH 6.....	123
FIGURA ANEXO B5. Linhas de amarração PEG 4000 pH 7.....	124
FIGURA ANEXO B6. Linhas de amarração PEG 4000 pH 8.....	124
FIGURA ANEXO B7. Linhas de amarração PEG 6000 pH 6.....	125
FIGURA ANEXO B8. Linhas de amarração PEG 6000 pH 7.....	125
FIGURA ANEXO B9. Linhas de amarração PEG 6000 pH 8.....	126

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Aplicações industriais das enzimas.....	11
TABELA 2. Classificação das enzimas de acordo com o tipo de reação.....	12
TABELA 3. Aplicações industriais de lipases microbianas.....	27
TABELA 4. Técnicas de purificação de produtos biotecnológicos	30
TABELA 5. Exemplos de alguns sistemas bifásicos aquosos.....	32
TABELA 6. Reagentes utilizados durante o trabalho experimental.	58
TABELA 7. Condições de processo para o estudo de partição da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	64
TABELA 8 - Condições de processo para o encapsulamento da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	67
TABELA 9. Efeito dos íons a 10mM sobre a atividade da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> após 30 dias de armazenagem.	76
TABELA 10. Composição total do sistema com diferentes massas moleculares de PEG e pHs.....	83
TABELA 11. Resultados obtidos de partição da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> para cada condição do planejamento fatorial 2 ³ na fase superior do SBA PEG/fosfato.....	84
TABELA 12. Resultados obtidos de partição da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> para cada condição do planejamento fatorial 2 ³ na fase inferior do SBA PEG/fosfato.....	84
TABELA 13. Resultados de partição da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> por SBA PEG/fosfato.	86
TABELA 14. Resultados da ANOVA para a variável coeficiente de partição (K) da atividade específica da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	88
TABELA 15. Medida de atividade e tamanho das esferas da lipase imobilizada em todas as condições de processo.	98
TABELA ANEXO A1. Dados obtidos para a curva de calibração pelo método de Bradford. Macroensaio.....	121

NOMENCLATURA E ABREVIACÕES

Símbolo	Descrição
ΔG	Energia livre de <i>Gibbs</i>
A	Atividade lipolítica (U)
AE	Atividade específica (U/mg).
AGL	cidos graxos livres
ATPS	Aqueous two-phase system
BSA	Albumina de Soro Bovino
C_s	Concentração de equilíbrio na fase superior (g/L).
C_l	Concentração de equilíbrio na fase inferior no (g/L).
CLA	Comprimento da linha de amarração
CMC	Concentração micelar crítica
D	Diluição da amostra
Da	Dalton
DBO	Demanda bioquímica de oxignio
DQO	Demanda química de oxignio
Ea	Energia de ativação
E.E.	Efcincia de encapsulação
FL	Fase leve
FP	Fase pesada
FP	Fator de purificação
g	Força centrífuga relativa
GL	Graus de liberdade
K	Coefficiente de partição
<i>K_{ativ}</i>	Coefficiente de partição da atividade lipolítica
<i>K_{prot}</i>	Coefficiente de partição da proteina
K_m	Constante de Michaelis – Mentem (U/mg)
M	Concentração da solução de NaOH
MEV	Microscopia de força atômica
MM	Massa molecular
MQ	Média quadrática

MQ_{ep}	Média quadrática do erro puro
MQ_{faj}	Média quadrática da falta de ajuste
MQ_R	Média quadrática da regressão
MQ_r	Média quadrática do resíduo
N	Normal
PC	Ponto crítico
PEG	Polietileno glicol
pI	Ponto isoelétrico
rpm	Rotações por minuto
RMS	Método da superfície de resposta
[S]	Concentração do substrato
SBA	Sistema bifásico aquoso
SQ	Soma quadrática
t	Tempo de reação
T	Temperatura (°C)
TL	Tie-line
v	Volume do extrato bruto (mL)
V_a	Volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL)
V_b	Volume do NaOH gasto na titulação do branco (mL)
$V_{máx}$	Velocidade máxima de reação (g/L)
x_1 e x_2	Fatores codificados

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Introdução

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas de grande importância na hidrólise de ésteres insolúveis em água e biocatálise em meio orgânico e aquoso, com teor de água restrito. Sua boa estabilidade na presença de solventes orgânicos propicia a utilização na catálise de reações químicas envolvendo substratos insolúveis em meio aquoso e em etapas intermediárias de processos químicos convencionais. As lipases podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbianas, em que as de fontes microbianas são as mais utilizadas por sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las (Jaeger e Eggert, 2002; Hasan et al., 2006).

Recentemente, especial atenção tem sido dada às lipases alcalinas nas formulações de detergentes por serem excelentes catalisadoras em soluções e na interface água-óleo, se tornando apropriadas para aplicação na remoção de manchas de gorduras. Além disso, a aplicação das lipases tem sido cada vez mais promissora nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, alimentícia e de laticínios e nas modificações de óleos e gorduras (Lima et al., 2004; Kirk et al., 2002).

Nos dias de hoje, existe um interesse mundial crescente pela conservação dos recursos energéticos naturais não renováveis, pelo desenvolvimento de recursos energéticos alternativos e pela reciclagem de rejeitos. Os rejeitos de óleos comestíveis usados em fritura representam sério problema ambiental devido ao seu descarte ser diretamente no esgoto doméstico, causando grandes problemas de poluição. Uma maneira efetiva de reciclar os rejeitos de óleos usados em residências, restaurantes e indústrias é a sua utilização para produção de biodiesel sintetizado pela transesterificação direta de óleos vegetais e gordura animal, quando os triglicerídeos reagem com metanol na presença de um catalisador químico ou biológico. A utilização de lipase como catalisador biológico para produção do biodiesel apresenta um grande potencial em relação aos métodos químicos, uma vez que nenhuma operação complexa é necessária para recuperação do glicerol ou para eliminação de catalisador e sal (Shimada et al., 2002; Padilha et al., 2010).

A maioria dos produtos biotecnológicos de importância comercial é produzida em meios fermentativos. Nestes, geralmente, enzimas, sais e produtos gerados durante a fermentação se encontram misturada às células, necessitando assim de um tratamento que possibilite o isolamento destes materiais indesejáveis, o que acaba elevando os custos na purificação destes produtos. O emprego correto de processos de purificação torna-se essencial para que se atinja êxito na seleção da substância ou espécie desejada. Os diferentes tipos de operações unitárias utilizadas durante a recuperação ou purificação de biomoléculas alvo são chamados de *downstream processes* (Van der Wiler, 1999). O *downstream process* é atualmente um segmento muito importante na indústria, pois pode chegar a representar de 50 a 90% do custo de produção, pois procedimentos de purificação são limitados pela escala de operações e pelo custo dos materiais utilizados, por isso a importância do desenvolvimento de um processo eficiente e de baixo custo (Diamond e Hsu, 1992).

A partir desse contexto, técnicas de isolamento e separação de biomoléculas com diminuição de etapas, aumento da eficiência de separação e grau de pureza do produto final purificado têm apresentado um acentuado crescimento nos últimos anos. Métodos convencionais muitas vezes não são adequados para separar produtos de origem biológica, por isso novos sistemas de separação são estudados e desenvolvidos. Entre eles, o sistema bifásico aquoso (SBA) se mostra um eficiente método que pode ser usado como uma etapa de pré-purificação, substituindo métodos de separação mais caros ou reduzindo o número de etapas necessárias no processo (Bradoo et al., 1999; Sharma et al., 2002 e Pessoa e Kilikian, 2005).

Na escolha de meios de extração para aplicações em biotecnologia, vários critérios devem ser considerados, já que nesta área alguns parâmetros tais como solubilidade e estabilidade dos compostos são importantes e não podem ser desprezados. Comparado com outros métodos tradicionais de extração, os SBAs são vantajosos por apresentarem em sua composição um elevado teor de água, o que permite a partição de biomoléculas em condições de não desnaturação (Pessoa e Kilikian, 2005).

Os sistemas bifásicos aquosos mais estudados em partição aquosa são os constituídos por polietileno glicol (PEG)/dextrana. A utilização do PEG se deve às boas propriedades físico-químicas como eficiência em formar fases em meio aquoso e ao seu baixo custo (Harris, 1992). Apesar do sistema PEG/dextrana ser o usual, a dextrana é extremamente onerosa para ser utilizada industrialmente pelo elevado custo da sua purificação. Como alternativa, está sendo proposto utilizar a dextrana não purificada, que mantém as propriedades de partição do sistema a fim de reduzir substancialmente os custos associados à aplicação deste em grande escala. Contudo, esses sistemas possuem alta viscosidade e separação muito lenta. Para combater a falta de competitividade dos SBAs constituídos por PEG/dextrana, tem se recorrido a sistemas PEG/sais. Os mais empregados na aplicação em grande escala dessas técnicas de purificação são os sistemas PEG/fosfato que apresentam elevado coeficiente de partição de biomoléculas, embora existam outros sais que formem duas fases com o PEG, tais como NaCl ou Na₂SO₄. Sistemas formados por PEG e sal são utilizados por apresentarem rápida separação de fases, baixo custo e elevada seletividade na separação de moléculas com base na solubilidade (Albertsson, 1986).

As composições das fases e as concentrações das misturas polímero-polímero ou polímero-sal necessárias para que ocorra a separação das fases podem ser representadas no diagrama de equilíbrio de fases, em que a coordenada representa a composição em massa da molécula que apresenta maior fase de topo (como o PEG), e a abscissa representa a composição da molécula de maior concentração na fase de fundo (como o sal ou a dextrana). Composições representadas por pontos acima da curva de equilíbrio, ou curva binodal, levam à formação de duas fases, e abaixo da curva, uma só fase (Pessoa e Kilikian, 2005).

Cada SBA é caracterizado por um único diagrama de fases e são de grande importância para estudos de separação de biomoléculas, pois são usados como ponto de partida para a determinação da eficiência de partição do componente entre as fases, além de fornecer subsídios para auxiliar o desenvolvimento de modelos termodinâmicos. Como o diagrama de fases pode sofrer influências de fatores como a massa molecular do polímero e do pH do sistema, a obtenção de um SBA para extração de um determinado soluto ainda é restrita à tentativa e erro devido à grande quantidade e diferença entre solutos capazes de

formar os SBAs que dificultam a predição e interpretação da partição de biomoléculas (Diamond e Hsu, 1992; Badr e Cabezas, 1996; Zuniga et al., 2003).

Como as lipases são biocatalisadores importantes e utilizados em uma série de reações de grande valor sintético, nos últimos anos inúmeros métodos têm sido descritos na literatura e utilizados para imobilização em que a escolha do método é determinada, em grande parte, pelas características de solubilidade dos componentes ativos e dos materiais carregados com o intuito de aumentar a atividade catalítica e a estabilidade das lipases (Dalla-Vecchia, 2004).

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importantes por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos. O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior sem alterações estruturais, bem como modificações no seu sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (Dalla-Vecchia, 2004).

Dentre as diversas técnicas de imobilização, o processo de produção de microcápsulas por gelificação iônica é um processo simples e de baixo custo. Como material de parede, cápsulas de alginato são usadas com cátions polivalentes, sendo os íons de cálcio os agentes gelificantes mais efetivos. Os alginatos são polímeros lineares compostos por resíduos de α -L-gulurônico (G) e β -D-manurônico (M) presentes em proporções e sequência variáveis na parede celular e espaço intercelular de algas marrons. O mecanismo de gelificação é um processo de troca iônica, no qual o sódio do alginato é trocado pelo cálcio presente no meio gelificante através de uma ligação química entre dois grupos carboxila presentes em resíduos de ácido poligulurônico adjacentes. Os íons cálcio têm por função manter as cadeias de alginato juntas pelas interações iônicas após a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias, produzindo gel com estrutura de rede tridimensional (King, 1983).

A concentração de polissacarídeo e cátions, a força iônica e o pH determinam a cinética da formação do gel, bem como o volume, estabilidade e porosidade das cápsulas, podendo influenciar na difusão de solutos para dentro e para fora da matriz polimérica (Sebrão et al., 2007).

Embora diversos trabalhos de aplicação relacionados à lipase de *Burkholderia cepacia* sejam encontrados na literatura, pouco ou nenhum artigo sobre a caracterização e aplicação da enzima em partição de duas fases constituídas por PEG/fosfato e encapsulação por gelificação iônica usando alginato como material de parede são encontrados, e os que se encontram são caracterizações incompletas ou as enzimas são purificadas e imobilizadas por métodos distintos, ou quando são imobilizadas, são a partir da lipase comercial. A partir disso, definiu-se, como objetivo deste trabalho, o estudo dessas lacunas referentes à lipase de *Burkholderia cepacia*.

1.1 Objetivos

GERAL

Caracterizar, purificar por sistema bifásico aquoso PEG/fosfato e imobilizar por gelificação iônica a lipase de *Burkholderia cepacia*.

ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar a enzima lipase de *Burkholderia cepacia*:
 - a) Analisar a temperatura e pH ótimos, assim como a estabilidade da lipase a diferentes pHs usando diferentes tampões;
 - b) Definir os parâmetros cinéticos de utilização da enzima;
 - c) Avaliar os efeitos dos íons na atividade e estabilidade, assim como o tempo de análise na atividade da lipase.
- 2) Purificar a enzima lipase de *Burkholderia cepacia* por sistema bifásico aquoso:
 - a) Determinar os diagramas de equilíbrio de fases dos sistemas bifásicos formados pela combinação do polietileno glicol e fosfato de potássio, assim como as linhas de amarração;

- b) Fazer um planejamento fatorial 2^3 para testar diferentes condições para purificação da lipase alterando variáveis como: massa molecular do polímero, pH do sistema e comprimento das linhas de amarração (tie-lines);
 - c) Determinar o coeficiente de partição da lipase por meio de ensaios em batelada em sistemas de duas fases aquosas;
 - d) Determinar a massa molecular e o ponto isoelétrico da enzima purificada.
- 3) Encapsular a enzima lipase de *Burkholderia cepacia* por gelificação iônica:
- a) Produzir microcápsulas por gelificação iônica contendo como recheio a lipase de *Burkholderia cepacia*;
 - b) Avaliar a estabilidade das microcápsulas formadas e comparar com a enzima livre;
 - c) Caracterizar os sistemas obtidos em relação ao tamanho, distribuição de tamanho e morfologia.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos de natureza geralmente protéica formada por cadeias de pequenas moléculas chamadas de aminoácidos. Todas as reações químicas do metabolismo celular ocorrem devido às ações das enzimas sendo o principal reagente de uma reação enzimática denominado de substrato. A reação catalisada por enzimas é esquematizada a seguir (Motta, 2005):



As enzimas convertem o substrato em produto e são extremamente específicas para a reação que catalisam, isto é, em geral, uma enzima catalisa um único tipo de reação química. Conseqüentemente, o tipo de enzima encontrado numa célula determina o tipo de metabolismo que a célula efetua. Como são catalisadoras, as enzimas não são consumidas na reação e não alteram seu equilíbrio químico. Além dessas características, a enzima também apresenta outros aspectos importantes (Motta, 2005):

- Aceleram a velocidade das reações de 10^6 a 10^{12} vezes mais do que as reações não catalisadas;
- Não são consumidas ou alteradas ao participarem da catálise;
- Tem sua atividade regulada geneticamente ou pelas condições metabólicas;
- São reações baratas e seguras;
- Demonstram alto grau de especificidade em relação aos seus substratos e aos seus produtos;
- Condições reacionais mais brandas de pH e temperatura (Motta, 2005).

A formação de um complexo enzima-substrato é a primeira etapa em uma catálise enzimática. Os substratos são ligados a uma região específica da enzima, chamada de sítio ativo, contendo os radicais de aminoácidos que participam diretamente na formação e quebra de ligações. A especificidade da ligação enzima-substrato depende de um arranjo precisamente definido de átomos no sítio ativo. Uma das explicações para a elevada

especificidade da enzima é que suas estruturas tridimensionais permitem um perfeito encaixe com o substrato. Dois modelos foram propostos para explicar a especificidade da enzima:

1. **Modelo chave-fechadura:** foi desenvolvido por Emil Fischer em 1894 (Figura 1). Muitas enzimas contêm fendas com dimensões fixas que permitem a inserção somente de compostos com uma dada configuração. O substrato se ajusta a esse sítio de ligação como uma chave se ajusta a uma fechadura. Substâncias que não se encaixam na fenda para formar o complexo enzima-substrato não reagem mesmo possuindo grupos idênticos ao do substrato verdadeiro (Motta, 2005).

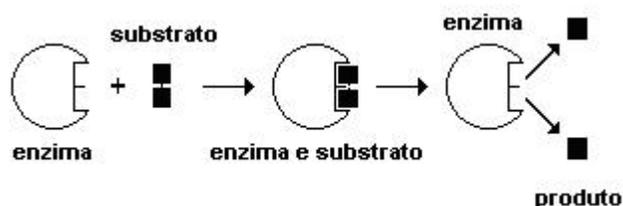


FIGURA 1. Modelo chave-fechadura.

2. **Modelo encaixe induzido:** em 1958, KOSHLAND propôs um modelo mais flexível de interação enzima-substrato. Os sítios ativos dessas enzimas não estão completamente pré-formados e a interação inicial do substrato com a enzima induz a uma alteração conformacional na enzima. Isso promove o reposicionamento dos aminoácidos catalíticos para formar o sítio ativo e a estrutura correta para interagir com os grupos funcionais do substrato (Motta, 2005).

Muitas são as vantagens em se utilizar enzimas em métodos sintéticos, mas três características são as mais importantes:

- **quimiosseletividade:** uma vez que o propósito de uma enzima é atuar em um único tipo de grupo funcional, outras funcionalizações sensíveis, que deveriam reagir normalmente com certo grau sob catálise química, são preservadas.
- **regiosseletividade:** devido a sua complexa estrutura tridimensional, as enzimas conseguem distinguir entre grupos funcionais quimicamente iguais situados em regiões diferentes da mesma molécula-substrato.

- **enantioseletividade:** toda enzima é feita de L-aminoácidos, sendo, portanto, catalisadores quirais. Como consequência, qualquer tipo de quiralidade ou pró-quiralidade presente no substrato é reconhecida durante a formação do complexo enzima-substrato. Desta forma, substratos pró-quirais podem ser transformados em produtos opticamente ativos e ambos os enantiômeros de um substrato racêmico reagem a diferentes velocidades, possibilitando a resolução cinética.

Nas células, as enzimas estão envolvidas em todos os processos bioquímicos. São usadas direta ou indiretamente pela humanidade há milhares de anos, mas sua importância só foi reconhecida em meados do século 19, quando cientistas descobriram como atuam. A partir de então e, sobretudo no século 20, aumentou rapidamente o conhecimento onde foram determinados os mecanismos de ação e as estruturas de milhares delas (Mussato et al., 2007). Hoje o número de enzimas conhecidas e caracterizadas quimicamente é por volta de 2000. Mas são poucas as que são produzidas e aplicadas em escalas industriais (Reguly, 2000). A descoberta de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial ainda é pouco explorada no Brasil. O Brasil importa a maior parte das enzimas que utiliza, embora apresente potencial para produção a partir da abundância de matéria orgânica proveniente dos resíduos agrícolas, considerados substrato de baixo custo para fermentações (Canto e Menezes, 1995).

Grande parte das proteínas sintetizadas no interior das células são as enzimas intracelulares ou endoenzimas que somente podem ser obtidas através do rompimento celular. As enzimas extracelulares ou exoenzimas atuam fora da célula em que são produzidas, podendo ser encontradas no meio de cultivo ou de propagação celular, assim sendo mais facilmente isoladas e avaliadas. Quase todas as enzimas preparadas em escala industrial até hoje são extracelulares devido ao isolamento dos meios de cultivo ser geralmente mais simples, embora elas se encontrem um tanto diluídas nestes meios, o que tornam o seu isolamento mais dispendioso (Kieling e Furigo, 2002).

Nas aplicações industriais, os microorganismos são a principal fonte de enzimas, mas diversas delas podem ser obtidas de animais (pancreatina, tripsina, quimotripsina, pepsina, renina) ou vegetais (papaína, bromelina, ficina). Hoje, porém, como é possível modificar geneticamente os microorganismos para que forneça qualquer enzima, a tendência

é substituir as produzidas por vegetais e animais pelas de origem microbiana. O uso de enzimas em processos industriais é de grande interesse, em especial devido à facilidade de obtenção por biotecnologia e às vantagens em relação aos catalisadores químicos, como maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação. Além disso, a catálise enzimática tem outros benefícios, como o aumento da qualidade dos produtos em relação à catálise química, a redução dos custos laboratoriais e de maquinário graças à melhoria do processo e a fabricação controlada de pequenas quantidades (Mussato et al., 2007).

A diversidade microbiana na natureza é extraordinária. Mais de 400.000 microrganismos são conhecidos e isto é só uma fração do número estimado para as espécies existentes - 4 a 5 milhões de diferentes espécies. Nos próximos anos, cerca de 100 projetos de seqüenciamento genômico estarão concluídos, revelando informações sobre mais de 300.000 genes, muitos dos quais novos e sem função conhecida (Fraser e Dujon, 2000). Com a descoberta de novos microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos, abrem-se as portas para a descoberta de novos antibióticos e agentes terapêuticos, probióticos, produtos químicos, enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas, biorremediação de poluentes e biolixiviação e recuperação de minérios. Outros benefícios incluem o prognóstico e prevenção de doenças emergentes em seres humanos, animais e plantas, e a otimização da capacidade microbiana para a fertilização de solos e despoluição das águas (Canhos e Vazzoler, 2008).

Devido à modernização da biotecnologia, onde os cientistas desvendaram a atuação das enzimas, estas passaram a ser cada vez mais empregadas com variadas finalidades em diversificados segmentos industriais. É vantajoso usar enzimas na indústria, porque elas são naturais, não tóxicas e podem alterar características de vários resíduos, contribuindo para reduzir a poluição ambiental. Na Tabela 1 (Kirk et al., 2002) pode observar que as enzimas têm destacado papel no setor alimentício, influenciando na composição, processamento e deterioração dos alimentos. O uso de enzimas na área médica também é comum, já que algumas delas têm ação antibiótica, antiinflamatória ou podem ser empregadas na fabricação de fármacos. O diagnóstico e o prognóstico de doenças, além do acompanhamento do tratamento, também podem ser feitos pela detecção de enzimas em análises laboratoriais. Na indústria têxtil é vantajoso substituir as enzimas por substâncias

químicas sintéticas, por gerarem benefícios ambientais, uma vez que são biodegradáveis e dependem de menor consumo de energia. É também cada vez maior a utilização conjunta das enzimas em produtos de limpeza, melhorando a ação dos detergentes e facilitando a remoção de manchas como as de batom, frituras, manteiga, azeite e mesmo os difíceis pontos encardidos de colarinhos e punhos. Outras áreas em que as enzimas vêm ganhando espaço é a de cosméticos, com enzimas incorporadas à formulação de tinturas, alisantes de cabelo, desodorantes, produtos anticaspa, curativos, e o setor de biocombustíveis. O biodiesel, por exemplo, pode ser produzido a partir de fontes, como óleos vegetais ou óleos usados de cozinha, com o uso das lipases (Mussato et al., 2007).

TABELA 1. Aplicações industriais das enzimas (Kirk et al., 2002).

<i>Enzima</i>	<i>Aplicação</i>	<i>Setor</i>
Amilase	Remoção de manchas	Detergente
	Modificação da massa	Panificação
	Cerveja: preparo do mosto doce; sacarificação de álcool e bebidas destiladas	Bebidas
	Degomagem	Têxtil
Protease	Remoção de manchas	Detergente
	Coagulação do leite, flavorizante, fórmulas infantis.	Alimentos
	Remoção de biofilmes	Papel e celulose
	Remoção da elastina	Couro
Lipase	Remoção de manchas	Detergente
	Flavorizante de queijos	Laticínios
	Estabilizante de massas e condicionamento	Panificação
	Controle dos contaminantes e do breu	Papel e celulose
	Resolução do álcool quiral e amidas	Síntese orgânica
	Decapagem	Couro
	Transesterificação	Óleos e gorduras
Celulase	Lavagem e clareamento dos tecidos	Detergente
	Amolecimento do algodão	Têxtil
	Modificação das fibras	Papel e celulose
Pectinases	Clarificação de sucos e vinhos	Bebidas
Xilanase	Melhora o processamento e qualidade dos pães	Panificação
	Branqueamento da polpa	Papel e celulose
	Digestibilidade	Ração animal

Lactase	Remoção da lactose do leite	Laticínios
Lacase	Clarificação de sucos e flavorizantes de cervejas	Bebidas
	Alvejante	Têxtil
Amiloglucosidase	Sacarificação da glicose a partir do amido	Amido
	Combinado com a glicose oxidase se torna antimicrobiana	Cuidados pessoais
Peroxidase	Remoção do excesso de corante	Têxtil
	Antimicrobiana	Cuidados pessoais
Fosfolipase	Degomagem e produção de liso-lectina	Óleos e gorduras
Catalase	Alvejante	Têxtil
B- glucanase	Digestibilidade	Ração animal
	Usada na etapa de mashing em cervejarias	Bebidas
Glicose isomerase	Conversão da glicose em frutose	Amido
Acilase	Síntese da penicilina semi-sintética	Síntese orgânica

Antigamente, a identificação das enzimas era feita de acordo com o nome que os próprios pesquisadores lhe atribuíam, muitos desses nomes triviais têm a incorporação do sufixo *ase* ao nome do substrato sob qual elas atuam, mas em 1964, devido à crescente descoberta do número de enzimas, a União Internacional de Bioquímica organizou uma classificação e uma nomenclatura sistemática com seis classes principais de acordo com o tipo de reação química que as enzimas catalisam (Tabela 2) (Gava, 1984).

TABELA 2. Classificação das enzimas de acordo com o tipo de reação (Gava, 1984).

<i>Classificação</i>	<i>Tipo de reação catalisada</i>
1. Oxidorredutases	Reações de oxi-redução
2. Transferases	Transferência de grupos funcionais
3. Hidrolases	Reações de hidrólise
4. Liases	Eliminação de grupos para formar duplas ligações
5. Isomerasas	Reações de isomerização
6. Ligases	Formação de ligação acoplada à hidrólise do ATP

De acordo com a classificação, conhecido por “E.C.” (Enzyme Commission of the IUBMB), as enzimas possuem um código com 4 dígitos. Nessa nomenclatura, o primeiro dígito designa em qual das seis classes a enzima pertence, o segundo indica o tipo de ligação ou reação que a enzima atua, o terceiro dígito é a subclassificação do tipo de

ligação e o quarto dígito é um número de série dependente do terceiro dígito. No entanto, quando o nome sistemático da enzima é longo ou difícil, o nome trivial ainda é usado (Gava, 1984).

Devido à diversidade de aplicações, estudos têm sido realizados na tentativa do isolamento de inúmeras enzimas e o estudo de suas atividades catalíticas. Nesse trabalho, em especial, foi feito um estudo de uma lipase bacteriana de *Burkholderia cepacia*.

2.2 Lipase

2.2.1 Aspectos Gerais

As lipases (glicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3) constituem uma classe especial entre as carboxil éster hidrolases e são enzimas que atuam sobre a ligação éster presentes nos acilgliceróis, liberando glicerol e ácidos graxos (Figura 2) (Jaeger e Eggert, 2002).

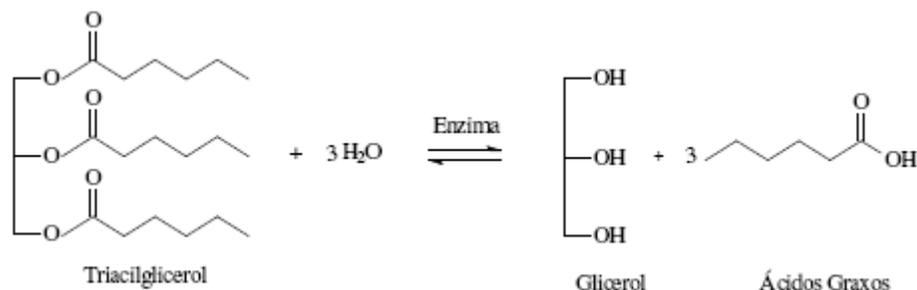


FIGURA 2. Reação de hidrólise catalisada por lipases.

Para entender a forma de atuação da lipase é necessário compreender as funções dos lipídios - gorduras e óleos existentes em grande parte da biomassa terrestre. Os lipídios ou acilgliceróis são substâncias apolares, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos que contêm dois ou três tipos diferentes de resíduos de ácidos graxos, sendo denominados de acordo com a posição dos resíduos em relação à molécula de glicerol. Os acilgliceróis podem ser monoésteres, diésteres ou triésteres formados a partir da reação do glicerol (CH₂OH - CHOH - CH₂OH) e ácidos graxos, por meio de uma reação de esterificação sendo denominados respectivamente, de monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG).

Embora a função natural da lipase seja a quebra das ligações ésteres dos acilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são capazes de catalisar a reação reversa sob condições micro aquosas, que acontecem quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese, como a formação de ligação éster a partir de álcool e ácido carboxílico. Esses dois processos básicos podem ser combinados numa seqüência lógica para resultar em reações de esterificação, interesterificação, transesterificação (Figura 3) (Jaeger e Eggert, 2002).

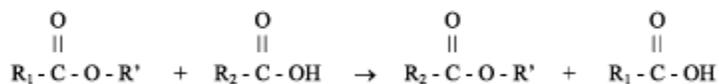


Reação de Esterificação

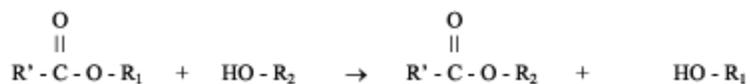


Reação de Interesterificação

Acidólise (reação de éster com ácido)



Alcoólise (reação de éster com álcool)



Transesterificação (reação de éster com éster)

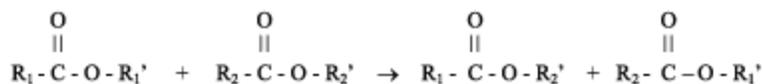


FIGURA 3. Reações químicas catalisadas por lipases (Jaeger e Eggert, 2002).

As lipases representam um grupo de biocatalisadores acessíveis e de baixo custo que, em geral, são flexíveis quanto a sua especificidade. A diferença mais importante entre as lipases e as esterases são as interações físico-químicas com seus substratos. Em contraste com as esterases, que apresentam cinética de MICHAELIS-MENTEN normal, ou seja, a atividade da esterase aumenta conforme a concentração do substrato aumenta até um limite por saturação, as lipases não apresentam atividade enquanto seus substratos estão presentes na solução em estado monomérico. Contudo, quando a concentração do substrato está próxima ou ultrapassa o seu limite de solubilidade, ocorre um rápido aumento na atividade da lipase. A razão pela qual uma lipase não hidrolisa substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima (concentração micelar crítica, CMC), porém somente em concentração acima desta, é chamada de *ativação interfacial* (Figura 4).

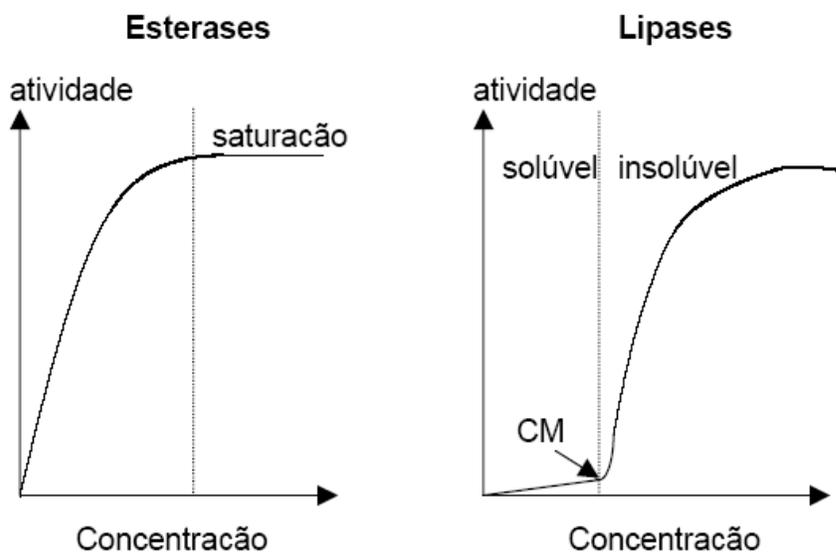


FIGURA 4. Comportamento catalítico das esterases e lipases.

O mecanismo de *ativação interfacial* está associado a mudanças conformacionais na enzima (Costa e Amorim, 1999). Embora a ocorrência da *ativação interfacial* juntamente com a existência de uma tampa polipeptídica (parte da proteína que recobre o sítio ativo) já foi utilizada como parâmetro de distinção entre lipases e esterases. A existência de diversas enzimas que possuem essa tampa, mas não são ativadas interfacialmente (como a cutinase de *Fusarium solani* ssp *pisi*), ou as que não possuem a tampa polipeptídica (lipases de *Burkholderia glumae* e *Pseudomonas aeruginosa*) fez com

que a *ativação interfacial* e a presença de tampa recobrendo o sítio ativo fossem reavaliadas como critério para a distinção entre essas enzimas. Atualmente, consideram-se lipases as carboxilesterases que catalisam a hidrólise e síntese de acilgliceróis de cadeia longa (com mais de 10 átomos de carbono) (Jaegger et al., 1999; Paiva et al., 2000).

As lipases microbianas são glicoproteínas e apresentam em torno de 258 e 544 resíduos de aminoácidos, dos quais a maior parte são hidrofóbicos e responsáveis pela interação entre a enzima e os substratos insolúveis em água. As lipases exibem um padrão de dobramento característico, conhecido como dobra hidrolase α/β . O centro da lipase é composto por uma folha β central com até oito lâminas β ($\beta 1 - \beta 8$) conectadas por até seis α hélices (A – F), como pode ser visto na Figura 5 (Jaeger e Reetz, 1998).

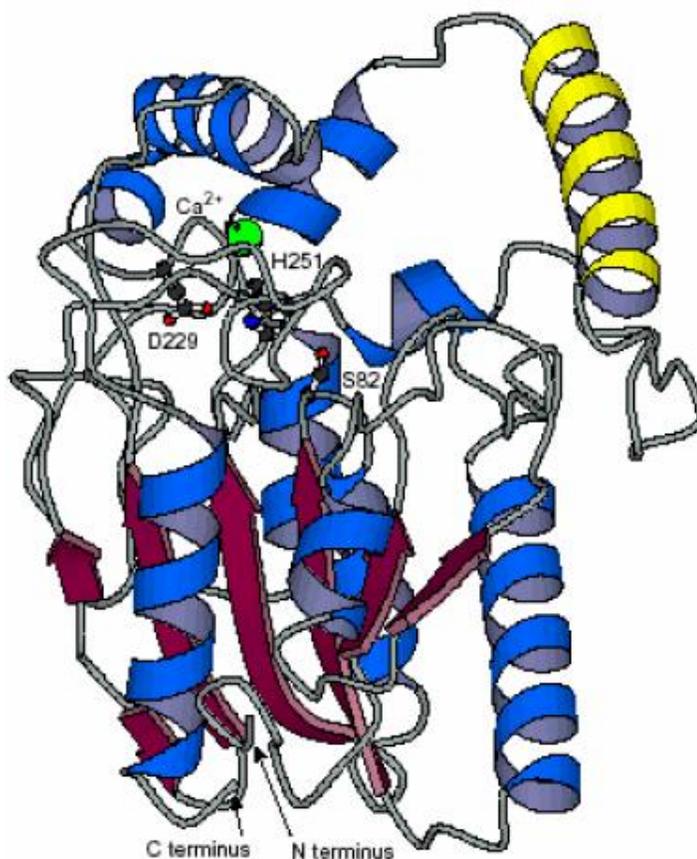


FIGURA 5. Estrutura da lipase de *Burkholderia aeruginosa*. As lâminas beta estão representadas como setas (vermelho escuro) e as α -hélices como rolos (azuis e amarelas). Os resíduos do sítio ativo Ser82, Asp229 e His251 estão indicados e a posição potencial do íon Ca^{2+} (Jaeger e Reetz, 1998).

O sítio catalítico da lipase é formado pela tríade catalítica G-X₁-S-X₂-G, onde G= glicina, S= serina, X₁= histidina e X₂= ácido glutâmico ou aspártico. O nucleófilo catalítico (serina) é responsável pela catálise e está unido por ligações de hidrogênio a um resíduo de histidina; o resíduo carboxilado ligado ao mesmo resíduo de histidina poderá ser um aspartato ou glutamato. Esse sítio catalítico se repete em todas as estruturas e é freqüentemente protegido na molécula por uma tampa hidrofóbica ou *lid*, que ao interagir com a interface lipídio/água sofre uma mudança conformacional expondo o sítio ativo que fica acessível ao substrato, e ao mesmo tempo expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface. A presença da tampa na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização das lipases. Estudos de raios-X feitos por UPPENBERG e colaboradores (1994) com a lipase da *Candida antarctica* revelou a existência de uma tampa similar recobrando a tríade catalítica. No entanto, outros autores observaram que a presença da tampa não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, sendo que as lipases de *Burkholderia aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B, que apresentam a tampa em suas estruturas, não sofrem ativação interfacial (Jaegger e Eggert, 2002; Dalla-Vecchia et al., 2004).

Outro importante aspecto das enzimas lipolíticas é sua característica de catalisar reações na interface óleo-água. Muitas das lipases são solúveis em água e agem em substratos insolúveis em água, o que pode diferenciar as lipases das esterases, já que essas agem em substratos solúveis em água. Apesar dos principais substratos das lipases serem triglicerídeos de cadeia longa (com mais de 10 átomos de carbono), essas enzimas atuam sobre uma gama de substratos não-naturais (ésteres não-lipídicos) e de diversos tamanhos. A versatilidade das lipases sugere que sua estrutura polipeptídica seja flexível e possa adotar diferentes conformações dependendo das características físico-químicas do meio, o que dificulta a modelagem e previsão de interações estereoquímicas enzima-substrato (Costa e Amorim, 1999).

2.2.2 Fontes de obtenção

Em 1856, CLAUDE BERNARD descobriu que as lipases eram tradicionalmente obtidas de pâncreas de animais, mas devido à dificuldade de acesso ao material de origem animal, aumentou-se o interesse pelas lipases microbianas. Há aproximadamente cem anos atrás, o microbiologista EIJKMANN relatou que diferentes cepas poderiam produzir e secretar as lipases (Jaeger e Eggert, 2002). Então, a partir de 1906, iniciaram-se os estudos sobre produção dessas enzimas utilizando-se diversos microrganismos como bactérias, fungos e leveduras (Hasan et al., 2006). Apesar de pouco exploradas, lipases produzidas por vegetais extraídas de cereais e óleos de sementes, localizadas em diferentes tecidos e normalmente ativadas durante a germinação das plantas também são estudadas. Dentre estão as triacilglicerol lipases, as acil-hidrolases não específicas como as fosfolipases A1, A2 e B, as glicolipases, as sulfolipases e monoacilglicerol lipases, além das fosfolipases C e D. Entre as espécies estudadas estão *Ficus elastica*, *Carica papaya*, *Ananas comosus*, *Euphorbia characias* e *E.wulfenii* (Mukherjee, 1994; Palocci et al., 2003). No caso das lipases humanas, devido às implicações que sua estimulação ou inibição tem sobre a saúde humana, sobretudo em problemas de obesidade, estas também são estudadas. Dentre essas lipases, incluem a gástrica, pancreática e as estimuladas por sais biliares que ajudam na digestão e assimilação dos lipídios na dieta humana, e as lipases hepáticas, lipoprotéicas e endoteliais que atuam no metabolismo das lipoproteínas (Miled et al., 2000).

As propriedades das lipases são variáveis de acordo com a sua procedência, do ponto de vista econômico e industrial, as lipases obtidas de microrganismos em *habitats* como resíduos industriais, fábricas de processamento de óleos vegetais, indústrias de laticínios, solos contaminados com óleo, sementes que produzem óleo, pilhas de compostagem ou em alimentos em deterioração são as mais utilizadas devido a sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las (Saxena et al., 2003; Sharma et al., 2001). Apresentam uma série de vantagens quando comparadas às de outras fontes, uma vez que são enzimas extracelulares em sua grande maioria, sendo facilmente separadas do micélio por filtração ou centrifugação. Além disso, são enzimas termoestáveis e apresentam versatilidade e simplicidade na manipulação ambiental e genética para aumentar o rendimento das células (Hasan et al., 2006).

Fungos de diversos gêneros demonstraram serem bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. As enzimas obtidas dos fungos são especialmente valorizadas por não serem nocivas à saúde humana, reconhecidos como GRAS (Generally Regarded as Safe). Por exemplo, lipases de *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*, e da levedura *Candida rugosa* estão sendo comercializadas atualmente pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltda., UK) para processamento de óleos, gorduras e queijos, para a determinação de triglicerídeos, como aditivo em preparações digestivas e para síntese quiral (<http://www.amano-enzyme.co.jp/>).

Mas o rápido crescimento celular, em relação aos fungos, é uma das vantagens das fontes bacterianas como produtoras destas enzimas que também desempenham um importante papel em aplicações comerciais e apresentam grande potencial catalítico em meios aquoso e não aquoso, além de serem consideradas de alto potencial biotecnológico devido à estabilidade em elevadas temperaturas e a solventes orgânicos (Jaeger et al., 2003). A estabilidade das lipases em solventes orgânicos vem sendo muito estudada, pois essa pode vir a possibilitar a realização de reações onde não é possível a presença de água. Dentre as bactérias produtoras de lipases estão disponíveis as enzimas do gênero *Pseudomonas* sp, *P. fluorescens* e *P. cepacia* que são utilizadas para a aplicação em síntese quiral e as lipases de *Burkholderia* sp. e *Arthrobacter* sp. utilizadas na determinação diagnóstica de triacilgliceróis (<http://www.amano-enzyme.co.jp/>).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, ponto isoelétrico entre 4 a 10 e atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica. A termoestabilidade é uma das características requeridas de enzimas com potencial para aplicação industrial como as lipases, uma vez que muitos processos usam temperaturas em torno de 50°C. Lipases microbianas têm sido estudadas com relação à termoestabilidade e a faixa de temperatura em que atingem a atividade máxima, entretanto, não há padronização nas metodologias, tornando difícil a comparação e o estabelecimento de regras gerais

(Beisson et al., 2000; Borgström e Brockman, 1984; Kordel et al., 1991; Pastore et al., 2004, Lima et al., 2004).

Como as características das lipases variam conforme a fonte será explorada a *Burkholderia cepacia* utilizada neste trabalho.

2.2.2.1 *Burkholderia cepacia*

A espécie bacteriana de *Burkholderia cepacia* (anteriormente *Pseudomonas cepacia*) (Figura 6) é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica, com temperatura ótima de crescimento entre os 30 e 35°C e utilizam mais de 200 compostos como fonte de carbono e energia (Palleroni, 1984). São bactérias produtoras de lipases extracelulares com característica de alta estabilidade e atividade. Essas lipases possuem massa molecular de 33 kDa, estabilidade em solventes orgânicos, altas temperaturas e em diferentes valores de pH, tendo como pH ótimo entre 7 e 8. As enzimas dessa fonte atualmente são comercializadas pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltda., UK) para diversas aplicações como aditivos em detergentes e em síntese orgânica, devido ao alto grau de enantiosseletividade. Como consequência, tem sido utilizada também na resolução quiral de racematos, produzindo enantiômeros puros. As lipases obtidas dessa fonte possuem em seu sítio ativo a presença da tríade catalítica formada por resíduos de aminoácidos de serina, histidina e aspartato (Reetz e Jaeger, 1998; <http://www.amano-enzyme.co.jp/>).

As lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB1 utilizadas em 2007 por FERNANDES apresentou massa molecular de 33 kDa e boa estabilidade frente a diferentes faixas de pH (3 a 10) e à temperatura (20 a 55°C). A mesma cepa foi utilizada por LIMA e colaboradores em 2004 e os resultados mostraram a boa estabilidade em solventes orgânicos, pois quando incubados por 1 hora em etanol, isopropanol e acetona, a enzima apresentou ativação até a proporção de 80% de solvente na mistura solvente/água, sendo a maior ativação em etanol (atividade residual de 195% ± 23). Com 100% de solvente a atividade decresceu em todos os solventes, com exceção do isopropanol (atividade residual de 97% ± 18). Com os solventes pouco polares (n-butanol) e apolares a 100% (v/v) (tolueno, n-hexano, n-heptano e isooctano), a enzima apresentou maior ativação em n-heptano (atividade residual de 121% ± 6), e somente em isooctano não houve ativação. Estudos em relação à catálise

enzimática em reações de esterificação utilizando cepa de *Burkholderia cepacia* mostraram que a enzima imobilizada em Accurel EP-100, catalisou a síntese do oleato de etila em n-heptano com rendimento de 100% em 6 horas de reação. A imobilização apresentou eficiência de 93%, e a enzima imobilizada apresentou atividade 12,8 vezes maior comparada à atividade da enzima livre. A lipase pôde ser utilizada por 11 vezes para a reação de síntese do oleato de etila sem diminuição no rendimento, e 24 vezes até atingir seu tempo de meia vida. O tempo necessário para a máxima produção de éster foi melhor do que os relatados na literatura para a reação de esterificação com outras lipases (Salum et al., 2008).

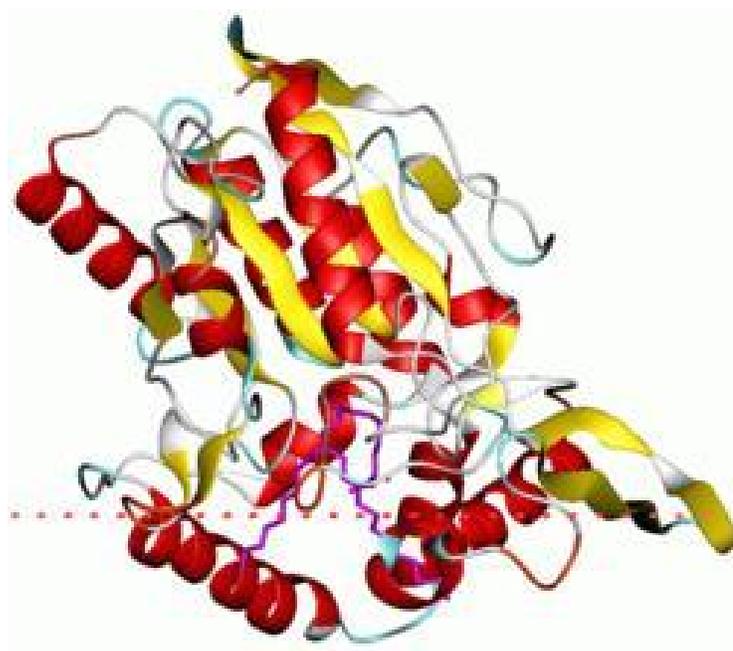


FIGURA 6. Modelo estrutural da lipase de *Burkholderia cepacia*. Fonte: Protein Data Bank.

2.2.3 Atividade das lipases

Fatores como pH, temperatura e presença de compostos podem inibir a enzima de realizar uma reação química influenciando, assim, a atividade da lipase. A especificidade em relação ao comprimento e posição da cadeia do ácido graxo na molécula de triacilglicerol também influencia a atividade lipolítica (Hasan et al., 2006).

No entanto, as metodologias utilizadas para dosagem de atividade lipolítica tornam a comparação dos resultados complicada devido à diversidade de lipases existentes. Não existe um ensaio universal, mas a reação mais comum para medida de atividade da lipase é

através de métodos titulométricos. A determinação da atividade por titulometria foi baseada no método proposto por STUER e colaboradores (1986), com modificações. O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis. No entanto, o uso de substratos solúveis em água proposto por WINKLER e STUCKMANN (1979) é muitas vezes empregado, pois a hidrólise é rápida e pode ser acompanhada espectrofotometricamente. O método espectrofotométrico baseia-se na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) (Figura 7) pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100. A formação do *p*-nitrofenol (produto de hidrólise), de coloração amarela é quantificada por espectrofotometria a 410 nm. O inconveniente deste método é que o substrato pode ser hidrolisado por outras esterases.

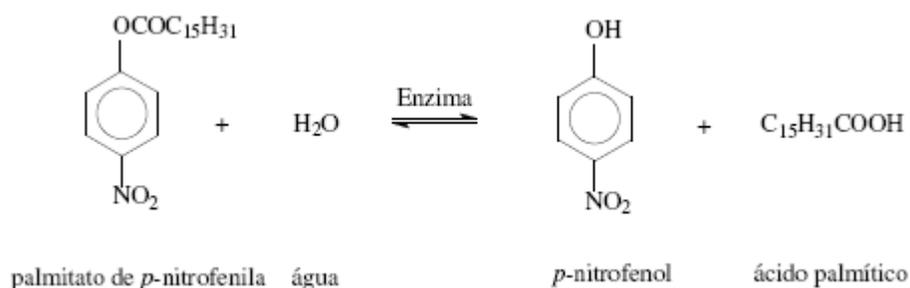


FIGURA 7. Reação de hidrólise do *p*NPP por lipases.

Outro método para determinação da atividade lipolítica é através do índice enzimático que de acordo com a metodologia de HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1975), baseia-se numa relação entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo sobre o diâmetro da colônia.

Para a quantificação de proteínas das lipases, foram encontrados dois métodos espectrofotométricos principais na literatura. O método de LOWRY (1951) para a determinação de proteínas totais foi originalmente proposto por WU em 1922. O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu) que sofre uma redução quando reage com proteínas na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm. A principal vantagem desse método é a sua alta sensibilidade para proteínas, porém o método apresenta longo tempo de análise, possui absorvidade específica altamente variável para

diferentes proteínas e segue a Lei de BEER-LAMBERT apenas numa pequena faixa de concentração de proteínas (Zaia et al., 1998).

O método de BRADFORD (1976) é baseado na interação entre o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alta massa molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

Embora nos dois métodos os lipídios sejam tidos como agentes interferentes que podem causar turbidez nas amostras, o método de BRADFORD é mais rápido e sensível que o de LOWRY, embora o mesmo apresente algumas desvantagens, tais como a variação da absorvidade específica para diferentes proteínas, devido à baixa solubilidade ou baixa massa molecular das mesmas, e fornecimento de resultados nem sempre reproduzíveis devido ao grau de pureza do corante BG-250 que varia conforme a procedência, sendo recomendável padronização das condições de reação para cada lote de corante adquirido (Zaia et al., 1998).

2.2.4 Especificidade das lipases

A especificidade das lipases com relação ao substrato é um fator determinante nas diversas aplicações industriais. A enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. Segundo MACRAE e HAMMOND (1985), as lipases têm sido classificadas em três grupos:

- 1. Lipases 1,3 específicas** - catalisam a liberação de ácidos graxos especificamente das posições *sn*-1 e *sn*-3 dos acilgliceróis. A hidrólise total pode ocorrer se a reação for por tempo prolongado, considerando-se que o 2- MAG ou 1,2 (2,3)- DAG formados, ambos quimicamente instáveis, podem ser isomerizados espontaneamente para as posições 1 ou 3. As lipases de *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger* e *Mucor miehei* pertencem a este grupo. A lipase pancreática é uma típica lipase *sn*-1,3 específica, e algumas lipases vegetais têm demonstrado possuir este tipo de especificidade.

2. **Lipases não específicas** - quebram as moléculas de acilglicerol na posição randômica, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares àqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser inferior. Exemplos são as lipases de *Penicillium cyclopium*, *Corynebacterium acnes*, *Burkholderia fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Candida cylindracea* usadas para a síntese de alcoólise e interesterificação de glicerídeos.
3. **Lipases ácido graxo específicas** - são lipases com ação específica na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em *cis* no carbono 9. Um representante típico deste grupo é a lipase de *Geotrichum candidum*. Ésteres com ácidos graxos insaturados, ou sem insaturação no carbono 9, são lentamente hidrolisados. Esta habilidade de produzir novos tipos de misturas de triacilglicerídeos utilizando lipases regioespecíficas é uma das características mais interessantes para a aplicação no setor de óleos e gorduras (Carvalho et al., 2003).

A partir disso, produtos resultantes da reação de interesterificação de uma mistura de TAGs ou entre TAG e ácidos graxos livres catalisada por lipases regioespecíficas para as posições 1 e 3, permite que o processo seja dirigido para a formação de produtos com composição e propriedades peculiares. O mesmo pode ser constatado com o uso das lipases ácido graxo específicas. No entanto, os produtos obtidos com o uso de lipases não regioespecíficas são similares àqueles obtidos por interesterificação química, onde ocorre uma redistribuição aleatória (randomização) dos ácidos graxos nos TAGs, dificultando, em muitos casos, a obtenção de produtos com propriedades desejadas e com maior pureza (Macrae, 1983; Carvalho et al., 2003).

2.2.5 Aplicação das lipases

Os avanços biotecnológicos na produção industrial das lipases vêm proporcionando sua aplicação nos diferentes segmentos industriais através da substituição dos catalisadores clássicos industriais pelos biocatalisadores. As lipases com suas características de especificidade, regioseletividade e enantioseletividade permitem a

síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Os biocatalisadores podem ser um importante substituto de muitos processos puramente químicos, pois requerem procedimentos mais fáceis e baratos que utilizam temperatura e pressão ambientes, condições estas que minimizam a degradação de compostos lábeis e evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluente, pois estabelece os seus processos considerando as propriedades biodegradáveis dos seus componentes e por isso é um ramo do que se conhece como química verde (Warner et al., 2004).

Devido à versatilidade de suas propriedades como atuação enzimática, especificidade pelo substrato e produção em escalas maiores, as lipases obtidas de microorganismos são as mais aplicadas nos diferentes segmentos industriais e biotecnológicos (Hasan et al., 2006). Embora ainda hoje a maior aplicação industrial destas enzimas seja na formulação de detergentes (Kirk et al., 2002), sua capacidade hidrolítica faz com que algumas indústrias de papel e celulose utilizem-na para a remoção de material hidrofóbico da madeira, indesejáveis na manufatura do papel (Jaeger e Reetz, 1998; Pandey et al., 1999; Hasan et al., 2006). Na indústria de alimentos, a utilização das lipases para a geração de produtos de interesse comercial tem sido crescente devido à alta especificidade das lipases com relação ao tipo e à posição estereoespecífica do resíduo de ácido graxo, atuando como flavorizantes em alguns produtos lácteos, bebidas alcoólicas, achocolatados e sobremesas. No caso dos queijos maturados, as lipases têm um importante papel na produção dos *flavors*. Os fungos do gênero *Penicillium roquefortii* ou *camembertii* são considerados de grande importância econômica, pois dão aos queijos que levam seu nome a aparência, o sabor, o odor e a textura característicos (Eitenmiller et al., 1970).

Um dos setores que mais beneficiou o avanço dos estudos da utilização de lipases foi o da indústria farmacêutica com a síntese de compostos opticamente ativos (Okazaki et al., 1997). No tratamento de efluentes para a remoção de óleo presente nas águas residuárias de indústrias de alimentos com alta carga orgânica como frigoríficos, abatedouros e laticínios utilizam-se das lipases. Estas indústrias produzem um elevado teor de resíduos líquidos e sólidos, com odores desagradáveis, que muito prejudicam as unidades industriais. Além disso, esses resíduos contêm elevados teores de demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO), aumentando, assim a concentração de

matéria orgânica. Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases reduz o teor de lipídios, o diâmetro das partículas de gorduras em até 60% e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização (Leal et al., 2002). Lipases podem ser empregadas também como biossensores para detecção de triacilgliceróis na indústria oleoquímica, na tecnologia de alimentos e em análises clínicas. Na indústria do couro, lipases podem ser empregadas em conjunto com outras hidrolases para remoção de gordura subcutânea (Pandey et al., 1999). Um resumo das principais aplicações da lipase pode ser visto na Tabela 3.

Nos dias de hoje existe um interesse mundial crescente pela conservação dos recursos energéticos naturais não renováveis, pelo desenvolvimento de recursos energéticos alternativos e pela reciclagem de rejeitos. Os rejeitos de óleos comestíveis usados em fritura representam sério problema ambiental devido ao seu descarte ser diretamente no esgoto doméstico, causando grandes problemas de poluição. Uma maneira efetiva de reciclar os rejeitos de óleos usados em residências, restaurantes e indústrias é a sua utilização para produção de biodiesel. A importância do estudo e desenvolvimento da tecnologia de produção do biodiesel é substituir eficientemente o diesel proveniente do petróleo. O biodiesel tem recebido atenção especial por ser um combustível renovável, biodegradável e não tóxico (Padilha et al., 2010). Os benefícios ambientais decorrentes de seu uso incluem também emissão mais baixa de material particulado e gases do efeito estufa como CO, CO₂ e SO_x (Pizarro e Park, 2003). O biodiesel é sintetizado pela transesterificação direta de óleos vegetais e gordura animal, quando os triglicerídeos reagem com metanol na presença de catalisador químico ou biológico.

A utilização de lipase como catalisador biológico para produção do biodiesel apresenta grande potencial em relação aos métodos químicos, uma vez que nenhuma operação complexa é necessária para recuperação do glicerol ou para eliminação de catalisador e sal. Com o uso de lipase, a síntese do biodiesel transcorre normalmente, mesmo na presença de solventes orgânicos, substrato contendo água e ácidos graxos livres, como é o caso dos óleos usados (Shimada et al., 2002). A partir disso, tem-se crescente avanço nos meios científico, econômico e industrial em relação à aplicação de lipases em processos biotecnológicos para a modificação de óleos e gorduras. Todos os estudos do processo de transesterificação de óleos vegetais utilizando como catalisador a lipase

apontam alta seletividade e conversões de triglicerídeos e ácidos graxos livres (AGL) a biodiesel. A utilização de óleos usados, que contêm elevadas porcentagens de AGL, não atrapalha o processo de produção de biodiesel utilizando catálise enzimática (Kroumov et al., 2007).

TABELA 3. Aplicações industriais de lipases microbianas (Sharma et al., 2001).

<i>Indústria</i>	<i>Mecanismo</i>	<i>Produto ou aplicação</i>
Detergentes	Hidrólise de gorduras	Remoção de resíduos de óleo em tecidos
Laticínios	Hidrólise da gordura do leite, maturação do queijo e modificação de manteigas	Desenvolvimento de agentes flavorizantes no queijo, leite e manteiga
Panificação	Melhoria do sabor e prolongamento do tempo de prateleira	Confeitos e bolos
Bebidas	Melhoria do aroma e aceleração da fermentação pela remoção dos lipídios	Bebidas alcoólicas
Alimentos	Melhoria da qualidade Transesterificação	Maionese e molhos Alimentos saudáveis
Carne e peixe	Desenvolvimento do aroma e remoção do excesso de gordura	Produtos embutidos
Óleos e gorduras	Transesterificação, hidrólise	Manteiga de cacau, margarina, ácidos graxos, glicerol, mono e diglicerídeos
Química	Enantioseletividade	Construção de blocos quirais e químicos
Farmacêutica	Transesterificação, hidrólise	Lipídios especiais, remédios para digestão
Cosméticos	Síntese	Emulsificantes e cremes
Couro	Remoção de gordura da pele dos animais	Produtos de couro
Papel	Hidrólise	Papel com melhor qualidade
Analítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico
Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpeza de tubulações e tratamento de efluentes

Diversas lipases são capazes de atuar nas reações de transesterificação. Estudos para verificar a atuação das lipases em diferentes substratos têm sido desenvolvidos. OLIVEIRA e colaboradores (2004) ao utilizarem lipases imobilizadas Novozym 435 e

Lipozyme IM como catalisadores obtiveram conversões de 98% e 81,4%, respectivamente, em ésteres a temperatura de 65°C e 20% da enzima (m/m em relação ao óleo), mostrando potencialidade de utilização do óleo de mamona na produção do biodiesel. Em outro trabalho, DU e colaboradores (2007) a partir de óleo renovável usando lipase como catalisador em meio orgânico obtiveram 94% de rendimento em biodiesel. Neste trabalho um álcool de cadeia curta ROH como receptor de acila foi usado. Os pesquisadores mostraram que esse tipo de sistema de reação em meio orgânico promoveu a solubilidade do álcool de cadeia curta na matéria prima do óleo renovável, reduzindo o tempo de reação e aumentando a produtividade do biodiesel. Experimentos de SHIMADA e colaboradores (2002) avaliaram um sistema de metanólise catalisada com lipase imobilizada de *Candida antarctica* e óleos residuais. Os autores fizeram o experimento em batelada usando 2 etapas com variações das proporções de enzima e metanol, os resultados apresentaram rendimentos maiores a 90% em conversão de biodiesel. Em outro trabalho, WATANABE e colaboradores (2001) também utilizaram óleo residual e lipase imobilizada de *Candida antarctica* numa coluna com proporções variadas de metanol, observando que a atividade da enzima permaneceu estável durante os 100 dias de reação.

2.3 Técnicas de purificação de produtos biotecnológicos

Diversas técnicas podem ser utilizadas na purificação de produtos de origem biotecnológica. Essas técnicas acabam se tornando dentro do trabalho de purificação tão ou mais desafiantes que o estudo e desenvolvimento da etapa de cultivo das células microbianas. Geralmente a purificação pode ser dividida em etapas que dependem da aplicação final do produto requerendo maior ou menor grau de pureza, isto porque os métodos de purificação são dependentes do microrganismo, dos meios e condições de cultura e das características da enzima. Assim sendo, enzimas produzidas por cepas diferentes do mesmo microrganismo podem apresentar propriedades distintas. Além disso, dependendo do microrganismo, a enzima pode ser intracelular ou extracelular, o que pressupõe estratégias diferentes de purificação, com inserção de uma etapa de rompimento das células, caso a enzima seja intracelular. A definição das operações de um processo de purificação depende do uso da molécula alvo e também de suas características físico-

químicas e do tipo de impurezas presentes. Produtos que requerem maior grau de pureza são os destinados a usos terapêuticos e, neste caso, a complexidade do processo de purificação é elevada. Para a utilização de enzimas em biocatálise, desde que as impurezas presentes no extrato enzimático não interfiram na reação catalisada e na utilização do produto final, processos parciais de purificação podem ser suficientes (Gupta et al., 2004; Kornberg, 1990).

Diferentes técnicas de purificação são empregadas, dentre elas existem as mais antigas como a precipitação, extração com solventes e filtração que tem alto poder de concentração e baixa purificação e as técnicas mais modernas como a cromatografia por afinidade ou por troca iônica, eletroforese, extração em duas fases aquosas, extração por micelas reversas que podem recuperar e purificar, muitas vezes até a homogeneidade. A Tabela 4 mostra as diferentes técnicas de remoção de compostos insolúveis nas etapas do processo de purificação e o princípio de separação das biomoléculas (Pessoa e Kilikian, 2005).

No entanto, alguns fatores como baixos rendimentos, alto custo e dificuldades de utilização em larga escala limitam o uso dessas técnicas, por isso o desenvolvimento de um processo eficiente e de baixo custo é de extrema importância. A maioria das técnicas de separação utilizada para recuperação e isolamento de enzimas encontra muitas dificuldades do ponto de vista técnico, exigindo um elevado número de etapas, devido ao pequeno tamanho das partículas e viscosidade da solução onde se encontram as enzimas. As etapas de concentração podem levar reprodutibilidade limitada e baixos rendimentos, a filtração e centrifugação são bastante dependentes do tamanho da partícula e o uso de procedimentos cromatográficos na separação das biomoléculas, muitas vezes é limitado pelo alto custo das resinas (Diamond e Hsu, 1992; Hustedt et al., 1988).

A partir desse contexto, a purificação e separação de proteínas baseadas nos princípios de partição em sistemas de duas fases aquosas têm sido desenvolvidas nos últimos anos e serão exploradas neste trabalho. Esta técnica de extração parece ser especialmente adequada para as primeiras etapas dos procedimentos de separação, podendo substituir etapas cromatográficas ou ser aplicada antes da cromatografia (Bradoo et al., 1999; Sharma et al., 2002; Pessoa e Kilikian, 2005).

TABELA 4. Técnicas de purificação de produtos biotecnológicos (Pessoa e Kilikian, 2005).

<i>Etapa do processo</i>	<i>Técnicas de separação</i>	<i>Princípio</i>
Clarificação	Filtração convencional	Tamanho de partículas
	Centrifugação	Tamanho e densidade de partículas
	Filtração por membranas	Tamanho de partículas
	Flotação	Hidrofobicidade de partículas
Rompimento celular	Homogeneização	Cisalhamento
	Ultrassom	Cisalhamento
	Moagem	Cisalhamento
	Rompimento químico ou enzimático	Hidrólise, solubilização ou desidratação de moléculas que compõem a parede ou membrana celular
Purificação de baixa resolução	Precipitação	Solubilidade
	Ultrafiltração	Massa molar e raio hidrodinâmico de moléculas
	Extração em sistemas de duas fases aquosas	Solubilidade, massa molar
Purificação de alta resolução	Cromatografia de troca iônica	Tipo e densidade de carga na superfície da biomolécula
	Cromatografia de afinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína
	Cromatografia de imunoafinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína
	Cromatografia de interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
	Cromatografia de exclusão celular	Massa molar e características para adsorção ou sítios específicos da superfície de uma proteína
	Membranas adsortivas	Massa molar e características para adsorção ou sítios específicos da superfície de uma proteína

2.3.2 Sistemas de duas Fases Aquosas

2.3.2.1 Aspectos gerais

A extração líquido-líquido é uma técnica promissora de extração e purificação baseado na propriedade de imiscibilidade de líquidos que envolvem a transferência de massa entre dois líquidos imiscíveis ou pouco miscíveis, tendo a capacidade de realizar

separações que são inviáveis por outros métodos. O processo de extração líquido-líquido ocorre em duas etapas, onde na primeira, promove-se o contato entre o solvente extrator e a solução alimentadora contendo o componente a ser extraído de modo que o soluto seja transferido da solução alimentadora para o solvente extrator e na segunda acontece a separação das duas fases imiscíveis com recuperação do solvente (Cabral e Aires-Barros, 1993).

Entretanto existe um número muito limitado de solventes adequados usados em enzimas e células, isto faz com que outros sistemas sejam usados na extração líquido-líquido para a separação de biomateriais. Dentre esses, estão os sistemas constituídos por duas fases aquosas, que podem ser formados por soluções aquosas de dois polímeros hidrofílicos ou por soluções aquosas de um polímero e um sal. A extração líquido-líquido utilizando sistemas de duas fases aquosas (SBAs) tem se mostrado como uma metodologia eficiente, ambientalmente segura e economicamente viável para a extração e purificação de biomoléculas como vírus, organelas, enzimas e proteínas. Foram primeiramente descritos na literatura em 1986 por BEIJERINCK que observou a formação de duas fases líquidas límpidas ao misturar soluções de gelatina, agar (ou amido solúvel) e água a certas concentrações. A fase mais densa era enriquecida com agar (ou amido) e a fase superior com gelatina, sendo que a água era o componente majoritário em ambas as fases. Posteriormente, OSTWALD e HERTEL continuaram os estudos sobre esses sistemas e verificaram que amidos provenientes de origens distintas como arroz ou milho, possuindo diferentes frações de amilose e amilopectina produziam diferentes diagramas de fase. Esses resultados mostravam a grande influência que pequenas variações nas interações intermoleculares têm sobre as composições das fases em equilíbrio. Em 1947, DOBRY e BOYER-KAWENOKI desenvolveram um estudo sistemático de diferentes polímeros dissolvidos em solventes orgânicos e água. Estes autores constataram que dos 35 pares de macromoléculas estudados, apenas 4 não produziram a formação das duas fases, e puderam concluir que a incompatibilidade entre polímeros era um fenômeno geral. Porém, foi com os trabalhos de PER-ÅKE ALBERTSSON, em meados da década de 50, que ficou evidente para a comunidade científica a grande potencialidade de aplicação destes sistemas à partição ou purificação de materiais biomoleculares. Como o solvente é a água em ambas as fases e geralmente se encontra presente em grande quantidade, estes sistemas fornecem

um ambiente ameno para as biomoléculas evitando, assim, mudanças em suas estruturas e perda das atividades biológicas (Albertsson, 1986; Diamond e Hsu, 1992). Dentre os sistemas de duas fases aquosas estudados, estão os constituídos por PEG/dextrana/água e PEG/sal/água, embora a descoberta e caracterização de diversos sistemas para a separação de biomoléculas sejam também utilizadas (Tabela 5) (Silva e Loh, 2006).

TABELA 5. Exemplos de alguns sistemas bifásicos aquosos (Silva e Loh, 2006).

<i>Sistemas polímero/polímero/água</i>	
Componente 1	Componente 2
Polipropileno glicol	Metoxipolietileno glicol
	Polietileno glicol
	Álcool polivinílico
	Polivinilpirrolidona
	Hidroxipropil dextrana
	Dextrana
Polietileno glicol	Álcool polivinílico
	Polivinilpirrolidona
	Dextrana
	Ficoll
	Pululana
Álcool polivinílico	Goma de cajueiro
	Metilcelulose
	Hidroxipropil dextrana
Polivinilpirrolidona	Metilcelulose
	Dextrana
Metilcelulose	Hidroxipropil dextrana
	Dextrana
Etilhidroxietilcelulose	Dextrana
	Hidroxipropil amido
Hidroxipropil dextrana	Dextrana
Ficoll	Dextrana
Poli óxido de propileno	Maltodextrina
<i>Sistemas polímero/soluto de baixa massa molecular/água</i>	
Componente 1	Componente 2
Polietileno glicol	Fosfato de potássio

	Sulfato de potássio
	Citrato de sódio
	Glicose
	Glicerol
Metoxielilenoglicol	Fosfato de potássio
Dextrana	Álcool propílico
Dextrana sulfonato de sódio	Cloreto de sódio

No diagrama de fases, os valores das concentrações dos componentes do sistema são geralmente representados em porcentagem mássica (% m/m). Convencionalmente, os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente. A curva que divide a região em duas fases é chamada curva binodal ou curva de equilíbrio e informa em quais composições globais o sistema é homogêneo e em quais é heterogêneo. A posição da binodal varia de acordo com o tipo e a massa molecular do polímero, a natureza química do sal, a temperatura e o pH do meio (Albertsson, 1986).

A representação gráfica dos SBAs é de grande importância para os estudos de partição, pois é utilizada inicialmente como ferramenta básica para o desenvolvimento de um processo de extração. Os dados de equilíbrio apresentados nesses diagramas estão relacionados à variação da energia livre de *Gibbs* do sistema, ΔG_{sis} . Esse parâmetro físico-químico é importante para os mecanismos de compreensão dos fatores que governam o processo de transferência de um determinado soluto no SBA (Albertsson, 1986).

Segundo ALBERTSSON (1986) existem duas maneiras para determinação experimental das curvas binodais:

- 1. Método da turbidez:** observação direta anterior ao aparecimento de uma segunda fase - em tubos de ensaio coloca-se alguns gramas da solução concentrada do componente 1. Adiciona-se gota a gota uma solução de concentração conhecida do componente 2. Inicialmente obtém uma mistura homogênea, mas com a adição de certa quantidade do componente 2, uma gota adicional causará turvação e o surgimento do sistema bifásico. A composição da mistura é anotada. Ao adicionar água o sistema torna-se monofásico novamente. Então se adiciona a solução do componente 2 até que o sistema forme duas fases e fique turvo. A composição é

novamente anotada e a água adicionada para que o sistema se torne monofásico, e assim sucessivamente. Com esse procedimento obtém uma serie de composições próximas a binodal. Este método pode ser usado para sistemas polímero/polímero ou polímero/sal.

2. Método da medida de composição das fases do sistema: a curva binodal é desenhada através de pontos que representem as composições. As linhas de amarração são obtidas pela análise da composição de cada fase.

No diagrama de fase também são representadas as linhas de amarração (linha ABC). Os pontos A e C representam as composição dos componentes 1 e 2 das fases superior e inferior, respectivamente. O ponto B, localizado no ponto médio da linha de amarração, representa um ponto em que se obtém um sistema bifásico, em equilíbrio termodinâmico, com o mesmo volume das fases superior e inferior. A obtenção das linhas de amarração é de grande importância, pois todas as misturas com composições globais representadas por pontos, pertencentes a uma mesma linha de amarração, fornecerão fases superiores e inferiores com propriedades termodinâmicas intensivas, como composição idênticas, porém com propriedades extensivas diferentes, como o volume (Figura 8) (Silva et al., 2006).

Um parâmetro termodinâmico, comumente utilizado para medir a diferença das propriedades intensivas entre as fases em equilíbrio, é o comprimento da linha de amarração (CLA). Este parâmetro é calculado em função das diferenças nas concentrações dos componentes em cada fase, conforme indicado na Equação 1.

$$CLA = \left[(C_{C_2}^S - C_{C_2}^I) - (C_{C_1}^S - C_{C_1}^I)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 1}$$

em que $C_{C_2}^S$ e $C_{C_2}^I$ são as concentrações do componente 2 e $C_{C_1}^S$ e $C_{C_1}^I$ são as concentrações do componente 1 nas fases superior e inferior, respectivamente. À medida que o valor do CLA aumenta, torna-se maior a diferença de composição entre as fases, elevando, conseqüentemente, a eficiência na extração e/ou partição do soluto de interesse (Silva et al., 2006).

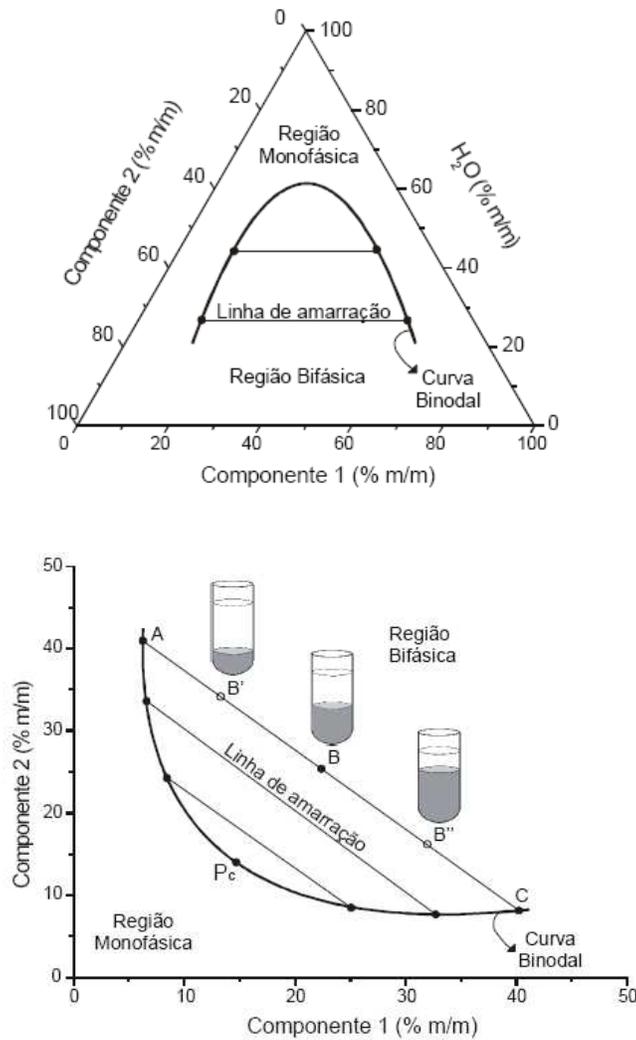


FIGURA 8. Diagrama de fase, expresso em coordenadas triangulares e retangulares, para sistemas aquosos bifásicos.

No entanto, quando o comprimento da linha de amarração tende a zero, este chegou ao ponto crítico (PC). Nesse ponto, acabam as diferenças entre todas as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase, embora hipoteticamente, haja duas regiões distintas. Outra propriedade termodinâmica importante de um SBA na partição de biomoléculas é a tensão interfacial (γ). Os sistemas polímero/polímero ou polímero/sal apresentam diferença de potencial em torno de 10^{-7} N/cm, essa característica permite a passagem dos materiais a serem particionados, de uma fase para outra, com um mínimo de perturbação em suas estruturas, no entanto, a tensão interfacial aumenta com o afastamento

do ponto crítico, onde a concentração dos polímeros é maior (Diamond e Hsu, 1992). O ponto crítico também interfere no tempo necessário para obter a separação das fases que é dependente da diferença de densidade, viscosidade e da tensão interfacial. Pontos próximos do ponto crítico, onde a diferença de densidade entre as fases é muito pequena, e pontos afastados do ponto crítico, onde a viscosidade é elevada devido ao aumento da concentração dos polímeros, requerem tempos de separação mais longos. O tempo de separação das fases também depende da razão de volumes entre as fases que tenham diferentes viscosidades, sistemas PEG/dextrana e PEG/sal são os que possuem tempo de separação entre 5 e 30 minutos, enquanto que os sistemas Dextrana/ficoll e Dextrana/metilcelulose possuem tempo de separação mais longos, de 1 a 6 horas (Albertsson, 1986).

Devido ao elevado teor de água dos SBAs, a densidade entre as fases é praticamente igual a 1, sendo maior nos sistemas PEG/fosfato (0,04-0,1) do que nos sistemas PEG/dextrana (0,02-0,07). Em relação à viscosidade das fases, esta é diretamente proporcional à massa molecular do polímero, entretanto, o aumento da viscosidade pode ser minimizado. Ao se usar polímeros de alta massa molecular, concentrações mais baixas desses polímeros para a formação de fases são necessárias (Cabral e Aires-Barros, 1993; Kula, 1982). No entanto, as propriedades físicas dos SBAs podem ser alteradas ao explorar a concentração e composição dos polímeros e sais na partição de biomoléculas (Diamond e Hsu, 1992).

Em relação a outros métodos de separação, a extração por SBA apresenta vantagens como:

- Facilidade no aumento de escala;
- Rápida transferência de massa;
- Equilíbrio alcançado com recurso a baixas energias na forma de mistura mecânica;
- Possibilidade de operação em contínuo e possibilidade de operação à temperatura ambiente sendo mais econômico que outros processos de separação (Albertsson, 1986).

Devido a essas particularidades e a simplicidade das unidades de operação e disponibilidade comercial dos equipamentos necessários, os SBAs facilmente podem ser

executados em escalas maiores a partir dos dados laboratoriais de caracterização do sistema bifásico adequado para a partição de uma determinada proteína e a correlação deste com o coeficiente de partição da biomolécula (Cabral e Aires-Barros, 1993). Em particular, a facilidade em se obter o *scale up* pode ser demonstrado pela independência do coeficiente de partição com relação ao volume dos sistemas. Aumentos de escala com fatores de 25.000 já foram mencionados na literatura (Diamond e Hsu, 1992).

2.3.2.2 Componentes dos sistemas bifásicos aquosos

2.3.2.2.1 Polietileno glicol

O polietileno glicol (PEG), de fórmula simplificada $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ é um polímero sintético neutro, de cadeia linear ou ramificada, obtido através da polimerização do óxido de etileno, disponível em diferentes massas moleculares. Os PEGs são solúveis em água à temperatura ambiente e em solventes clorados. Com o aumento da temperatura, passam a ser solúveis também em hidrocarbonetos aromáticos. A solubilização do PEG em água é atribuída à ligação das moléculas de água a muitas ou todas as moléculas em torno da cadeia de polietileno. Essa ligação ocorre pelo mecanismo de pontes de hidrogênio. Ligações deste tipo são relativamente fracas e podem ser quebradas de várias maneiras (Harris, 1992).

O PEG é também conhecido pelo nome comercial de poliglicol E[®], carbowax[®] e pluracol[®]. Os maiores produtores mundiais são a Meisei Chemical Works e a Seisetsu Kagaku, ambas japonesas, e a empresa americana Union Carbide Corporation. No Brasil, a Bayer, a Lipo, a Quimimax e a Oxiteno são os principais produtores. Os que possuem massas moleculares menores que 1000 Da são fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas. Os de massas moleculares mais elevadas, acima de 1000 Da, são encontrados na forma de pó ou de flocos brancos. Para massas moleculares acima de 20000 Da são denominados óxidos de polietileno (PEO). Esses polímeros podem ser estocados a temperatura ambiente, embora a 4 °C a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada. A oxidação do PEG altera a coloração da solução, que passa de branco para castanho, isso

ocorre devido à liberação de grupos ácidos detectada pela diminuição do pH da solução (Harris, 1992; Bamberger et al., 1985).

Devido a não antigenicidade e imunogenicidade, o PEG foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration). É um polímero bastante importante na área de biotecnologia e biomedicina pelas características de excluir, em meio aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles, possuir alta capacidade de formar fase e não provocar a diminuição da atividade funcional das biomoléculas. Ao adicionar ligantes ao PEG, este está sujeito a modificações químicas que tornam possível melhorar sua solubilidade e aumentar o tamanho da molécula. A adição de ligantes ao PEG é bastante útil na partição, pois esses ficam mais seletivos a biomolécula, aumentando o índice de recuperação das mesmas. O seu caráter atóxico e quimicamente inerte permite que sejam descartados sem tratamento prévio. É bastante empregado em cosméticos e como carga em produtos farmacêuticos, por ser expelido pelo corpo sem ser metabolizado (Bamberger et al., 1985).

2.3.2.2.2 Sistema PEG/sal

Em SBAs, sistemas formados por PEG e sal, são muito empregados devido à rápida separação das fases, baixos custos e alta seletividade na separação de proteínas (Silva e Franco, 2000). Esses sistemas têm um grande potencial de aplicação em larga escala na separação de biomoléculas devido à maior diferença de densidade entre as fases e menor viscosidade o que permite uma separação mais rápida dos componentes do que em sistemas PEG/dextrana. Os primeiros sistemas PEG/sais a serem utilizados pela indústria de enzimas foram os constituídos de PEG/fosfato. Entretanto, com o objetivo de minimizar a poluição ambiental, diferentes maneiras de reciclar os sais foram desenvolvidas. Além de fosfato, outros sais podem ser empregados em SBAs, como sulfatos e citratos (Kula, 1979).

Para SBAs PEG/sal, os efeitos de *salting out* (insolubilização) parecem atuar de maneira mais efetiva como aumento do comprimento da linha de amarração, transferindo as proteínas da fase rica em sal para a fase rica em PEG. Se a solubilidade da proteína na fase rica em PEG não for suficiente, elas tendem a precipitar na interface (Kula, 1982).

Devido ao baixo custo dos sais de fosfato, seu uso é bastante explorado em sistemas de duas fases aquosas para extração de diversas proteínas. Um sistema de duas fases aquosas, constituído por PEG/fosfato, foi desenvolvido por VIDEIRA e AIRES-BARROS (1994) para purificação do ácido clavulânico (AC). O estudo foi realizado com PEG de diferentes massas moleculares e em diferentes valores de pH. Foi observado que o coeficiente de partição do AC foi maior em pH 8. PIZA em 1998 estudou a produção, extração e purificação da quitosanase. Uma purificação primária da quitosanase foi desenvolvida por partição em SBAs PEG/fosfato. Neste trabalho cinco composições de SBAs foram investigadas, onde o autor obteve o melhor sistema para separação constituído de 22% (m/m) de PEG 1500 e 10% (m/m) de sal fosfato. Nesse sistema, a quitosanase foi recuperada na fase inferior em 91% com fator de purificação de 5,2.

No trabalho de ZUNIGA e colaboradores em 2001 foram purificadas as proteínas α -lactoalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg) em SBAs compostos por PEG/fosfato/água, em pH 7 a 25°C. Neste trabalho foi testado o efeito das diferentes massas moleculares de PEG sobre o coeficiente de partição (K), onde os autores observaram que o menor valor de K para a α -la pertenceu ao polímero com maior massa molecular. Para a β -lg foi observada uma tendência inversa de crescimento de K com o aumento da massa molecular do polímero.

Em 2007, RIBEIRO e colaboradores avaliaram a extração da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em SBAs constituídos por PEG (300, 400, 600, 1000 e 1500 Da)/fosfato. Os resultados, incluindo parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a atividade da G6PDH, indicaram parcial purificação desta enzima em SBAs constituídos por 17,5% (m/m) PEG400 e 15,0% (m/m) fosfato. Um alto valor de recuperação enzimática (97,7%), um alto coeficiente de partição (351), e um fator de purificação aceitável foram obtidos na fase superior do sistema. Ainda em 2007, FERREIRA estudou a purificação da bromelina presente na casca e talo do abacaxi, por extração líquido-líquido em SBAs PEG (1500 e 4000 Da) e sal fosfato em diferentes valores de pH. Realizaram-se ensaios em batelada para a extração da enzima, utilizando como indicador o coeficiente de partição. Neste trabalho o fator de purificação indicou que a purificação ocorreu melhor em sistemas com pHs 9, 10 e 11, pontos próximos ao ponto isoelétrico da bromelina.

2.3.3 Distribuição de biomoléculas nos SBAs

Materiais biológicos adicionados aos sistemas bifásicos aquosos distribuem-se entre as duas fases, sem perda de atividade biológica. A razão entre as concentrações de equilíbrio da fase superior (fase leve), C_S , e da fase inferior (fase pesada), C_I , da biomolécula a ser particionada define o coeficiente de partição (K). Esse parâmetro caracteriza a migração da biomolécula no sistema. Quando o valor de K é maior do que 1 a biomolécula concentra-se na fase leve, enquanto que para valores menores, concentra-se na fase pesada. O valor de K é dado pela Equação 2.

$$K = \frac{C_S}{C_I} \quad \text{Equação 2}$$

Em 1986, ALBERTSSON propôs um modelo mais simples para o cálculo de K , desmembrando-o na Equação 3.

$$\ln K = \ln K^0 + \ln K_{el.} + \ln K_{hidrof.} + \ln K_{hifil.} + \ln K_{conf.} + \ln K_{lig.} + \ln K_{tam.} \quad \text{Equação 3}$$

Onde os índices *el.*, *hidrob.*, *hifil.*, *conf.*, *lig.*, *tam.*, referem-se às contribuições eletrostáticas, hidrofóbicas, hidrofílicas, de conformação, de interação com os ligantes e do tamanho das moléculas no coeficiente de partição. O K^0 inclui todos os outros fatores, como relativa solvatação da molécula do soluto nas fases. A forma logarítmica da equação acima é especialmente usada quando diversos fatores são estudados, embora na prática não se use essa teoria para predizer o comportamento da partição, elas têm sido usadas apenas para descrever e observar os comportamentos. Esses modelos sofrem a limitação de examinar apenas o efeito das características das moléculas de proteínas, sem deter-se em analisar detalhes da contribuição das fases que formam o meio. Os modelos não indicam como a massa molecular, concentração ou escolha do polímero formador da fase influenciará a partição em SBAs (Albertsson, 1986).

Em 1992, DIAMOND e HSU expressaram a influência dos fatores ambientais (K_{amb}) e da ordem estrutural das moléculas (K_{est}), em SBA, sobre o valor de K na forma logarítmica da Equação 4.

$$\ln K = \ln K_{amb} + \ln K_{est} \quad \text{Equação 4}$$

Dentre os fatores ambientais estão o tipo e concentração de sais, tipo, concentração e massa molecular do polímero, pH, temperatura e ligantes específicos. Estudos empíricos com SBA mostraram que a distribuição das biomoléculas nos SBAs são funções de fatores como:

- 1. Massa molecular do polímero:** a massa molecular do polímero exerce influência sobre a partição, alterando o equilíbrio e o número de interações entre o polímero e a biomolécula. A massa molecular do polímero afeta também o tempo de separação das fases, mas tal problema pode ser minimizado pela centrifugação do sistema após a mistura das fases (Albertsson, 1986). Ele afeta também o comprimento da linha de amarração, que tende a aumentar com o aumento da concentração dos polímeros (Forciniti et al., 1992). O efeito da massa molecular do polímero é dependente da biomolécula a ser particionada - proteínas com alta massa molecular são mais influenciadas do que as proteínas que possuem baixa massa;
- 2. Concentração dos polímeros:** partículas como organelas e fragmentos de células são mais adsorvidas na interface dos SBAs com o aumento da concentração dos polímeros. A elevação na concentração dos polímeros normalmente provoca o deslocamento da curva binodal e do ponto crítico, alterando a composição entre as fases. Assim sendo, substâncias solúveis são distribuídas preferencialmente em uma das fases, modificando o coeficiente de partição (Albertsson, 1986);
- 3. Potencial hidrogeniônico:** o pH altera as cargas da superfície das proteínas e, conseqüentemente, o seu coeficiente de partição. Com a redução dos valores de pH pode haver desnaturação das biomoléculas. A distribuição de proteínas desnaturadas em soluções líquidas é diferente das proteínas na forma natural, pois apresentam área superficial significativamente maior que na forma nativa (Zunica et al., 2003);
- 4. Adição de sais:** os SBAs sofrem grande interferência pela adição de sais, efeito este chamado de *salting out*, em sistemas polímero/sal. A partição das biomoléculas é fortemente influenciada pela concentração de sal, já que a linha de amarração é aumentada promovendo a transferência do material da fase rica em sal para a fase

rica em polímero, podendo haver precipitação na interface caso o material não seja solúvel (Kula, 1982). A presença de sais em SBAs polímero/polímero é importante para o sucesso da partição de praticamente todas as espécies de biomoléculas. Com a adição de sais nesses sistemas, em concentrações de 0,1 a 0,2 mol/L, gera uma diferença de potencial entre as fases, resultante da preferência dos íons salinos por uma das fases (Zunica et al., 2003);

5. **Interações hidrofóbicas:** quando são usadas baixas concentrações de PEG carregados com grupos hidrofóbicos, ocorre uma elevação da afinidade de proteínas com sítios hidrofóbicos pela fase superior do SBA, assim como proteínas que tenham superfície ou regiões com ligantes hidrofóbicos serão mais facilmente particionadas (Albertsson, 1986);
6. **Conformação da biomolécula:** algumas proteínas apresentam coeficiente de partição constante para uma faixa de pH devido às interações conformacionais, formando dímeros. A partição da proteína é independente da carga líquida da mesma e do pH. SBAs com potencial diferencial zero podem ser obtidos pelo uso de sais ou mistura de sais, favorecendo a partição da biomolécula (Johansson, 1985);
7. **Temperatura:** a influência da temperatura sobre a partição de biomoléculas é percebida de maneira indireta. A temperatura pode levar a mudanças de viscosidade das fases ou na estrutura dos polímeros alterando a forma da curva binodal no diagrama de fases. Sistemas com constituição próxima da composição do ponto crítico são mais afetados por mudanças de temperatura, devido à instabilidade inerente à região do ponto crítico. Um deslocamento da curva binodal pode levar o sistema facilmente para a região monofásica (Zuniga et al., 2003).

2.3.4 Recuperação dos sais e polímeros

A quantidade de reagentes químicos consumidos, sais e polímeros podem determinar a competitividade de extrações com SBA em relação a outras técnicas de biosseparação. Por isso, a possibilidade de reutilização dos constituintes das fases aumenta

linearmente com a escala de produção. A reciclagem de PEG pode ser facilmente integrada ao processo, chegando a níveis de recuperação em torno de 90 a 95%. O PEG pode ser diretamente reutilizado no final de uma etapa intermediária para a primeira etapa de um novo processo de extração (Hustedt et al., 1988). A recirculação dos reagentes constituintes dos SBAs pode reduzir os custos do processo pela diminuição de gastos com reagentes e com tratamento de efluentes.

Considerando o tradicional sistema PEG/dextrana, como a massa molecular do PEG é bem menor e a massa molecular da dextrana é bem maior do que a massa molecular de muitas proteínas, a ultrafiltração pelo uso de membranas semipermeáveis com poros seletivos torna-se uma técnica bastante viável, pois permite que a membrana retenha a proteína particionada, promovendo simultaneamente a remoção do PEG. Esta técnica ainda permite ganhos na purificação, já que proteínas menores ou partículas contaminantes podem ficar retidas na membrana. Outro método baseia-se na transferência da biomolécula para uma fase com baixa concentração de polímero. Quando a proteína se encontra concentrada na fase PEG, pode-se recorrer à adição de um sal que leve a formação de um novo SBA. Ao utilizar condições apropriadas, a proteína pode ser re-extraída e se concentrar na fase rica em sal. Neste caso, o sal pode ser removido por filtração em membrana usando diálise ou ultrafiltração e as proteínas também podem ser removidas por adsorção em trocadores iônicos (Albertsson, 1986; Hustedt et al., 1988; Cabral e Aires-Barros, 1993).

No entanto, a reciclagem de reagentes tem sido estudada basicamente para sistemas PEG/sal. O descarte de sais é geralmente mais problemático. Em sistemas contendo células, ácido nucléico, proteínas solúveis e insolúveis, a separação de sais da fase primária por técnicas de separação mecânica, tais como a centrifugação ou ultrafiltração é muito difícil de ser conduzida eficientemente. A eletrodíálise é considerada um método geral para reciclagem de sais e para dessalinização da fase rica em PEG. Sais também podem ser recuperados usando uma mistura álcool alifático/sal/água. Especificamente para separação do fosfato de potássio, um resfriamento abaixo de 6°C provocou a precipitação do sal, possibilitando a sua reutilização (Papamichael et al., 1992; Hustedt et al., 1988).

2.4 Encapsulação de enzimas

A importância do desenvolvimento de técnicas de imobilização proporciona a reutilização das enzimas em diversos segmentos. O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior em comparação à sua forma livre. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização. Diversos são os métodos utilizados para imobilização de enzimas (Figura 9), em que a escolha do método é determinada, em grande parte, pelas características de solubilidade dos componentes ativos e dos materiais carreados (Dalla-Vecchia, 2004).

Neste trabalho optou-se em imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia* pela técnica de microencapsulação por gelificação iônica.

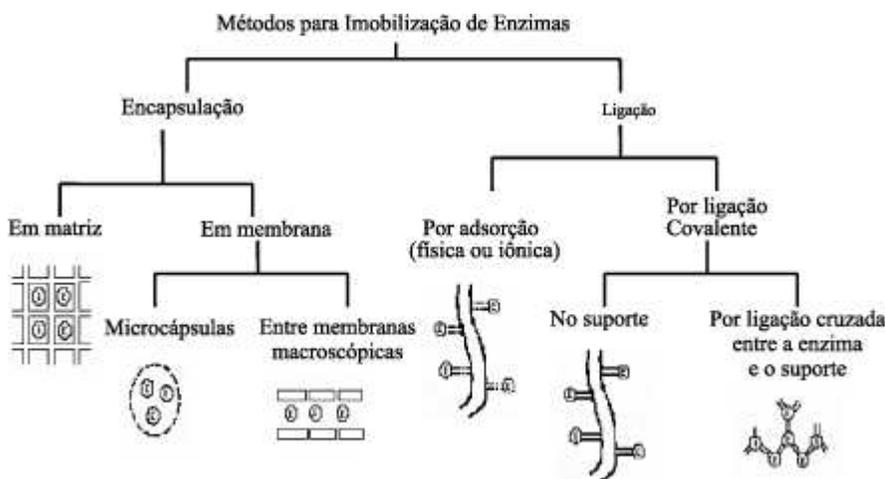


FIGURA 9. Método de imobilização de enzimas (Dalla-Vecchia, 2004).

2.4.1 Microencapsulação

A microencapsulação é um processo físico no qual um filme fino ou camada polimérica é aplicada para envolver sólidos, líquidos ou gases, isolando-os e protegendo-os das condições ambientais, como luz, temperatura, ar e umidade. Com essa técnica é possível controlar a taxa de liberação ou evaporação e facilitar o manuseio do material encapsulado. A liberação do material de recheio pode ocorrer por variação de temperatura e de pH, solubilidade do meio, biodegradação, difusão, ruptura mecânica, permeabilidade seletiva e gradiente de concentração existente em relação ao meio de liberação (Brannon-Peppas, 1993).

Na microencapsulação podem-se formar as microcápsulas que são reservatórios que contêm a substância ativa revestida por polímeros de espessuras variáveis e as microesferas que são sistemas matriciais no qual o material de recheio se encontra uniformemente disperso e/ou dissolvido em uma rede polimérica. As microcápsulas podem ser polinucleares e mononucleares conforme o núcleo esteja ou não dividido no interior da partícula revestida e as microesferas podem ser homogêneas ou heterogêneas, conforme a substância ativa se encontra no estado dissolvido ou na forma de partículas (Figura 10) (Aftabrouhad e Doelker, 1992).

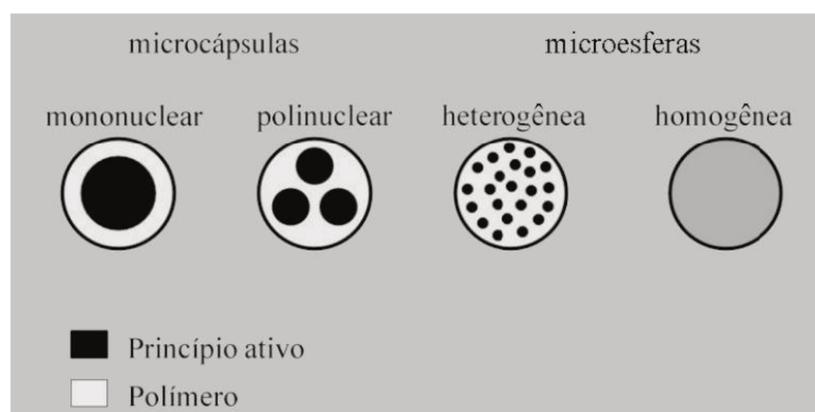


FIGURA 10. Diferentes tipos de micropartículas.

Existem várias técnicas que podem ser utilizadas para microencapsulação, sendo que a seleção do método é dependente da aplicação que será dada à microcápsula, do

tamanho desejado, do mecanismo de liberação e das propriedades físico-químicas, tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante (Jackson e Lee, 1991). A diferença básica entre os métodos existentes está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, visto que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química.

1. **Métodos físicos:** *spray drying*, *spray cooling*, pulverização em banho térmico, leite fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, co-cristalização e liofilização.
2. **Métodos químicos:** inclusão molecular e polimerização interfacial.
3. **Métodos físico-químicos:** coacervação ou separação de fases, emulsificação seguida de evaporação do solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico (Santos et al., 2000).

A tecnologia da microencapsulação tem sido utilizada em diversas indústrias. Os primeiros registros de tentativas de aplicação da técnica de microencapsulação ocorreram em 1930, mas o primeiro produto com material microencapsulado surgiu em 1954 com a empresa norte-americana National Cash Register (NCR) que foi a pioneira ao comercializar um papel de cópia sem carbono, que revolucionaria a indústria de formulários. Esse papel recebeu uma fina camada de microcápsulas de tinta, contendo solução de 2 a 6% de um pigmento adequado disperso em partículas com diâmetro de 1 até 10 μm . A pressão da ponta do lápis na superfície do papel rompia as microcápsulas, liberando o pigmento, que, por contato direto com o revestimento ácido aplicado na superfície frontal da segunda via, mudava de cor em função do pH, propiciando a obtenção da cópia (Ré, 2000; Suave et al., 2006).

Na área farmacêutica permitem o desenvolvimento de fórmulas de liberação lenta onde os agentes ativos agem apenas nos órgãos onde devam agir ou onde serão absorvidos. Nesses produtos, o princípio ativo protegido pela cápsula é liberado gradativamente, à medida que esta se dissolve. Nesta área costuma-se encapsular medicamentos que contenham componente agressivo à mucosa estomacal usando como membrana material resistente ao meio ácido e que só se decompõe em pH alcalino. Dessa forma, a cápsula passa pelo estômago sem se romper, permitindo a absorção do ativo apenas no intestino,

onde o meio alcalino existente propiciará sua liberação, graças à degradação da membrana (Souza, 2010).

Na indústria de alimentos, a microencapsulação é usada para transformar líquido em sólido, de modo a facilitar sua manipulação, transporte e adição em formulações, separar materiais reativos, reduzir toxicidade do material ativo, promover liberação controlada do ativo encapsulado, reduzir volatilidade ou inflamabilidade de líquidos, mascarar sabor e odor de determinados componentes, aumentar a vida de prateleira e proteger contra a luz, umidade e calor (Jackson e Lee, 1991). Entre os materiais que podem ser encapsulados, para aplicação na indústria alimentícia, estão ácidos, bases, óleos, vitaminas, sais, aminoácidos, óleos essenciais, corantes, enzimas e microrganismos (Desai e Park, 2005). Ainda na indústria alimentícia, a encapsulação de enzimas para a reutilização pode resultar em economia de custos, haja vista o grande número de processos industriais e de análises laboratoriais cujas enzimas são utilizadas como catalisadores e são descartadas logo em seguida (Favaro-Trindade et al., 2008). Há um interesse considerável no desenvolvimento de sistemas enzimáticos encapsulados para a aceleração do tempo de maturação e para aumentar o *flavor* de queijos. KAILASAPATHY e LAM (2005) encapsularam a enzima protease durante o processamento de queijos. As enzimas encapsuladas foram incorporadas ao leite durante a fabricação do queijo. O teor de umidade dos queijos foi superior, assim como todos os queijos tratados com a enzima encapsulada mostraram maiores taxas de proteólise do que o queijo controle durante o processo de maturação.

Ainda na área de alimentos, Ré (2001) desenvolveu microcápsulas de sulfato de ferro (FeSO_4) na fortificação de alimentos. Adicionadas ao leite em pó reconstituído, aumentaram em mais de quatro vezes a absorção do ferro pelo organismo em relação ao leite enriquecido com FeSO_4 não encapsulado: a quantidade saltou de 2% a 3% para 13% (<http://revistapesquisa.fapesp.br/>).

Dietas microencapsuladas para peixes também tem sido desenvolvidas. O material de recheio pode ser hidrofóbico ou hidrofílico. ALVIM (2005) produziu microcápsulas desidratadas por *spray-drying*, onde o material de parede foi uma mistura de gelatina com goma arábica e como recheio foi feita uma dieta para produção de partículas com potencial para serem utilizadas como rações para larvas de Pacu.

Também na área de pesticidas as microcápsulas encontram aplicação. Os agrotóxicos encapsulados têm sua atividade prolongada por liberação controlada do princípio ativo. Há ainda outros benefícios, como a redução da volatilização, da fitotoxicidade e da degradação ambiental, além da questão de segurança, pois os pesticidas encapsulados reduzem o perigo de intoxicação a que o usuário é exposto (Souza, 2010).

Na indústria de tintas, o encapsulamento de pigmentos tem como principal objetivo promover uma melhor interação entre o material inorgânico (pigmento) e a matriz polimérica, melhorando desta forma as propriedades mecânicas do sistema composto. OLIVEIRA e colaboradores (2002) apresentaram uma metodologia de encapsulamento do TiO_2 pela técnica de polimerização em emulsão. O pigmento foi previamente modificado pelo titanato em heptano. O titanato usado foi o tri-isoestearato iso-propoxi de titânio, que reage com os grupos hidroxilas da superfície do TiO_2 . O pigmento modificado foi encapsulado em metacrilato de metila (MMA), usando persulfato de amônio como iniciador e dodecil sulfato de sódio (SDS) como emulsificante.

A microencapsulação é muito usada pela maioria dos fabricantes de detergentes e cosméticos, em produtos sem enxágüe como os desodorantes, perfumes e cremes e em produtos com enxágüe: shampoos, sabões e detergentes. No caso específico das fragrâncias, a encapsulação é utilizada para protegê-las dos ataques externos; aumentar a sua estabilidade e permitir liberação progressiva e controlada. Essa liberação pode ser imediata (sistema primário) ou em duas fases (sistema binário). Em sistema primário, a fragrância é percebida imediatamente ao se borrifar o produto ou abrir o pacote. No sistema binário, por exemplo, em um produto sem enxágüe para cuidado dos cabelos, a fragrância pode ser armazenada em cápsulas de polímero catiônico, que se quebram quando o cabelo é penteado, liberando a fragrância. Em desodorizante do tipo bastão, pode se perfumar a massa sólida (fragrância primária) e lhe incorporar perfume encapsulado em membrana hidrossolúvel que irá liquidificar-se pelo suor e, em segundo tempo, liberar o perfume. Assim, pode-se usar uma variedade de elementos para prolongar ou mudar um efeito olfativo nos produtos (Revista Cosméticos & Perfumes, 2005).

Com a finalidade de aprimorar o design de novos produtos, a inserção de microcápsulas mostra-se promissora por agregar diferentes propriedades. HAMMESTER e colaboradores (2008) produziram microcápsulas aromáticas para aplicação em diferentes

tecidos utilizados na confecção de brinquedos que interagem com o olfato dos usuários. Os pesquisadores aplicaram o produto no algodão, viscose e feltro que mantiveram o cheiro característico das frutas nos tecidos mesmo após lavagens.

Na indústria têxtil, com a finalidade de desenvolver tecidos inteligentes, a introdução de microcápsulas traz benefícios para o organismo. Essas microcápsulas, envolvidas em uma membrana especial, contêm princípios ativos que interagem com o corpo. A membrana se rompe pela ação da acidez da pele, pelo aumento da temperatura ou pelo atrito com o tecido, liberando as substâncias. As microcápsulas contêm produtos ativos como o pcm (*phase change materials*), e podem ter a liberação controlada de produtos tais como fragrâncias, óleos essenciais, antibacterianos, e outros, com o objetivo de acrescentarem propriedades funcionais específicas aos artigos têxteis. Podem ser aplicadas por impregnação e pulverização seguidas de termofixação. No caso de produtos como malhas o processo de aplicação pode ser também por esgotamento, uma vez que as microcápsulas têm maior afinidade com as fibras, reagindo com elas durante o processo. A ligação química das microcápsulas de liberação controlada às fibras confere-lhes uma resistência à lavagem superior às atuais microcápsulas coladas por estamperia ou impregnação (Gomes et al., 2009).

A microencapsulação de enzimas para utilização nas técnicas de esterificação e na aplicação de catálise enzimática para reações sintéticas em solventes orgânicos também é usada. Por razões práticas e econômicas, é muitas vezes vantajoso usar enzimas imobilizadas visto que, com poucas exceções, elas são insolúveis em solventes orgânicos. Uma das grandes vantagens da imobilização é poder utilizar o catalisador repetidamente sem considerável perda da atividade catalítica. VECCHIA e colaboradores (1998) imobilizaram a lipase de *Rhizomucor miehei* em cápsulas de quitosana/alginato/glutaraldeído e utilizaram na esterificação do ácido láurico com alcoóis de C2 a C12. A presença de ramificações próximas ao centro nucleofílico do álcool também foi analisada. As conversões mais elevadas foram obtidas com alcoóis lineares de C3 a C6 com conversões entre 84-90% e C8-C12 entre 23-50%. Com os alcoóis ramificados terc-butanol, 1-metil-butanol não foi observada formação de produtos. Com o 3-metil-butanol, a conversão foi de 80%.

A imobilização de células vivas para produção de enzimas também tem encontrado destaque na literatura. GOMES CARNEIRO e BAUER GOMES (1997) encapsularam o fungo *Paecilomyces lilacinus* utilizando uma mistura de alginato de sódio, argila e sulfato de estreptomicina. Para a obtenção das microcápsulas, essa mistura foi gotejada em solução de CaCl_2 0,25 M. O objetivo do trabalho foi avaliar a viabilidade do fungo encapsulado nas matrizes alginato de sódio/argila quando armazenado em duas temperaturas, durante um período de 12 meses. Os autores observaram que em 7°C e 12 meses o fungo manteve a sua viabilidade e 5 meses para temperatura ambiente. Para manter as células vivas ativas por um maior período de tempo, obter maiores rendimentos da atividade enzimática e maior estabilidade operacional, WOLSKI (2008) avaliou a produção da lipase com o *Penicillium sp* na forma livre e imobilizada em alginato de sódio. Os resultados mostraram que a atividade do microorganismo imobilizado foi praticamente 100% superior quando comparado à forma livre.

2.4.2 Microencapsulação por gelificação iônica

A preparação de microcápsulas através da gelificação iônica ou polimerização iônica envolve a gelificação de uma solução polimérica aquosa com um íon de baixa massa molecular, onde polieletrólitos de cargas opostas interagem formando um complexo (Thies, 1995). Os íons de baixa massa molecular têm por função manter as cadeias de alginato juntas pelas interações iônicas após a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias, produzindo gel com estrutura de rede tridimensional. Mediante essa técnica, o material de recheio é extrusado como gota dentro de uma solução, formando uma gota gelificada. Essa técnica de microencapsulamento apresenta condições brandas, é simples, rápida e de baixo custo (King, 1983).

Como material de cobertura, cápsulas de alginato ou pectina de baixo teor de metoxilação são muito usadas com íons cálcio como agente de reticulação. A concentração de polissacarídeo e cátions, a força iônica e o pH determinam a cinética da formação do gel, bem como o volume, estabilidade e porosidade das cápsulas, podendo influenciar na difusão de solutos para dentro e para fora da matriz polimérica. A partir da década 80 tem sido observado um interesse crescente no desenvolvimento de técnicas de imobilização de

enzimas e/ou microrganismos, visando minimizar os efeitos causados pelo seu uso em ambientes adversos, tais como solventes orgânicos, variações no pH e/ou altas temperaturas. A imobilização do biocatalisador em um suporte, sem prejuízo de sua atividade por um período razoável de tempo, pode assegurar sua repetida utilização ou mesmo o uso em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais. Assim, de modo geral, a utilização de materiais imobilizados além de diminuir o custo por análise, aumenta a rapidez e a exatidão do processo. O uso de lipases imobilizadas tem sido crescente devido às grandes vantagens operacionais, de estabilidade e armazenamento em relação à enzima livre (Sebrão et al., 2007).

Geralmente dietas protéicas, carboidratos e partículas insolúveis em água são imobilizados eficientemente mantidos por microcápsulas fabricadas por gelificação iônica. Embora existam diversas técnicas para imobilização, nenhum trabalho de imobilização da lipase por gelificação iônica, a partir do extrato bruto obtido por fermentação da bactéria de *Burkholderia cepacia*, foram encontrados na literatura.

2.4.3 Materiais encapsulantes

Um dos principais fatores que influenciam a estabilidade de compostos encapsulados é a natureza do material encapsulante. A escolha do material a ser utilizado deve levar em consideração as propriedades físicas e químicas do núcleo e da parede, tais como porosidade e solubilidade; viscosidade, propriedades mecânicas, temperatura de transição vítrea, capacidade de formação de filme, além da compatibilidade do núcleo com a parede e mecanismo de controle. Fundamentalmente, o material de parede não deve reagir com o recheio e nem ser solúvel neste, sendo que os dois muitas vezes têm polaridades opostas, ou seja, recheios de características apolares são microencapsulados por materiais de parede polares e vice-versa (Jakson e Lee, 1991).

A seleção do material de parede a ser utilizado para processos de encapsulação envolve procedimentos empíricos com base em critérios, entre os quais: eficiência de encapsulação, estabilidade durante a estocagem, grau de proteção do núcleo e características microscópicas da superfície. Segundo CARDELLO e CELESTINO (1996), o bom agente encapsulante deve apresentar as seguintes propriedades: estabilidade em

emulsão, boa capacidade de formação de película, baixa higroscopicidade e baixa viscosidade.

Os materiais mais utilizados como encapsulantes são:

1. **Carboidratos:** amido, dextrina, açúcar, xarope de milho, celulose;
2. **Gomas:** goma arábica, alginato de sódio, carragena;
3. **Lipídios:** cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, monoglicerídeos e diglicerídeos, óleos e gorduras hidrogenadas;
4. **Poliésteres naturais:** poli (hidroxialcanoato), poli (3-hidroxi butirato) P(3HB), poli (3- hidroxivalerato) P(3HV) e seus copolímeros;
5. **Polímeros sintéticos:** poli (D, L-ácido láctico) (PDLA), poliacrilatos, copolímeros de polietileno-*co*-propileno, poli (ϵ -caprolactona) (PCL);
6. **Proteínas:** glúten, caseína, gelatina, albumina;
7. **Quitossana:** fonte alternativa extraída da casca de crustáceos (Suave et al., 2006).

Dentre esses, os biopolímeros são muito utilizados como material de parede por apresentarem características interessantes, como a liberação controlada de compostos, além da possibilidade de modificação da formação de sua estrutura, que possam influenciar diretamente na difusividade e porosidade da partícula formada. Ingredientes e modificadores adequados (enzimas, plastificantes, reticulantes, múltiplas coberturas) podem ser introduzidos física ou quimicamente para alterar características como solubilidade, permeabilidade, textura, entre outras (Jakson e Lee, 1991; Suave et al., 2006).

Na microencapsulação de substâncias, como citado acima, tanto os polímeros como alguns materiais inorgânicos (silicatos, argilas) são utilizados (Jakson e Lee, 1991). O procedimento mais comum utilizado para a microencapsulação envolve a união de dois ou mais polímeros, em especial polissacarídeos, como alginatos e carragenas que são encontrados em algas marinhas. Estes formam géis em contato com cloreto de cálcio ou potássio e são muito utilizados para inclusão de proteínas e enzimas (Dalla-Vecchia et al., 2004).

Neste trabalho, entre os diversos polímeros, foi utilizado o alginato de sódio para encapsular a lipase de *Burkholderia cepacia*. A estrutura complexa das proteínas e enzimas, responsável pela sua atividade biológica, leva a problemas de formulação porque são múltiplos os parâmetros que podem causar a sua alteração química ou física. Por isso, na

microencapsulação de enzimas e proteínas, a escolha do suporte e do método de imobilização nesse suporte é particularmente condicionada pela garantia da estabilidade do material a encapsular. Dispõe-se atualmente de várias técnicas de imobilização de enzimas, assim como de um grande número de matrizes, englobando materiais orgânicos e inorgânicos, naturais ou sintéticos. PAULA e colaboradores (2008) imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* em suporte híbrido POS-PVA empregando diferentes métodos de imobilização: adsorção física, ligação covalente e encapsulação. As lipases imobilizadas pelas técnicas de adsorção e de ligação covalente apresentaram rendimento de 96,50 e 81,05%, respectivamente. No entanto, não foi possível recuperar a atividade da lipase de *C. rugosa* imobilizada em POS-PVA por encapsulação. Após a imobilização foi observada alteração nos parâmetros de pH ótimo e de temperatura ótima para ambas lipases imobilizadas. Foi ainda detectada mudança na afinidade da enzima imobilizada pelo substrato. Enquanto o K_m da enzima livre foi de 170 μM , as lipases imobilizadas apresentaram os valores de K_m : 409 μM , para a enzima imobilizada por adsorção e 210 μM , para a imobilizada por ligação covalente. Os resultados também mostram que dentre as técnicas testadas para imobilização de lipase de *Candida rugosa*, o sistema imobilizado obtido por ligação covalente foi o mais estável tanto em condições de estocagem como em condições operacionais.

Em outro trabalho, ALLOUE e colaboradores (2008) estudaram a imobilização de lipase de *Yarrowia lipolytica* usando métodos diferentes de imobilização: inclusão, adsorção e ligação covalente. O alginato de sódio e quitosana foram os polímeros selecionados para imobilizar a lipase por inclusão. Entre eles, a quitosana foi o polímero que melhor se adaptou a inclusão da lipase. As microcápsulas de lipase imobilizada foram secas por liofilização e fluidização, contudo observaram queda na atividade enzimática nas que foram liofilizadas em comparação à atividade enzimática das secas por fluidização. A imobilização por adsorção foi com celite e sílica gel, onde os autores observaram maior atividade lipolítica ao usarem celite como suporte (76%) contra 46% ao usarem sílica gel. Embora nas duas técnicas, a enzima apresentou maior estabilidade a temperatura de 50°C e a solventes não polares (isooctano, n-heptano e n-hexano). A lipase imobilizada por ligação covalente manteve uma atividade residual de 70% e após 5 meses de armazenamento ainda manteve 80% da atividade.

2.4.2.1 Alginato de sódio

Os alginatos foram descobertos no final do século 19, são extraídos das paredes celulares de algas marinhas marrons (*Phaeophyta*), onde agem como componente estrutural na parede celular e nos espaços intracelulares, promovendo rigidez e ao mesmo tempo flexibilidade à parede celular, compreendendo cerca de 40% da matéria seca destes organismos. Anualmente, a indústria produz cerca de 30 mil toneladas de alginatos, o que não chega a 10% do material biossintetizado anualmente pelas algas marinhas naturais. Embora as paredes celulares das algas marinhas marrons possuam muito em comum com as paredes celulares de plantas superiores, o ácido algínico encontrado em todas as espécies conhecidas de *Phaeophyceae* não está presente em outros tecidos vegetais. Embora as algas marinhas seja a fonte comercial de alginatos, os de origem bacteriana vêm sendo sugeridos como possíveis substitutos para os alginatos de algas. Até o momento dois gêneros de bactérias foram descritos na literatura por produzir o alginato: *Burkholderia* e *Azotobacter*. Ambos os gêneros produzem o alginato como um exopolissacarídeo durante a fase de crescimento vegetativo, mas a função biológica difere entre os dois gêneros. Enquanto a função biológica do alginato de algas marrons é de componente estrutural de formação, a função dos alginatos das bactérias são mais diversificadas (Remminghorst e Rehm, 2009; Garcia-Cruz et al., 2008).

Os alginatos são polímeros lineares de alta massa moleculares, formados por monômeros de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G), unidos linearmente por meio de ligações glicosídicas α -1,4, onde existem três tipos de estruturas de blocos: de ácido β -D-manurônico (M), de ácido α -L-gulurônico (G) e uma mistura desses blocos (Remminghorst e Rehm, 2009). A composição molecular específica de uma amostra de alginato depende do tipo de alga de que foi extraído e das condições sazonais e ambientais, podendo ocorrer variações nas porcentagens de ácido manurônico (M) e gulurônico (G) A composição e a extensão das seqüências, bem como a massa molecular, determinam suas propriedades físicas (Gombotz e Wee, 1998; Gibbs et al., 1999).

O alginato é insolúvel em água à temperatura ambiente, tornando-se solúvel em temperaturas elevadas. Portanto, os sais de sódio, cálcio e potássio do ácido algínico, solúveis em água, são preferidos para o emprego na indústria de alimentos. O composto

mais amplamente usado é o alginato de sódio. Em muitas aplicações, o alginato de sódio solúvel torna-se insolúvel por meio da adição de cátions divalentes, geralmente cálcio, resultando em géis ou filmes (Garcia-Cruz et al., 2008). A principal vantagem do gel de alginato é sua habilidade em ser termoestável, podendo ser armazenado em temperatura ambiente. Entretanto, a erosão dos géis de alginato é um problema importante, uma vez que pode ocorrer a aceleração na liberação do material de recheio (Sezer e Akbuga, 1999).

A maior aplicação dos alginatos é na indústria alimentícia como agente estabilizante, espessante e gelificante. Como agente encapsulante, o alginato de sódio tem sido bastante empregado nas indústrias farmacêuticas e biotecnológicas, devido à facilidade de formar géis, boa propriedade gelificante, baixo custo, facilidade de uso e ausência de toxicidade (Guerra et al., 1998).

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido no Departamento de Sistemas de Processos Químicos e Informática (DESQ), no Laboratório de Processos de Separação II da Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP – SP. A produção e caracterização da enzima foram feitas no Laboratório de Processos Fermentativos e Tratamento de Águas Residuárias no Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA) da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP – SP. A etapa de gelificação iônica foi feita no Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Nutrição (DEPAN) da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP – SP.

3.1 Materiais

3.1.1 Microorganismos

Foi utilizada a cepa de *Burkholderia cepacia*, obtida da Fundação André Tosello, mantido em tubos de ensaio a 4°C, em agar nutriente.

3.1.2 Equipamentos

Para garantir condições estéreis de crescimento dos microrganismos, dos meios sólidos de propagação, do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados estes foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 min. O agitador orbital utilizado para a produção lipolítica e caracterização enzimática foi o TE-421 da Tecnal e para produção enzimática usou-se o reator BIOFLO III da New Brunswick Scientific.

3.1.3 Reagentes

Os reagentes utilizados no presente trabalho - etapa de produção e caracterização enzimática, purificação e imobilização da enzima - bem como a sua procedência e grau de pureza, estão citados na Tabela 6.

TABELA 6. Reagentes utilizados durante o trabalho experimental.

<i>Reagente</i>	<i>Marca</i>	<i>Grau de pureza</i>
Acetona	Synth	p.a
Ácido acético	Merck	p.a
Acetato de sódio	Merck	p.a
Albumina de soro bovino	Sigma	98%
Alginato de sódio	Synth	p.a
Agar nutrienste	Oxoid	-
Azeite de oliva	Gallo	Grau alimentar
Bicarbonato de sódio	Merck	p.a
Carbonato de sódio	Ecibra	99,5%
Cloreto de alumínio	Ecibra	99%
Cloreto de bário	Ecibra	99,5%
Cloreto de cálcio	Nuclear	p.a
Cloreto de cobalto	Sigma	98,9%
Cloreto de potássio	Synth	p.a
Cloreto de mercúrio	Ecibra	p.a
Etanol	Synth	p.a
Extrato de levedura	Oxoid	-
Fosfato monobásico de sódio	Synth	p.a
Fosfato dibásico de sódio	Synth	p.a
Fosfato monobásico de potássio	Synth	p.a
Fosfato dibásico de potássio	Synth	p.a
Fenolftaleína	Synth	p.a
Goma arábica	Oxoid	-
Iodeto de potássio	Ecibra	99,5%
Óleo de soja	Liza	Grau alimentar
PEG 1500 Da	Synth	-
PEG 4000 Da	Synth	-
PEG 6000 Da	Synth	-
Sulfato de cobre	Synth	p.a
Sulfato ferroso	Synth	98%
Sulfato de magnésio	Synth	99,5%

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo do inóculo e sistema fermentativo

O microrganismo foi transferido a partir de tubos de ensaio com agar inclinado para Erlenmeyers de 125mL contendo extrato de levedura (3g/L), peptona (3g/L), K_2PO_4 (4g/L) e $MgSO_4$ (0,2g/L) e 3% de óleo de soja. A adaptação do microrganismo foi realizada durante 48h a 30°C e 150 rpm em agitador orbital. Após adaptação do microrganismo, o inóculo foi transferido para um biorreator tipo Bioflo III (com volume útil de 5000mL contendo 3000mL de meio). O ar foi fornecido por compressor, esterilizado por filtro de lã de vidro e a vazão foi controlada por meio de rotâmetros. O meio de cultivo estudado por CASTIGLIONI e MONTE ALEGRE (2007) apresentou as mesmas concentrações preparadas para o inóculo, porém com 6% (v/v) de óleo de soja para induzir a produção da lipase. A fermentação foi conduzida a 30°C, pH 7, aeração de 1,5vvm e agitação de 150rpm durante 96 horas.

Neste trabalho, para a produção enzimática foi utilizada a fermentação submersa onde os substratos foram dissolvidos no meio líquido descrito acima (Figura 11).



FIGURA 11. Representação da fermentação submersa.

3.2.2 Obtenção do extrato enzimático

Após as 96 horas de fermentação, o meio foi coletado e centrifugado a temperatura ambiente durante 10 min a 2016g. O sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático, uma vez que a *Burkholderia cepacia* produz lipase extracelular (KORDEL et al., 1991).

3.2.3 Determinação da atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada segundo a metodologia descrita por MACEDO e colaboradores (1997). Para isso foi utilizado uma emulsão contendo 5mL de azeite de oliva e goma arábica a 7%, 2mL de tampão fosfato de sódio pH 8 (10mM) e 1mL de extrato enzimático. A mistura foi incubada por 30 minutos e 150 rpm em agitador orbital. A reação foi interrompida pela adição de 15mL de solução acetona/etanol (1:1 em volume). Os ácidos graxos liberados durante a reação foram titulados com NaOH 0,05N usando fenolftaleína como indicador. Um branco contendo o mesmo meio reacional que os ensaios com a enzima inativa foi utilizado. Calculou-se a atividade enzimática segundo a Equação 5.

$$A (\mu\text{mol} / \text{g} \cdot \text{min}) = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot D \cdot 10^6}{t \cdot v} \quad \text{Equação 5}$$

Onde: A é a atividade lipolítica, V_a é o volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL); V_b é o volume do NaOH gasto na titulação do branco; D é a diluição da amostra; M é a concentração da solução de NaOH, v é o volume de extrato bruto (mL) e t é o tempo de reação (min). Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto

As etapas de caracterização da enzima foram estudadas com o extrato bruto. Os ensaios foram feitos com a finalidade de conhecer as propriedades bioquímicas da lipase produzida por cepas de *Burkholderia cepacia*. Em todos os ensaios as atividades foram determinadas com o método titulométrico descrito acima.

3.2.4 Efeito da temperatura na atividade

Para determinar o efeito da temperatura sobre a atividade lipolítica do extrato bruto em diferentes condições de temperatura foi utilizando agitador orbital a 25, 30, 35, 37, 40, 45 e 50°C, em tampão fosfato 10mM pH 8.

3.2.5 Efeito do pH na atividade e estabilidade

Para determinar o efeito do pH na atividade lipolítica do extrato bruto, ensaios foram feitos variando-se o pH do meio reacional entre 3 e 11. Para isso utilizou-se diferentes soluções tampão seguindo a metodologia descrita por MORITA e ASSUMPCÃO (1995): tampão citrato (pH de 3 a 5), tampão fosfato (pH de 6 a 8) e tampão carbonato-bicarbonato (pH de 9 a 11). A estabilidade ao pH foi determinada pela incubação do extrato bruto em tampões nos valores de pH 5, 8 e 11 por 4 horas a 37 °C. A temperatura de 37 °C foi escolhida para garantir a estabilidade da enzima, de modo que o efeito observado fosse devido apenas ao pH e não devido à desnaturação por efeito da temperatura.

3.2.6 Efeito dos íons na atividade e estabilidade

Para estudar o efeito dos íons (Mn^{2+} , K^{1+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , I^{1-} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+}) na atividade da lipase, adicionou-se 0,3mL de solução salina 10mM aos tubos de ensaio que continha 10mL de extrato bruto. Os tubos foram armazenados a 4°C. Em um dos tubos foi mantido somente o extrato bruto e usado como controle considerando 100% de atividade. A estabilidade e atividade enzimática residual (%) após os 30 dias de armazenagem foram determinadas com o método titulométrico descrito por MACEDO e colaboradores (1997).

3.2.7 Efeito do tempo na atividade

Para determinar o efeito do tempo de incubação sobre a atividade lipolítica, o extrato bruto foi incubado em tampão fosfato 10mM pH 8. A reação e medida do volume de NaOH gasto foram monitorados de 1 a 60 minutos. A cada diferente tempo foi feita a titulação conforme o método descrito na Seção 3.1.3.

3.2.8 Efeito dos parâmetros cinéticos na atividade

Para a determinação da energia de ativação catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia*, foi construído o gráfico de ARRHENIUS considerando as temperaturas de 25 a 50°C. A curva foi traçada entre os valores de temperatura de 25 a 37°C, onde ocorrem valores crescentes de atividade enzimática. O valor da E_a foi calculado pela tangente da curva. O gráfico de MICHAELIS-MENTEN foi obtido através da variação da concentração de substrato (0,1 a 50% v/v). Os valores de K_m e $V_{máx}$ foram calculados a partir do ponto que intercepta o eixo $1/[S]$ e $1/V$ no gráfico de LINEWEAVER-BURK.

3.2.9 Determinação do teor de proteínas

Para determinação da concentração de proteínas no extrato enzimático foi usada a metodologia descrita por BRADFORD (1976), tendo como padrão a albumina de soro bovino (BSA). A curva de calibração (Anexo A) foi feita a partir de uma solução estoque de BSA entre 0 e 1000 mg/L, a estas diluições adicionou-se o reagente e a leitura de absorbância foi feita a 595nm.

3.3 Métodos para preparação das soluções para purificação

3.3.1 Solução estoque sal fosfato

Foram preparadas as soluções tampão pHs 6, 7 e 8 a partir de 20% m/m de fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico (KH_2PO_4/K_2HPO_4), seguindo a

metodologia descrita por MORITA e ASSUMPÇÃO (1995). As soluções foram agitadas em agitador magnético sem aquecimento até a dissolução completa dos sais.

3.3.2 Solução estoque de PEG

Em temperatura ambiente, dissolveram-se os PEGs com massa molecular 1500, 4000 e 6000 Da em água deionizada a fim de obter a concentração de 50% m/m.

3.3.3 Determinação do diagrama de equilíbrio de fases

A construção dos diagramas de fases foi realizada utilizando diferentes composições de PEG e sal fosfato, segundo a metodologia descrita por ALBERTSSON (1986). Para isso utilizou-se uma balança analítica (10^{-3} g) para pesagem da massa dos sistemas e um agitador de torque (vórtex) para agitação dos tubos até completa dissolução.

Vários sistemas bifásicos com volume total de 7mL foram preparados. Em tubos de centrífuga graduados, solução de fosfato a 20% (m/m) foi adicionada lentamente à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) em solução de PEG a 50% (m/m) até atingir a turbidez. Com o surgimento dessa segunda fase anotou-se a massa do sistema, o que forma um ponto com alta concentração de sal e baixa concentração de PEG. O mesmo procedimento foi realizado para obtenção dos resultados com alta concentração de PEG. A construção dos diagramas de fases foi a partir das diferentes composições das soluções de PEG e sal. As diferentes composições permitiram a construção da curva binodal do sistema para cada condição de processo (massa molecular de PEG para todos os pHs do sistema). Por convenção, a concentração do sal que se distribui favoravelmente na fase inferior foi plotado na abscissa e a concentração do PEG que se distribui favoravelmente na fase superior foi plotado na ordenada.

3.3.4 Determinação das linhas de amarração

Os pontos que deram origem às linhas de amarração (tie-lines) foram obtidos para cada condição de pH a partir da massa de solução concentrada de PEG (50% m/m) e sal

fosfato (20% m/m), onde se observou a formação das fases superior e inferior de igual volume. Todos os pontos obtidos foram feitos em triplicata. Para cada sistema PEG/fosfato com pH e massa molecular do polímero variado, foram encontrados três pontos. A determinação das composições das linhas de amarração foi feita utilizando-se o método dos mínimos quadrados e obedeceram a uma correlação mínima de 0,999. No Anexo B estão as representações gráficas das linhas de amarração dos SBAs para cada PEG e pH. Ao prolongar a linha de amarração até a curva binodal determina-se o ponto crítico (PC) de cada sistema.

3.3.5 Obtenção do coeficiente de partição da lipase

Visando a redução da quantidade de experimentos a serem realizados e uma melhor avaliação dos resultados obtidos, foi utilizado um planejamento fatorial 2^3 (TABELA 7), onde foram investigados a massa molecular do PEG (1500, 4000 e 6000 Da), a influência do pH (6, 7 e 8), e o comprimento da linha de amarração (tie-line) (1, 2 e 3) sobre o coeficiente de partição da lipase. Os pHs foram nessa faixa por serem valores próximos ao pH ótimo da lipase de *Burkholderia cepacia* e as linhas de amarração foram as obtidas nas composições das fases.

Cada fator foi variado em três níveis para o planejamento fatorial 2^3 pelo método do ponto central (+1, 0, -1), com triplicata nos pontos centrais, totalizando 11 ensaios.

TABELA 7. Condições de processo para o estudo de partição da lipase de *Burkholderia cepacia*.

<i>Variáveis de Processo</i>	<i>nível inferior (-1)</i>	<i>ponto central (0)</i>	<i>nível superior (+1)</i>
MMPEG	1500	4000	6000
pH	6	7	8
Tie-line	1	2	3

Para cada ensaio, os pontos das linhas de amarração (PADILHA et al., 2010) foram reproduzidos em tubos graduados com volume total do sistema de 7mL. A estes tubos foi adicionado 1mL do extrato bruto que continha a lipase. Assim que o equilíbrio

difusivo foi atingido (entre 12 e 24 horas), coletou-se 1mL de amostra de cada fase. A determinação da atividade lipolítica e da concentração de proteínas totais nas fases inferior e superior foi determinada segundo a metodologia descrita por MACEDO e colaboradores (1997) e através do método de BRADFORD (1976), respectivamente. A distribuição da biomolécula entre as fases de um sistema bifásico aquoso foi caracterizada pelo coeficiente de partição (K), conforme a Equação 6.

$$K = \frac{C_s}{C_I} \quad \text{Equação 6}$$

onde: C_s e C_I são as concentrações de equilíbrio nas fases superior e inferior, respectivamente.

As Equações 7 e 8 foram utilizadas para cálculo dos parâmetros K_{prot} , K_{ativ} , onde FL é a fase leve (PEG) e FP a fase pesada (sal fosfato).

$$K_{prot} = \frac{proteína(FL)}{proteína(FP)} \quad \text{Equação 7}$$

$$K_{ativ} = \frac{Atividade(FL)}{Atividade(FP)} \quad \text{Equação 8}$$

Para o cálculo do fator de purificação (FP), utilizou-se da Equação 9.

$$FP = \frac{AE}{AE(Bruta)} \quad \text{Equação 9}$$

E para a atividade específica usou-se da Equação 10.

$$AE = \frac{atividade\ da\ fase}{concentração\ de\ proteína} \quad \text{Equação 10}$$

Sendo:

- AE: atividade específica das fases leve e pesada.
- AE(Bruta): atividade específica da enzima bruta.

Pela metodologia de análise de variância ANOVA, segundo BARROS NETO e colaboradores (1995), foram analisadas a significância do modelo, o ajuste de dados, o cálculo das médias quadráticas, os erros puros de cada estimativa de parâmetro, a correlação múltipla e as porcentagens de variáveis explicáveis para a partição da lipase. Modelos com os valores de K na forma logarítmica foram testados. Assim como também foi testado modelos usando a atividade específica da lipase. A otimização foi observada através da análise de superfícies resposta (RSM) geradas a partir das equações dos modelos otimizados.

3.3.6 Eletroforese SDS-PAGE e focalização isoeétrica (Isoelectric Focusing – IEF)

As amostras de lipase antes e após a purificação no sistema bifásico aquoso foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE, realizadas no equipamento Mini Protean III (BioRad, EUA) utilizando gel de poliacrilamida, conforme protocolo apresentado por LAEMMLI (1970), na concentração de 7,5%, sendo as amostras tratadas com tampões contendo SDS em condições desnaturantes e redutoras (com a presença de β -mercaptoetanol). A desnaturação das proteínas das amostras foi realizada por aquecimento a 100 °C por 10 minutos. Aliquotas de 15 μ L de cada amostra e 5 μ L de marcador de baixa massa molecular foram aplicadas nos géis de 7,5%. Estes géis foram submetidos a uma voltagem de 180 V, em cuba vertical. O marcador de baixa massa molecular contém as seguintes proteínas: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), α -lactalbumina (14,4 kDa), ambos os kits adquiridos da GE Healthcare (EUA). Para a eletroforese de focalização isoeétrica (*Isoelectric Focusing* - IEF) foi usado o equipamento PhastSystem (Pharmacia, Sweden) a 410 Vh e géis gradientes de acrilamida na concentração de 5% na faixa de pH 3 a 9 da GE Healthcare (USA) de acordo com o método descrito pelo fabricante. Em ambas as técnicas, a coloração dos géis foi feita com nitrato de prata, de acordo com MORRISSEY (1981).

Na análise eletroforética, assim como na determinação do ponto isoeétrico foi usado o melhor ponto obtido no planejamento fatorial 2^3 (PEG1500/fosfato a pH 6).

3.4 Métodos para encapsulamento da enzima lipase

3.4.1 Solução de alginato de sódio

A solução polimérica (4% m/v) foi agitada em agitador magnético a 70°C com agitação lenta até completa dissolução do alginato de sódio.

3.4.2 Solução de cloreto de cálcio

Em temperatura ambiente, dissolveu-se o cloreto de cálcio em água deionizada a fim de obter as concentrações de 2 e 4% (m/v).

3.4.2 Produção das microcápsulas por gelificação

Após resfriar a solução de alginato de sódio a 25°C, esta foi misturada, na proporção 1:1, com o extrato bruto. A mistura foi homogeneizada em Turrax a 10.000 rpm durante 2 minutos. Essa solução foi pulverizada em solução de CaCl₂ a 25°C com um atomizador duplo fluido com pressão de ar de 0,90Kgf/cm² em agitação lenta constante (Figura 12). A altura entre o atomizador e o banho foi de 12 cm. Foi feito um planejamento fatorial 2² variando o diâmetro do bico atomizador (2 e 0,5 mm) (Figura 13) e a concentração de CaCl₂ (2 e 4% m/v) totalizando 4 ensaios, conforme a Tabela 8. A falta de um ponto central neste planejamento foi devido à ausência de um terceiro bico para a atomização. Após a atomização, as microcápsulas foram mantidas no banho iônico por 30 minutos (tempo de cura), e então separadas em peneiras (25µm) e lavadas com 700mL de água destilada.

TABELA 8 - Condições de processo para o encapsulamento da lipase de *Burkholderia cepacia*.

<i>Variáveis de Processo</i>	<i>nível inferior (-1)</i>	<i>nível superior (+1)</i>
Bico atomizador (mm)	0,5	2
Concentração de CaCl ₂ (%)	2	4



FIGURA 12. Equipamento usado na gelificação iônica.

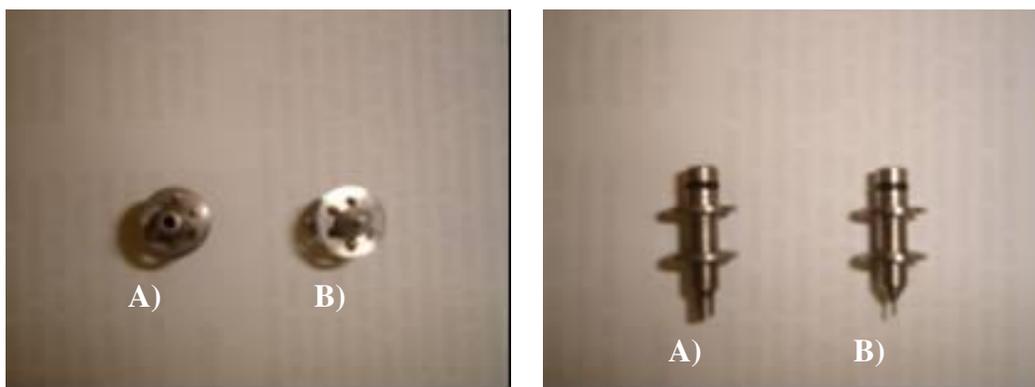


FIGURA 13. Diâmetro dos bicos atomizadores A) 2mm; B) 0,5mm.

3.4.3 Secagem das microcápsulas

Após a produção, as microcápsulas fabricadas foram secas em estufa a 30°C. Este procedimento foi utilizado na secagem para que a atividade da enzima fosse mantida, já que a liofilização pode inativar a lipase de *Burkholderia cepacia* devido à queda brusca de temperatura (Alloue et al., 2008).

3.4.4 Estabilidade da lipase antes e após a encapsulação

Em triplicada, verificou-se a estabilidade da lipase antes e após a imobilização com o método titulométrico descrito na Seção 3.2.3.

3.4.5 Caracterização físico-química

3.4.5.1 Distribuição de tamanho e diâmetro médio

O Microscópio Óptico da JEINS, Modelo JENAVAL do Laboratório de Microestrutura de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP foi utilizado para analisar a distribuição e tamanho das microcápsulas.

Neste microscópio está adaptada uma câmera digital colorida modelo TA-0124-XS da ANDS com o objetivo de capturar as imagens das superfícies analisadas e transferi-las para o computador em imagem digital. O aumento da lente objetiva usada nas análises foi de 12,5 vezes e o aumento da lente ocular de 1,25 vezes. Utilizou-se do programa EDN2 Microscopy Image Processing System para determinação do diâmetro das microcápsulas. Para obter o diâmetro médio, o programa fez medições em aproximadamente 300 microcápsulas de cada amostra.

3.4.3.1 Morfologia e microestrutura

O microscópio eletrônico de varredura LEO, modelo LEO 440i, do Laboratório de Uso Comum da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP foi utilizado para verificar a morfologia das microcápsulas. As amostras foram cortadas em formato retangular de aproximadamente 0,7 por 0,4 cm e adaptados no porta-amostra para a metalização com ouro. Esta técnica permitiu também analisar as microestruturas formadas na superfície das microcápsulas, para isto foi utilizado um aumento de 1.500 e 5.000 vezes para amostras com bico de 0,5 e 2,0 mm, respectivamente. As condições de tensão foram de 15 KV e de corrente 50 pA.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da lipase de *Burkholderia cepacia*

4.1.1 Efeito da temperatura na atividade

A atividade catalítica das enzimas é bastante dependente da temperatura, no entanto, à medida que a temperatura se eleva, dois efeitos ocorrem: a taxa de reação aumenta e diminui a estabilidade da enzima devido à desativação térmica, por isso, a temperatura é um dos agentes críticos sobre a atividade enzimática. Neste trabalho, ensaios de 25 a 50°C foram feitos para determinação da temperatura ótima de atuação da lipase conforme mostra a Figura 14. Com base nos resultados, observou-se que a 37°C a atividade da lipase apresentou valor máximo (1,85 U/mL), correspondendo a atividade específica de 29,30 U/mg. A maior variação encontrada para os valores de atividade foi de 17% (entre 25 e 37°C). No entanto, a 50°C houve perda de atividade de apenas 10% em relação à temperatura de 37°C. Algumas enzimas podem perder sua atividade com pequenas variações na temperatura, pois a mudança em sua conformação faz com que seu sítio ativo perca a especificidade de reagir com o substrato. Pela variação dos resultados da atividade é provável que a lipase produzida por *Burkholderia cepacia* tenha um ou dois sítios ativos, pois dependendo da mudança conformacional da molécula, a enzima não perde totalmente sua atividade. Em 1996, PENCREAC'H E BARRATI observaram que a temperatura ótima de atuação da lipase de *Pseudomonas cepacia* coincide com este resultado. Valores semelhantes (40°C) foram encontrados por MAKHZOUM e colaboradores (1996), para a lipase de *Pseudomonas fluorescens* e PASTORE e colaboradores (2003) utilizando lipases de *Rhizopus sp.* No entanto, KOJIMA e SHIMIZU (2003) caracterizaram lipases de *Pseudomonas fluorescens* HU380 e obtiveram 45°C como temperatura ótima, por outro lado, NAWANI e colaboradores (2006), encontraram como temperatura ótima a faixa de 60-65°C para as lipases mobilizadas e 60°C para as lipases livres de *Bacillus sp.*

A energia de ativação da hidrólise do azeite pela lipase foi obtida pela regressão linear do logaritmo natural da velocidade de reação (mol/min.g de enzima) em função do inverso da temperatura (K), seguindo o método de ARRHENIUS (Aguilar et al., 2000)

(Figura 15). Considerando-se o valor da constante dos gases ideais igual a 8,31451 J/(mol.K), pode-se dizer que o valor da energia de ativação desta reação foi próxima de 10,1 kJ/mol. Até o presente momento não foram encontrados na literatura dados acerca do cálculo da energia de ativação da lipase de *Burkholderia cepacia* por outros autores.

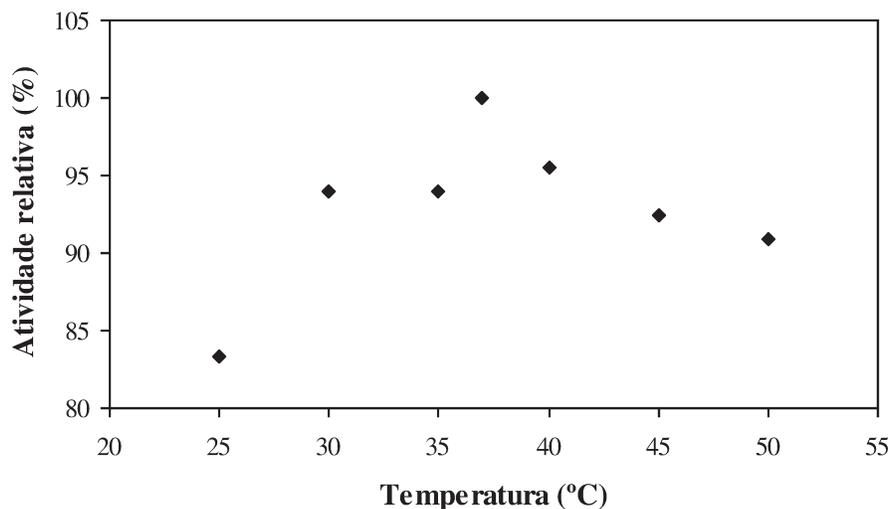


FIGURA 14. Efeito da temperatura na atividade da lipase de *Burkholderia cepacia* (5,0 mL de emulsão de azeite de oliva 7,5% e goma arábica 2,5% em tampão fosfato de sódio 10mM pH 8).

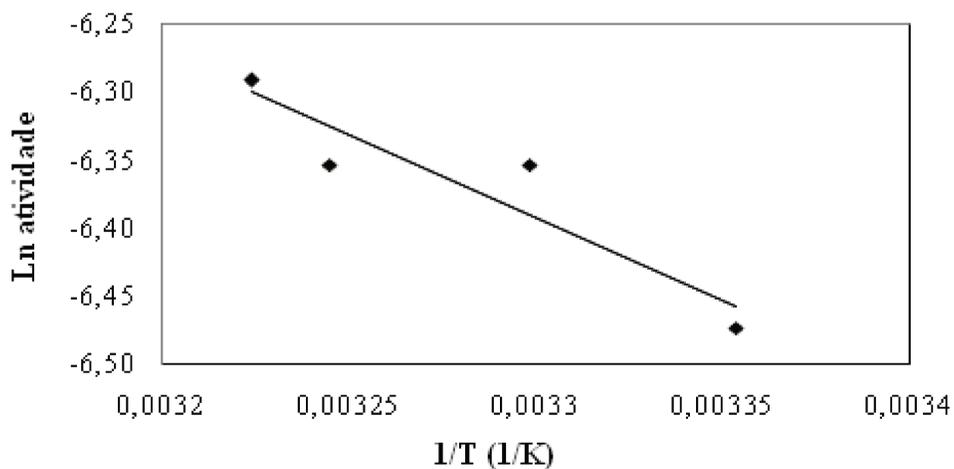


FIGURA 15. Determinação da energia de ativação pelo gráfico de ARRHENIUS da reação de hidrólise do azeite de oliva por lipase de *Burkholderia cepacia*. Equação da reta tangente: $y = -1214x - 2,385$

4.1.2 Efeito do pH na atividade e na estabilidade

O efeito do pH sobre a hidrólise do azeite de oliva pela lipase de *Burkholderia cepacia* foi investigado na faixa de pH de 3 a 11. Foram mantidas aproximadamente 80% da atividade nos pHs 5 a 7, com atividade máxima no pH 8 (1,85 U/mL e atividade específica de 29,30 U/mg). Pequenas variações na atividade da enzima foram encontradas em pHs mais ácidos, porém em condições básicas observou-se maior sensibilidade da lipase. Perda de 80% de atividade da enzima foi verificada a pH 11. Esses resultados são apresentados na Figura 16, onde nota-se que a lipase de *Burkholderia cepacia* é alcalina e análoga à lipase de *Pseudomonas fluorescens* 2D estudado em 1995 por MAKHZOUM e colaboradores. Resultados semelhantes foram encontrados em 2002 por SHARMA e colaboradores, após a purificação da lipase de *Bacillus* sp nos pHs 8 e 9, entretanto, BRADDOO e colaboradores (1999) encontraram como pH ótimo para a lipase do *Bacillus stearothermophilus* SB-1 valores entre 3 e 6. Lipase de *Pseudomonas fluorescens* HU380 apresentaram 7 como pH ótimo (Kojima e Shimizu, 2003). Esses valores demonstram que a lipase pode ser trabalhada em diferentes faixas de pHs. Assim como na temperatura, as enzimas apresentam melhor atividade a uma faixa de pH, o efeito do pH sobre as enzimas deve-se as variações do estado de ionização dos componentes do sistema à medida que o seu valor varia. Como as enzimas são proteínas com muitos grupos ionizáveis e em diferentes estados de ionização, a atividade catalítica fica restrita a uma pequena faixa de pH (Almeida et al., 2008).

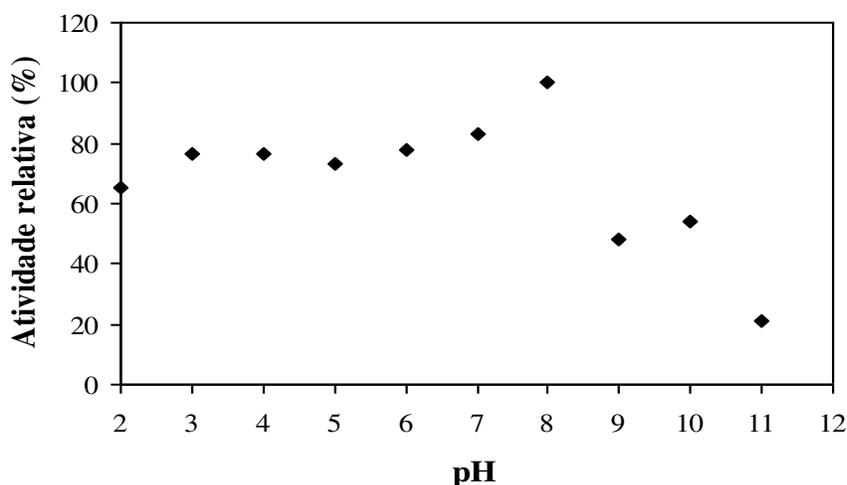


FIGURA 16. Efeito do pH na atividade da lipase de *Burkholderia cepacia* (5,0 mL de emulsão de azeite de oliva 7,5% e goma arábica 2,5% a 37°C).

A estabilidade da atividade enzimática do extrato bruto de *Burkholderia cepacia* em diferentes tampões com valores de pH 5, 8 e 11 também foi investigada. A atividade máxima (100%) foi observada no pH 8 em tampão fosfato, após incubação de 4 horas a 37°C, enquanto que no pH 5 a atividade foi 35% menor em relação à maior atividade ao final de 4 horas. Em pH 11 a atividade reduziu consideravelmente, embora nessa condição mais alcalina e com atividade relativamente mais baixa, a enzima manteve-se estável durante as 4 horas de incubação (Figura 17).

Essa enzima mostrou boa estabilidade em pHs alcalinos e ácidos nas 4 horas de análise, podendo ser empregada em diversos seguimentos industriais que trabalhem dentro da faixa de pH estudada.

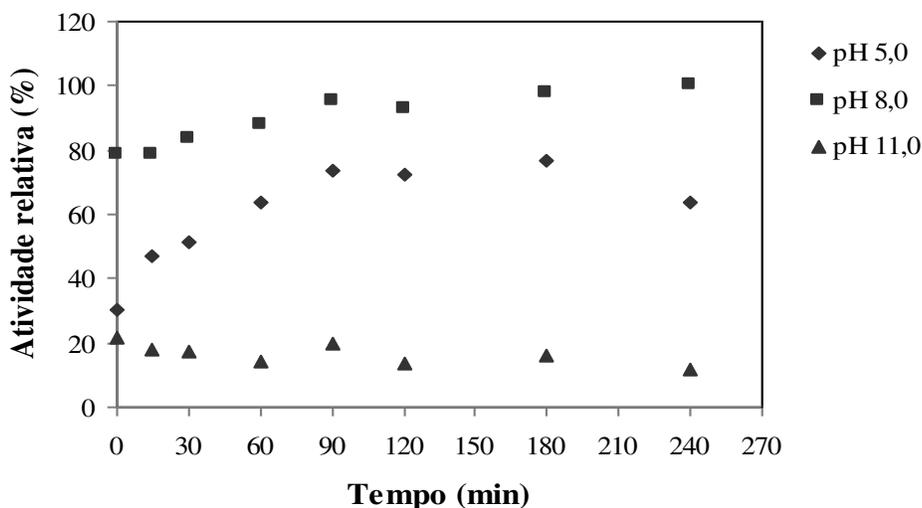


FIGURA 17. Efeito na estabilidade do pH da lipase de *Burkholderia cepacia* (5,0 mL de emulsão de azeite de oliva 7,5% e goma arábica 2,5% a 37°C).

4.1.3 Estabilidade com diferentes íons

Um estudo para verificar quantos dias o extrato bruto enzimático manteria sua atividade frente à adição de diferentes íons foi realizado e os resultados são apresentados na Figura 18. Esse estudo demonstrou que íons como Fe^{2+} e Hg^{2+} diminuiriam significativamente a atividade lipolítica, causando inativação em menos de 10 dias de armazenagem. Por outro lado, a adição dos íons Ba^{2+} , Ca^{2+} e Mn^{2+} , conseguiram manter boa

atividade enzimática durante os 30 dias, observando queda de atividade mais significativa a partir do 15º para os íons Ba^{2+} e Ca^{2+} e 7º dia para o Mn^{2+} . Esses íons mantiveram ainda grande porcentagem de atividade enzimática no 30º dia em relação ao 1º dia. O íon I^{-} reduziu rapidamente sua atividade lipolítica nos primeiros dias de armazenagem, embora após esse período manteve-se 23% de atividade enzimática até o 30º dia. Íons como Al^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} e K^{1+} fizeram com que a atividade lipolítica diminuísse em 75, 40, 45 e 50% até o 10º dia, respectivamente. Foi feito também um estudo de atividade enzimática no extrato bruto, onde verificou-se queda de atividade gradativa no decorrer dos dias de armazenagem e no final do 30º dia houve queda de atividade de aproximadamente 80% em relação à armazenagem inicial. Estudos semelhantes com lipases de *Pseudomonas fluorescens* 2D foram feitos por MAKHZOUM e colaboradores em 1995 onde os íons Co^{2+} e Hg^{2+} mostraram ser fortes inibidores dessa enzima, enquanto Cu^{2+} e Ba^{2+} causaram inibição moderada e o Fe^{2+} não causou nenhum efeito sobre as lipases, o que pode ser atribuído à complexação desses íons com a enzima.

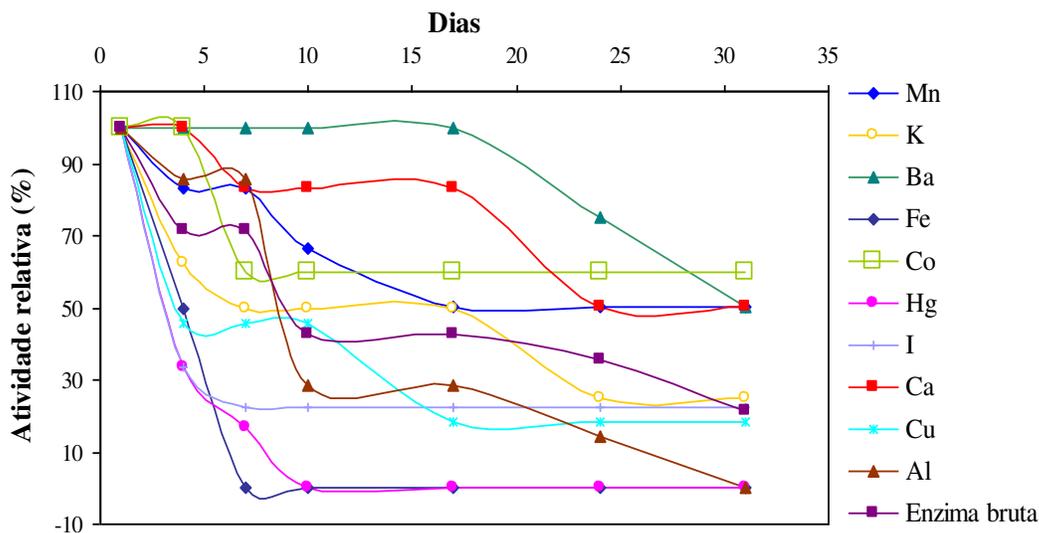


FIGURA 18. Efeito dos íons na atividade da lipase de *Burkholderia cepacia* (5,0 mL de emulsão de azeite de oliva 7,5% e goma arábica 2,5% em tampão fosfato de sódio 10mM pH 8 a 37°C).

A Tabela 9 mostra a atividade residual da lipase de *Burkholderia cepacia* ao final de 30 dias de armazenagem. A atividade lipolítica teve considerável ativação (40% de aumento na atividade) com o ânion I^{-} . Os íons Mn^{2+} , Co^{2+} e Ca^{2+} mantiveram a estabilidade da enzima durante esse período e os íons Fe^{2+} , Hg^{2+} e Al^{3+} atuaram como

inibidores, causando considerável inativação enzimática. A adição de íons às lipases de *Bacillus sp* RSJ-1 estudados por SHARMA e colaboradores (2002) mostraram que na presença de Ba^{2+} a enzima manteve-se estável, por outro lado, íons como K^{1+} e Co^{2+} foram grandes inibidores da enzima lipolítica, no entanto Ca^{2+} manteve a enzima bastante ativa (125% de aumento na atividade em relação ao controle). Nos estudos de MAKHZOUM e colaboradores (1995), em lipases de *Pseudomonas fluorescens* os íons Co^{2+} e Ba^{2+} corroboraram com esses resultados e LIMA e colaboradores (2004) para a lipase de *Penicillium aurantiogriseum* encontraram alguns resultados semelhantes aos desse trabalho, onde íons Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} mantiveram 70, 79, 105, 69 e 0% da atividade residual, respectivamente. Trabalhos sobre o efeito de íons na estabilidade e atividade enzimática de lipases de *Burkholderia cepacia* não foram encontrados até o presente momento.

TABELA 9. Efeito dos íons a 10mM sobre a atividade da lipase de *Burkholderia cepacia* após 30 dias de armazenagem.

<i>Soluções 10m M</i>	<i>Atividade residual (%)</i>
MnSO ₄	100
KCl	60
BaCl ₂	60
FeSO ₄	0
CoCl ₂	100
HgCl ₂	0
KI	140
CaCl ₂	100
CuSO ₄	60
AlCl ₃	0
Controle	100

4.1.4 Efeito do tempo em relação a atividade lipolítica

Um estudo da medida de volume de NaOH gasto na titulação versus tempo de incubação do meio reacional foi feito. Este estudo serviu de parâmetro para analisar se tempos menores do que 30 minutos de incubação para medida de atividade lipolítica

poderiam ser utilizados. Na literatura, métodos titulométricos de análises da lipase propõem tempos de análise de 30 minutos de incubação para medida de atividade. Conforme observado na Figura 19, nota-se a partir de 10 minutos até 30 minutos de incubação, a quantidade de NaOH gasto na titulação entre um tempo e outro foi muito pequeno, deixando os valores praticamente na mesma ordem de grandeza. Por isso, nas etapas de purificação da lipase de *Burkholderia cepacia* neste trabalho, reduziu-se o tempo de incubação de 30 para 15 minutos para medir a atividade. Esse procedimento auxiliou para minimização dos tempos de análise da lipase purificada e pode ser usada também para minimizar o tempo de análise em trabalhos posteriores.

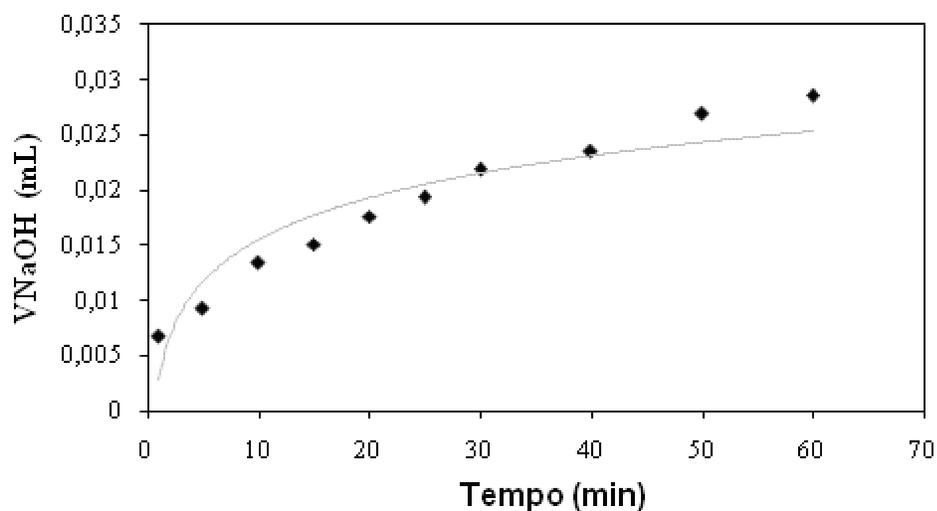


FIGURA 19. Efeito do tempo de incubação na atividade da lipase de *Burkholderia cepacia* (5,0 mL de emulsão de azeite de oliva 7,5% e goma arábica 2,5% em tampão fosfato de sódio 10mM pH 8 a 37°C).

4.1.5 Cinética da reação de hidrólise do azeite de oliva por lipases de *Burkholderia cepacia*

A determinação dos parâmetros cinéticos foi realizada a temperatura de 37 °C e pH 8. Os dados obtidos experimentalmente permitiram a obtenção da curva cinética, que mostra a influência da emulsão azeite - água contendo diferentes proporções de azeite de oliva (0,1 a 50% v/v) na velocidade de reação da lipase de *Burkholderia cepacia*. Observou-se que a atividade aumenta de acordo com o aumento da concentração do substrato, conforme a Figura 20.

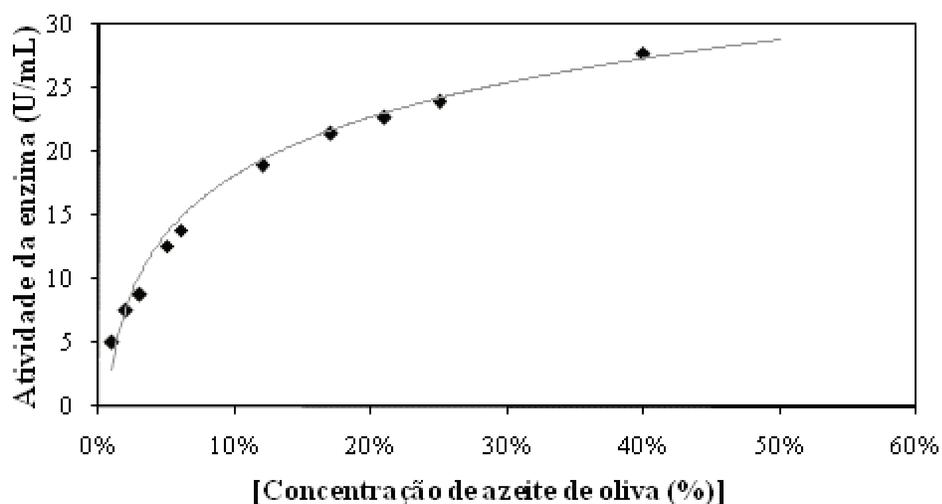


FIGURA 20. Efeito da concentração de substrato na atividade da lipase de *Burkholderia cepacia* (5,0 mL de emulsão de azeite de oliva e goma arábica com diferentes concentrações em tampão fosfato de sódio 10mM pH 8 a 37°C).

Para tentar descrever o comportamento cinético da lipase de *Burkholderia cepacia*, os dados foram analisados segundo a equação de MICHAELIS-MENTEN (Equação 11).

$$V_0 = \frac{V_{Máx} * [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Equação 11}$$

A Figura 21 é a linearização dos dados cinéticos de acordo com a metodologia de LINEWEAVER-BURK. Através da equação, foi possível determinar os valores de K_m 43,90 mg/mL e $V_{máx}$ 0,0258 U/mg.

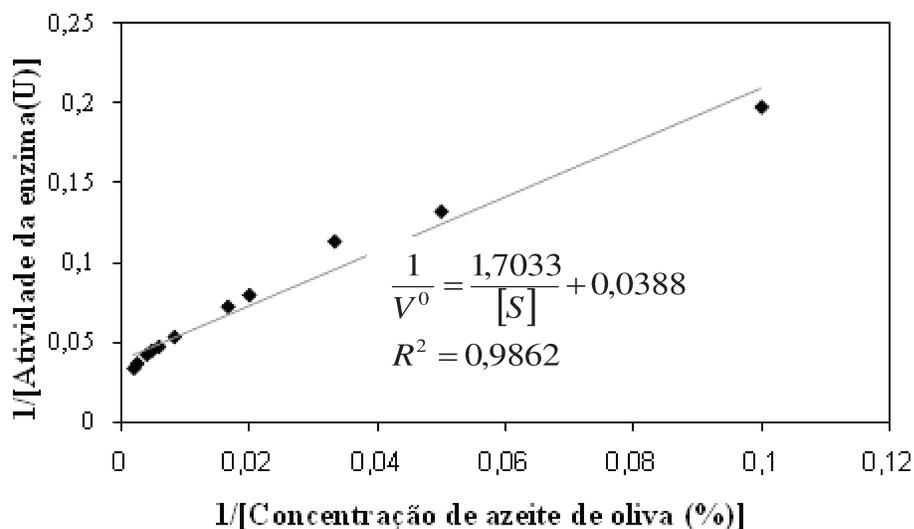


FIGURA 21. Gráfico de LINEAWEAVER-BURK para a lipase de *Burkholderia cepacia* (5,0 mL de emulsão de azeite de oliva e goma arábica com diferentes concentrações em tampão fosfato de sódio 10mM pH 8 a 37°C).

4.2 Purificação da lipase de *Burkholderia cepacia*

4.2.1 Diagrama de fases

4.2.1.1 Efeito da massa molecular do PEG sobre o diagrama de fases

Os diagramas de fases referentes aos PEG 1500, 4000 e 6000 Da para os pHs 6, 7 e 8 são mostrados respectivamente, nas Figuras 22, 23 e 24. Nesse estudo, foi observado o comportamento desses sistemas ao se fixar o pH e variar a massa molecular do polímero. Observando as figuras, foi possível perceber um leve deslocamento das binodais de menor massa molecular do PEG se afastando dos eixos, ou seja, quanto menor a massa molecular do polietileno glicol, maior a concentração necessária para a formação do sistema bifásico aquoso, essa observação corrobora com ALBERTSSON (1986). O mesmo comportamento foi observado por VENÂNCIO e colaboradores (1995) ao se estudar o sistema PEG 4000 e 8000 Da/goma de Guar e SARUBBO (2000) para o sistema PEG1500, 4000 e 6000 Da/goma de cajueiro.

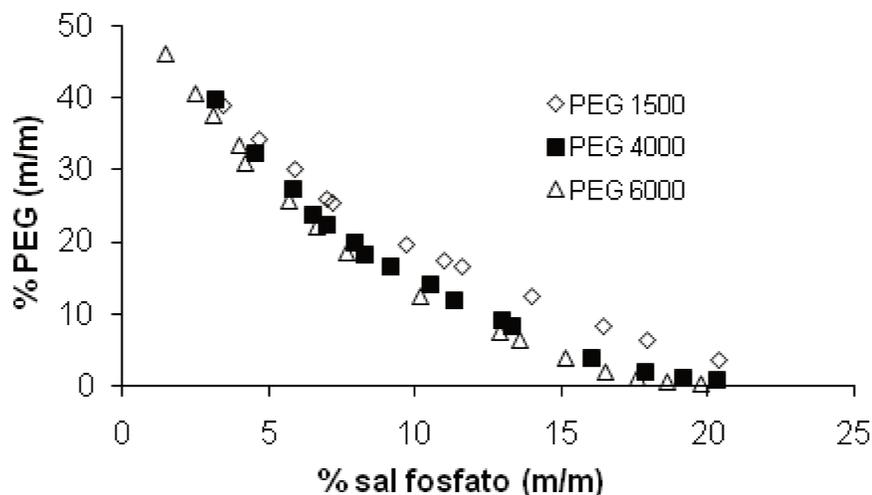


FIGURA 22. Comportamento do SBA PEG/fosfato a pH 6 para diferentes massas moleculares de PEG.

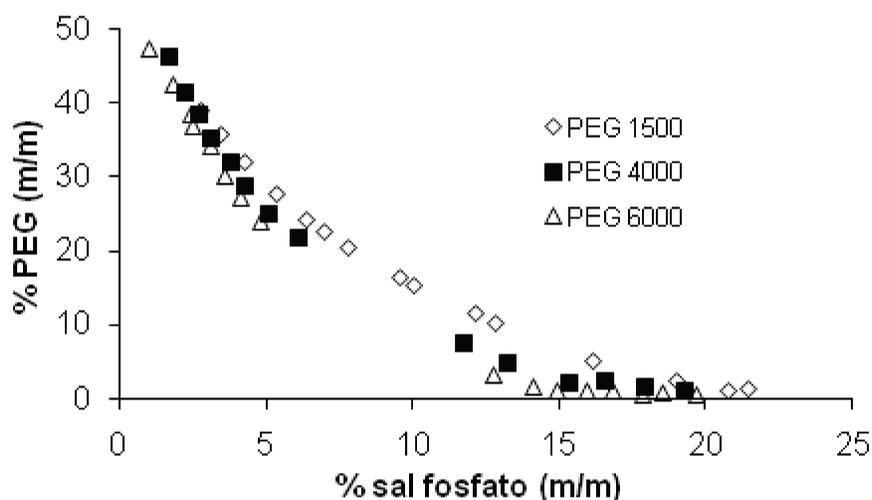


FIGURA 23. Comportamento do SBA PEG/fosfato a pH 7 para diferentes massas moleculares de PEG.

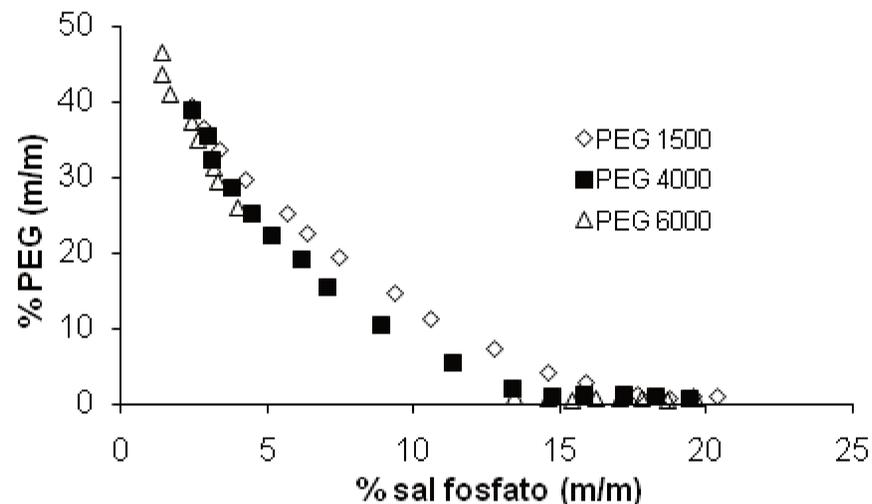


FIGURA 24. Comportamento do SBA PEG/fosfato a pH 8 para diferentes massas moleculares de PEG.

4.2.1.2 Efeito do pH sobre o diagrama de fases

A fim de observar o efeito do pH sobre o comportamento dos diagramas de fases do SBA PEG/fosfato fixou-se a massa molecular do polímero variando o pH, como pode ser visto nas Figuras 25, 26 e 27. Ao analisar os gráficos nota-se que em menores valores de pH uma maior concentração dos componentes foi usada para a formação do SBA. Essa observação foi feita em 1992 por FRANCO, em sistemas PEG/sal onde o autor observou que a diminuição do pH provocou um deslocamento da binodal no sentido de maior concentração dos constituintes das fases. Estudos realizados por VIDEIRA e AIRES-BARROS (1994) para SBAs PEG/fosfato, a redução do pH de 8 para 7 aumentou a concentração de polímeros e sais requeridos para a formação das fases. Os autores concluíram que quando o pH diminui, a proporção de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ aumenta devido a rejeição do PEG por grupos ânions multivalentes, neste caso, uma maior concentração de sal e/ou polímero torna-se necessária para obter um sistema bifásico. Por outro lado, PADILHA e colaboradores (2010) verificaram que o comportamento desses sistemas em diferentes valores de pHs apresentou um deslocamento não significativo das binodais. O que leva a concluir que a estabilidade destes sistemas frente às variações de pH e seu efeito sobre os SBAs não possuem características próprias (Diamond e Hsu, 1992).

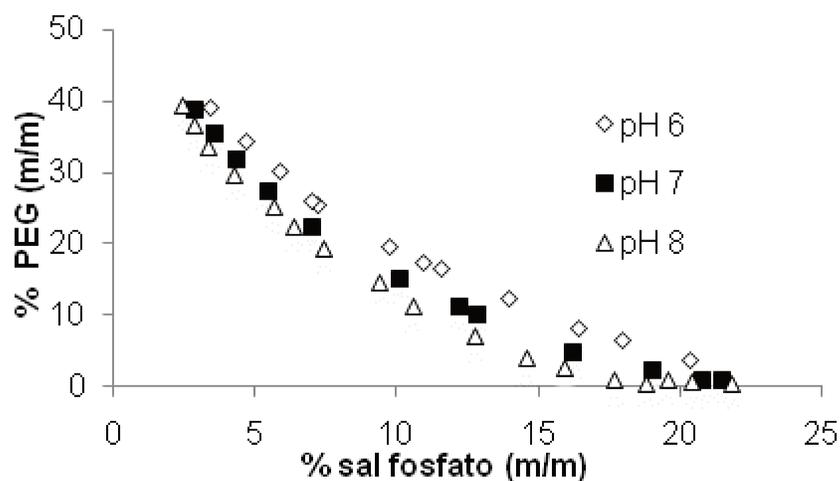


FIGURA 25. Comportamento do SBA PEG1500/fosfato em diferentes pHs.

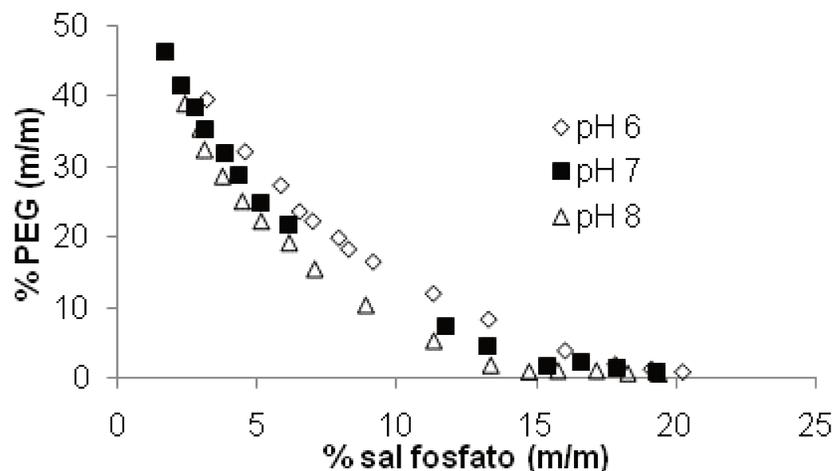


FIGURA 26. Comportamento do SBA PEG4000/fosfato em diferentes pHs.

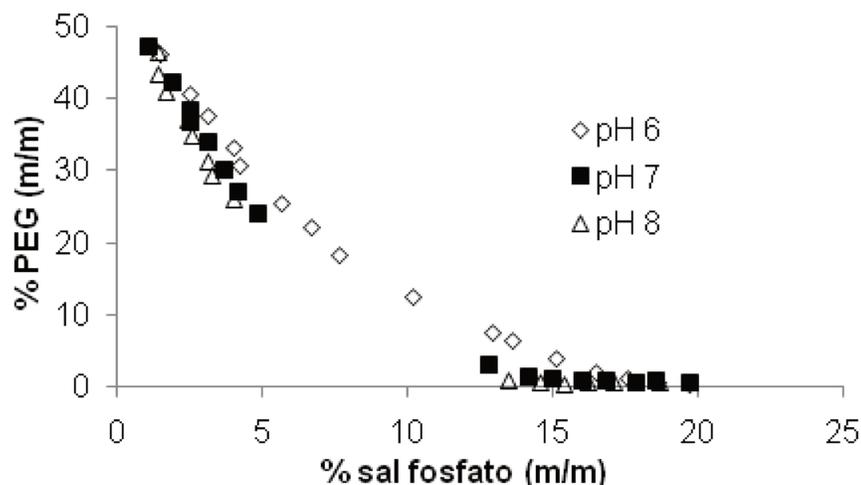


FIGURA 27. Comportamento do SBA PEG6000/fosfato em diferentes pHs.

4.2.2 Estudo do comportamento das tie-lines

A partir da caracterização dos diagramas de fases foram obtidas as linhas de amarração para posterior purificação das enzimas. As linhas de amarração para as diferentes condições de pH e massas moleculares de PEG são apresentadas na Tabela 10. A partir dos resultados foi possível verificar que não houve variação significativa entre as composições das linhas de amarração (tie-lines) para as diferentes massas moleculares do PEG em relação à variação do pH do sistema.

TABELA 10. Composição total do sistema com diferentes massas moleculares de PEG e pHs.

	Tie pH	line	Composição total do sistema (%m/m)			Composição da fase superior (%m/m)			Composição da fase inferior (%m/m)		
			PEG	SAL	H ₂ O	PEG	SAL	H ₂ O	PEG	SAL	H ₂ O
PEG 1500	6,0	1	17,8	12,9	69,3	31	5,6	63,4	5	19,5	75,5
		2	16,6	12,7	70,7	27,2	7	65,8	6,5	17,9	75,6
		3	14,8	12,6	72,6	21	9,3	69,7	9	16	75
	7,0	1	19,3	12,3	68,4	37,5	3,1	59,4	1,5	21	77,5
		2	16,3	12,3	71,4	31	4,6	64,4	2	19,4	78,6
		3	14,7	11,7	73,6	25	6,6	68,4	4,5	16,5	79
	8,0	1	17,9	12	70,1	35	3,2	64,8	0,7	20,5	78,8
		2	16,8	11	72,2	33	3,6	63,4	0,6	18,7	80,7
		3	15,8	10,6	73,6	29	4,4	66,6	1,9	16,8	81,3
PEG 4000	6,0	1	16,7	13,3	70	32	4,6	63,4	1,4	21,7	76,9
		2	11,4	13,8	74,8	21	7,9	71,1	1,5	19,5	79
		3	5,7	15,3	79	12,5	9	78,5	2	17,9	80,1
	7,0	1	16,2	13,5	70,3	26	5,3	68,7	6,4	22	71,6
		2	12,4	13,4	74,2	21	6,6	72,4	3,3	20	76,7
		3	8,5	13,5	78	18,5	2,1	79,4	8,3	14,5	77,2
	8,0	1	19,5	11	69,5	19,5	2,2	78,3	2,4	37	60,6
		2	17,1	10,1	72,8	33	3	64	0,3	17	82,7
		3	14,7	9	76,3	28,5	4	67,5	1	14	85
PEG 6000	6,0	1	19	12,3	68,7	36	3,4	60,6	1,7	21	77,3
		2	13,1	12,6	74,3	25	6	69	1,3	18	80,7
		3	9,7	12,3	78	17	8,5	74,5	2,2	16	81,8
	7,0	1	21	11,6	67,4	38,5	2,3	59,2	4,2	21	74,8
		2	17,5	11,1	71,4	34	3,3	62,7	1,2	18,5	80,3
		3	14,6	10,8	74,6	29	4,2	66,8	0,3	17,5	82,2
	8,0	1	23,7	10,5	65,8	43,6	1,4	55	20	3	77
		2	21,1	10,1	68,8	39	2	59	19	1,8	79,2
		3	18,3	9,9	73,5	35	2,8	62,2	18	0,5	81,5

4.2.3 Avaliação do coeficiente de partição (K) da lipase de *Burkholderia cepacia*

As Tabelas 11 e 12 apresentam o resultado do planejamento fatorial 2^3 com os valores de atividade da enzima e da proteína, atividade específica (AE) e fator de purificação (FP) para a fase superior e inferior, respectivamente. A partir desses resultados foi possível avaliar a influência da massa molecular do polímero, do pH e da linha de amarração (tie-line) (TL) sobre a partição no sistema PEG/fosfato.

TABELA 11. Resultados obtidos de partição da lipase de *Burkholderia cepacia* para cada condição do planejamento fatorial 2³ na fase superior do SBA PEG/fosfato.

Análise	PEG	pH	TL	Atividade	Proteína	AE	FP
				(U/mL)	(mg/L)	(U/mg)	
		Bruta		3,3	786	41,98	1
1	6000	8	3	6,01	122,33	49,15	11,71
2	6000	8	1	2,40	121,22	19,84	4,73
3	6000	6	3	18,72	222,10	84,29	20,08
4	6000	6	1	9,44	181,89	51,92	12,37
5	1500	8	3	9,52	73,77	129,03	30,73
6	1500	8	1	3,34	35,80	93,29	22,22
7	1500	6	3	1,44	214,87	6,68	1,59
8	1500	6	1	17,66	99,08	178,24	42,45
9	4000	7	2	3,63	53,08	68,29	16,27
10	4000	7	2	3,51	60,58	57,89	13,79
11	4000	7	2	3,50	69,92	50,06	11,92

TABELA 12. Resultados obtidos de partição da lipase de *Burkholderia cepacia* para cada condição do planejamento fatorial 2³ na fase inferior do SBA PEG/fosfato.

Análise	PEG	pH	TL	Atividade	Proteína	AE	FP
				(U/mL)	(mg/L)	(U/mg)	
		Bruta		3,3	786	41,98	1
1	6000	8	3	7,16	1031,89	6,94	1,65
2	6000	8	1	11,98	1411,56	8,49	2,02
3	6000	6	3	20,12	1415,23	14,22	3,39
4	6000	6	1	24,26	2718,23	8,92	2,13
5	1500	8	3	2,56	2134,34	1,20	0,29
6	1500	8	1	3,84	206,64	18,59	4,43
7	1500	6	3	0,02	625,25	0,03	0,01
8	1500	6	1	14,98	337,92	44,33	10,56
9	4000	7	2	18,67	2099,70	8,89	2,12
10	4000	7	2	19,47	1928,53	10,10	2,40
11	4000	7	2	19,84	2075,20	9,56	2,28

Ao analisar os resultados obtidos, pode-se notar que a purificação foi maior na fase superior do sistema, já que os valores de atividade específica e de fator de purificação

foram mais altos do que os encontrados na fase inferior. Em ambas as fases, o valor do fator de purificação foi maior quando usou menores massas moleculares de PEG, pH e linha de amarração.

Na Tabela 13 estão representados os valores do coeficiente de partição (K) da atividade lipolítica, proteína e atividade específica da lipase de *Burkholderia cepacia*. Os dados de atividade específica foram usados no planejamento fatorial 2^3 , pois ao comparar as respostas observadas com os valores previstos pelos modelos, observou-se que a linearização (ln) da atividade específica da lipase apresentou resultados estatísticos mais favoráveis e melhor qualidade do ajuste do modelo em relação às demais formas (Figuras 28, 29 e 30).

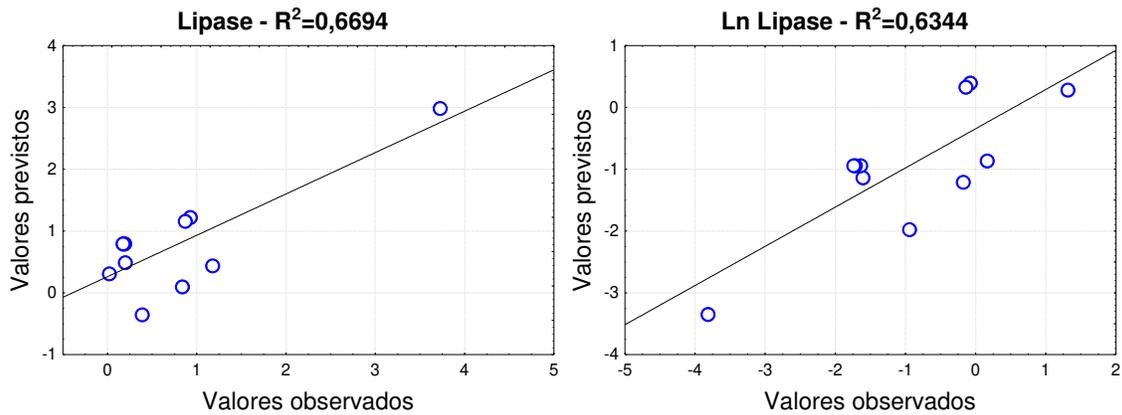


FIGURA 28. Correlação dos valores observados da lipase na forma normal e linearizada em relação aos valores previstos.

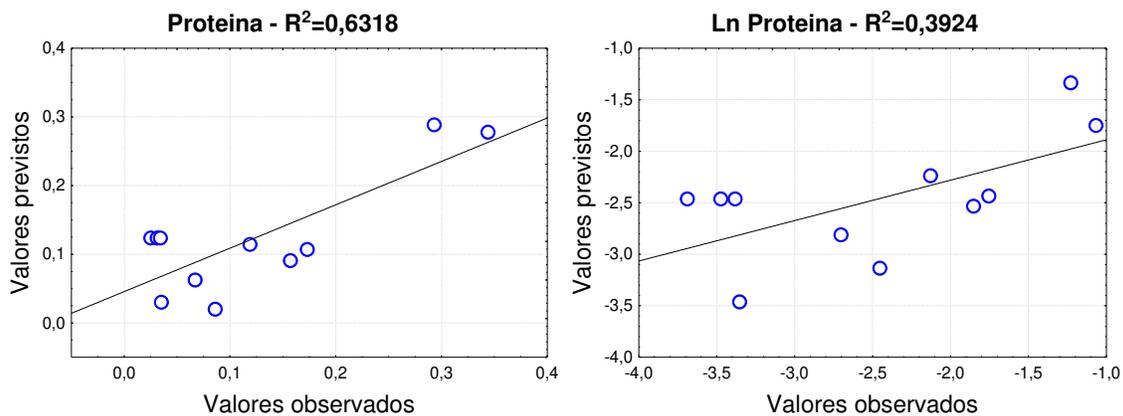


FIGURA 29. Correlação dos valores observados da proteína na forma normal e linearizada em relação aos valores previstos.

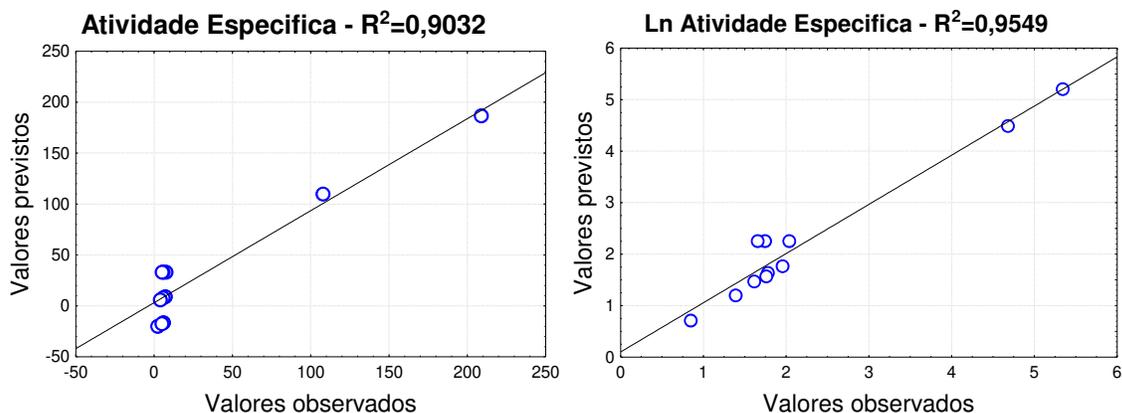


FIGURA 30. Correlação dos valores observados da atividade específica na forma normal e linearizada em relação aos valores previstos.

TABELA 13. Resultados de partição da lipase de *Burkholderia cepacia* por SBA PEG/fosfato.

Análise	MMPEG	Fatores		Coeficiente de Partição (K)		
		pH	Tie Line	Lipase	Proteína	AE
1	6000	8	3	0,839	0,119	7,079
2	6000	8	1	0,201	0,086	2,337
3	6000	6	3	0,930	0,157	5,928
4	6000	6	1	0,389	0,067	5,818
5	1500	8	3	3,725	0,035	107,781
6	1500	8	1	0,870	0,173	5,019
7	1500	6	3	0,022	0,344	208,959
8	1500	6	1	1,179	0,293	4,021
9	4000	7	2	0,194	0,025	7,680
10	4000	7	2	0,180	0,031	5,733
11	4000	7	2	0,176	0,034	5,236

Na Tabela 13 observa-se que maiores valores de coeficiente de partição da atividade específica da lipase de *Burkholderia cepacia* ocorreu com a diminuição da massa molecular do PEG, em pH 6 e 8 e maior tie-line.

Analisando-se a influência da massa molecular do PEG no coeficiente de partição, resultados semelhantes a este trabalho foram encontrados por HUDDLESTON e colaboradores (1991) ao estudarem o resultado o efeito da massa molecular do PEG no coeficiente de partição da *Saccharomyces cerevisiae* em SBA PEG/fosfato. Os autores observaram que houve uma preferência das proteínas pela fase superior do sistema em PEG

400 e 1000 Da, enquanto que para o PEG 3350 Da, a maioria das proteínas se concentraram na fase inferior do sistema.

Em relação aos diferentes pHs usados neste trabalho, os resultados não demonstraram alterações significativas ao variar os pHs do sistema. Em 1998, ALMEIDA e colaboradores também observaram pouca alteração no coeficiente de partição da cutinase ($pI=7,8$) ao variar o pH (4, 6, 8 e 9) do SBA PEG/Hidroxipropilamido. Os autores encontraram valores mais significativos de partição com o aumento do pH de 4 para 8, sendo que a pH 9, o coeficiente de partição da proteína foi menor. Isto pode ser explicado com base nas propriedades hidrofóbicas do PEG que pode se ligar aos resíduos hidrofóbicos da proteína. FORCINITI e colaboradores (1991) reportaram que as interações hidrofóbicas são maiores perto do ponto isoelétrico da proteína.

Neste trabalho, ao analisar os resultados da influência da tie-line no coeficiente de partição da lipase de *Burkholderia cepacia* notou-se que houve uma tendência ao aumento do coeficiente de partição com o aumento do comprimento da tie-line. Esses resultados corroboram com SARMENTO e colaboradores (1994) ao purificar o citocromo b5 em sistemas PEG/sais e RITO-PALOMARES e HERNANDEZ (1998) ao purificar as proteínas do soro do queijo em SBA PEG/fosfato.

As influências da massa molecular do polímero, pH e comprimento da tie-line sobre o coeficiente de partição da atividade específica da lipase de *Burkholdeira cepacia* foram verificadas através da análise de variância (ANOVA) (Tabela 14). Com esses dados pode-se obter a significância da regressão e da falta de ajuste com 95% de confiança ($p \leq 0,05$), utilizando o teste F para o planejamento estudado. A análise de variância (ANOVA) mostrou que o modelo ajustado para a atividade específica da lipase foi significativo, satisfazendo o critério sugerido por BARROS NETO e colaboradores (1995), visto que a razão MQ_R/MQ_r ($F_{calculado}$) foi maior que o valor tabelado de $F_{0,95;6,4}$ (6,16) e a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} foi menor do que o valor de $F_{0,95;2,2}$ (19,00). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9549, indicando que o modelo explicou aproximadamente 96% da variação dos dados observados.

TABELA 14. Resultados da ANOVA para a variável coeficiente de partição (K) da atividade específica da lipase de *Burkholderia cepacia*.

<i>Coefficiente de partição da lipase de Burkholderia cepacia</i>						
Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	Fcalculado	Ftabelado	R ²
Regressão	18,88	6	3,15	14,32	6,16	95,49
Resíduo	0,89	4	0,22	-	-	
Falta de ajuste	0,81	2	0,41	10,25	19,00	
Erro Puro	0,080	2	0,04	-	-	
Total	19,77	10	-	-	-	

O Diagrama de Pareto (Figura 31) apresentou os principais efeitos e interações significativas no coeficiente de partição da atividade específica da lipase. Foram considerados significativos os termos cujos valores de *t*calculado (representado pelas barras no gráfico de Pareto) apresentam-se superiores ao valor de *t*tabelado (4,30) (representado pela linha tracejada do gráfico), para distribuição de Student, a 95% de confiança. Analisando o Diagrama de Pareto os fatores massa molecular do polímero e comprimento da tie-line (TL), bem como a interação entre eles são estatisticamente significativos. Enquanto que o pH, bem como a interação pH e massa molecular do polímero e pH e comprimento da tie-line não foram fatores significativos.

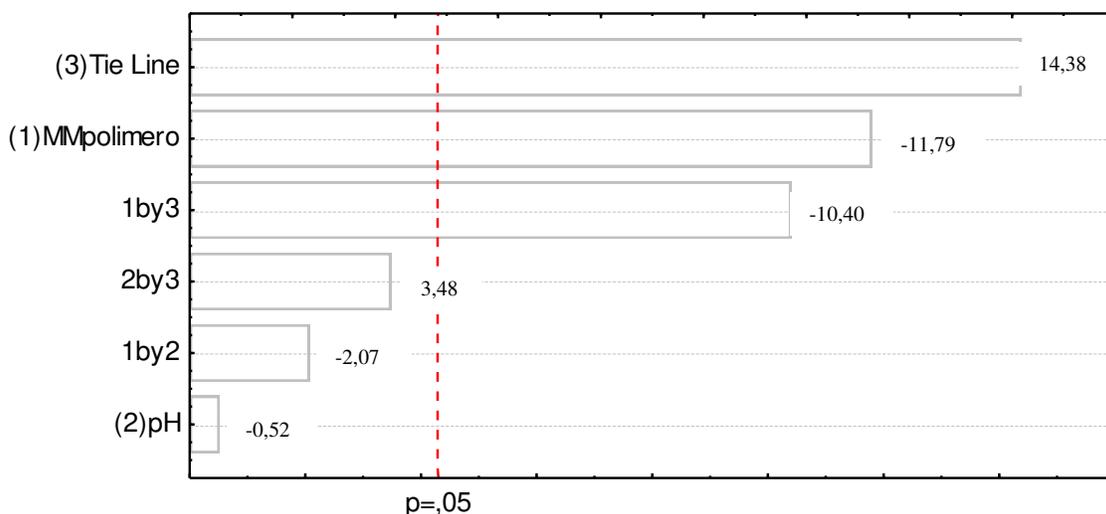


FIGURA 31. Estimativa dos efeitos através do gráfico de Pareto - variável resposta do coeficiente de partição (K) da atividade específica da lipase de *Burkholderia cepacia*.

Os modelos codificados propostos para representar o coeficiente de partição da lipase (K) para as condições de processo massa molecular do polímero e pH, massa molecular do polímero e tie-line (TL) e tie-line (TL) e pH são apresentados nas Equações 11, 12 e 13, respectivamente.

$$KAE_{lipase} = 2,25 - 0,83 * MM_{polímero} - 0,37 * pH - 0,15 + MM_{polímero} * pH \quad \text{Equação 12}$$

$$KAE_{lipase} = 2,25 - 0,83 * MM_{polímero} + 1,02 * TL - 0,73 * MM_{polímero} * TL \quad \text{Equação 13}$$

$$KAE_{lipase} = 2,25 - 0,04 * TL + 1,02 * pH + 0,25 * TL * pH \quad \text{Equação 14}$$

As Figuras 32, 33 e 34 apresentam as superfícies de resposta e curvas de nível para a partição da atividade específica da lipase de *Burkholderia cepacia* nas diferentes condições de processo. Conforme mostra a Figura 32, maiores valores de atividade específica podem ser obtidos usando a menor massa molecular do polímero e aumentando o pH do sistema. Na Figura 33 é possível observar que se a massa molecular do polímero for fixada em seus menores valores (1500 Da) e a linha de amarração for elevada ao seu valor máximo (tie-line 3), pouco se perderá de atividade enzimática. No entanto, analisando a Figura 34 em relação à linha de amarração e ao pH do sistema, nota-se que haverá redução na atividade específica se a linha de amarração estiver no seu menor valor (tie-line 1) e o pH for variado do seu máximo (pH 8).

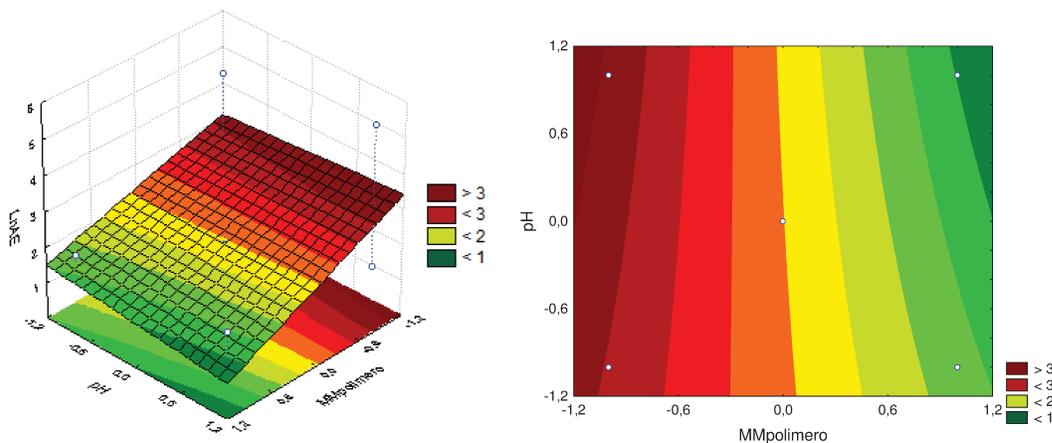


FIGURA 32. Avaliação RSM das influências da massa molecular do polímero e do pH sobre a atividade específica da lipase de *Burkholderia cepacia*.

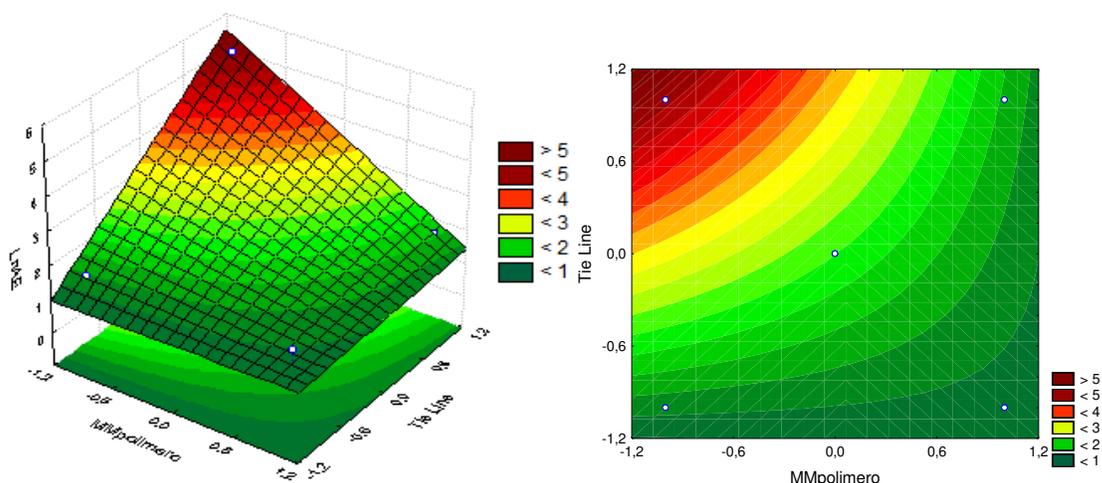


FIGURA 33. Avaliação RSM das influências da massa molecular do polímero e da tie-line sobre a atividade específica da lipase de *Burkholderia cepacia*.

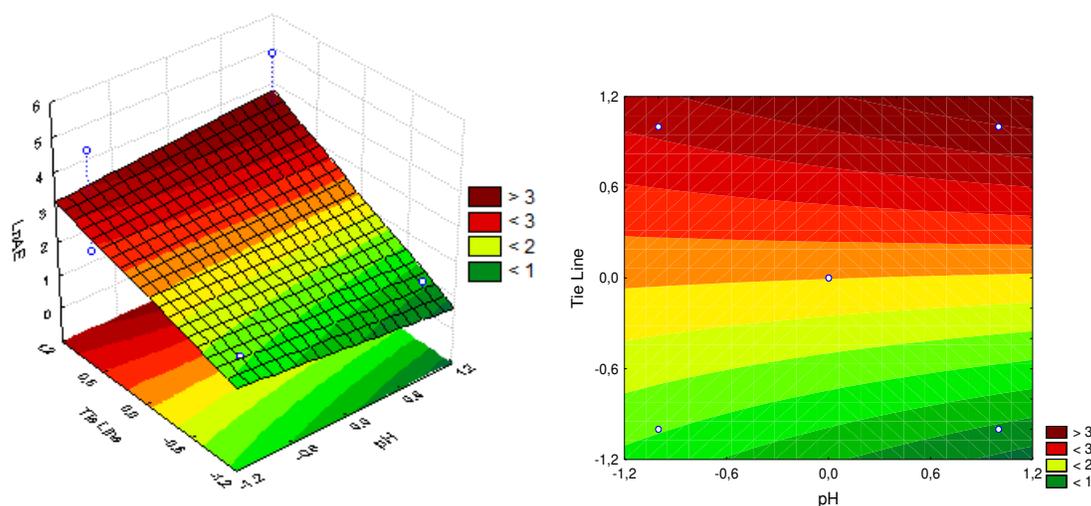


FIGURA 34. Avaliação RSM das influências da tie-line e pH do sistema sobre a atividade específica da lipase de *Burkholderia cepacia*.

4.2.4 Eletroforese SDS-PAGE e de focalização isoelétrica (IEF)

As frações protéicas obtidas do material purificado por SBA PEG1500/fosfato a pH 6 e do extrato bruto enzimático foram analisadas por eletroforese via SDS-PAGE que revelou uma banda de proteína com massa molecular aproximada em 33 kDa, conforme a Figura 35. Comparando-se os valores encontrados com os resultados da literatura, LIN e colaboradores (1996) obtiveram 32 kDa para lipase purificada de *Pseudomonas*

pseudoalcaligenes F-111. Esse resultado corrobora com BARON (2008), que após a purificação da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 em coluna de interação hidrofóbica Octyl Sepharose CL-4B encontrou também a massa molecular de 32 kDa. Resultados semelhantes foram obtidos por KORDEL e colaboradores (1991), onde a massa molecular obtida para a lipase de *Pseudomonas sp* foi de 35 kDa. E LIMA e colaboradores (2004) encontraram 40 kDa para a lipase de *Bacillus megaterium*. Os valores das massas moleculares da lipase de diferentes fontes encontram-se normalmente entre 19 e 65 kDa (Bandmann et al., 2000), mas podem variar de 8 kDa a 180 kDa (Oh, et al., 1999). Neste trabalho, o valor de massa molecular demonstra que a técnica do SBA PEG/fosfato para purificação das lipases de *Burkholderia cepacia* foi eficiente, ao comparar a maior pureza da lipase purificada por SBA PEG/fosfato (banda 1) com a lipase comercial obtida da mesma fonte bacteriana (banda 2).

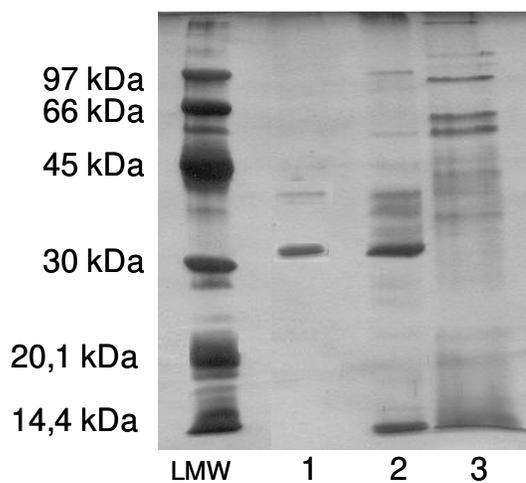


FIGURA 35. Eletroforese SDS-PAGE em gel de 12,5%, amostra em condições desnaturantes e redutoras. (LMW) marcador de baixa massa molecular; (1) amostra de lipase purificada em sistema bifásico aquoso PEG/fosfato; (2) lipase comercial de *Burkholderia cepacia*; (3) extrato enzimático bruto.

A Figura 36 mostra a eletroforese de focalização isoelétrica (*Isoelectric Focusing* - IEF) da lipase purificada em SBA. O IEF revelado com nitrato de prata mostrou um pI de 6,0. KORDEL e colaboradores (1991) encontram um pI de 4,5 a 4,6 para a lipase de *Pseudomonas sp*, pI de 7,3 foi encontrado por LIN e colaboradores (1996) para a lipase de

Pseudomonas pseudoalcaligenes F-111, resultados de pI para a lipase de *Burkholderia cepacia* não foram encontradas na literatura até o momento.

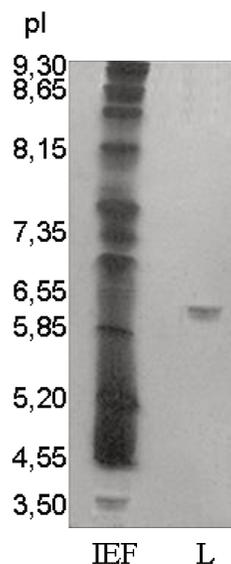


FIGURA 36. Eletroforese de focalização isoelétrica em pHs de 3 a 9. (IEF): marcador de ponto isoelétrico; (L): amostra de lipase purificada em sistema bifásico aquoso PEG/fosfato.

4.3 Encapsulamento da lipase de *Burkholderia cepacia*

4.3.1 Estabilidade da lipase antes e após o processo de gelificação iônica

Um estudo para verificar a estabilidade da lipase imobilizada em relação ao extrato bruto foi feito nesse trabalho. A medida inicial de atividade do extrato bruto e da lipase imobilizada seca (em todas as condições de processo) foi de 2,46 U/mL e 1,23 U/mL, respectivamente. Através desse resultado, notou-se que não houve perda de atividade após o processo de gelificação iônica (Figura 37). O extrato bruto foi misturado à solução de alginato, nas diferentes concentrações de CaCl_2 , na proporção 1:1.

Durante 28 dias foram feitas análises de atividade e verificou-se, em todas as condições de processo, que a enzima encapsulada manteve maior atividade. Após 14 dias de encapsulamento, a lipase manteve sua atividade 40% maior em relação ao extrato bruto. Após esse período observou-se queda mais significativa da atividade, embora no 28º dia, as microcápsulas ainda mantiveram sua atividade maior em 10% em relação à enzima livre.

Esses resultados mostraram que a técnica de encapsulamento por gelificação iônica foi eficiente para imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia*, e com alguns ajustes no processo talvez seja possível manter a lipase imobilizada ativa por mais tempo. E neste caso, como a atividade inicial da lipase não foi perdida no processo de gelificação, assim como no processo de secagem, pode-se indicar eficiência de encapsulação (E.E.) de 100%. A estabilidade e aumento da atividade da lipase encapsulada também podem ser atribuídos aos íons Ca^{2+} presentes no processo de gelificação. PADILHA e colaboradores (2010), ao avaliar o efeito de diferentes íons na atividade da lipase de *Pseudomonas cepacia*, verificaram que com íons cálcio foi possível manter uma boa atividade enzimática durante os 30 dias de análise. Os autores observaram queda mais significativa da atividade a partir do 15º dia de incubação. Esses resultados corroboram com a Figura 37.

STAMATIS e XANAKIS (1999) imobilizaram a lipase de *Pseudomonas cepacia* em géis de gelatina, agarose e k-carragenanas. A lipase manteve sua atividade catalítica quando confinada em sistemas organo-gel de microemulsão, na esterificação do ácido láurico com propanol. Neste estudo, foram obtidos rendimentos elevados para o laurato de propila (80%) com o organo-gel de agarose e k-carragenana. Os sistemas puderam ser reutilizados por cinco vezes e a atividade foi dependente do biopolímero utilizado na formação do organo-gel. CHECHINEL e colaboradores (2009) avaliaram a estabilidade da Lipozyme TL imobilizada em gel de gelatina para síntese de ésteres em meio orgânico. O sistema enzima-suporte obtido foi aplicado na esterificação do ácido octanóico pelo *n*-butanol, utilizando *n*hexano como solvente externo. O tempo de reação foi fixado em 48 horas, bem como a massa de catalisador mantida em 7 gramas. Essa lipase imobilizada foi utilizada como catalisador em 12 ciclos consecutivos, com o objetivo de avaliar a sua estabilidade frente ao número de reutilizações. Com os resultados obtidos, os autores mostraram que após esses ciclos, a enzima manteve boa estabilidade, apresentando queda na sua atividade catalítica menor que 10%.

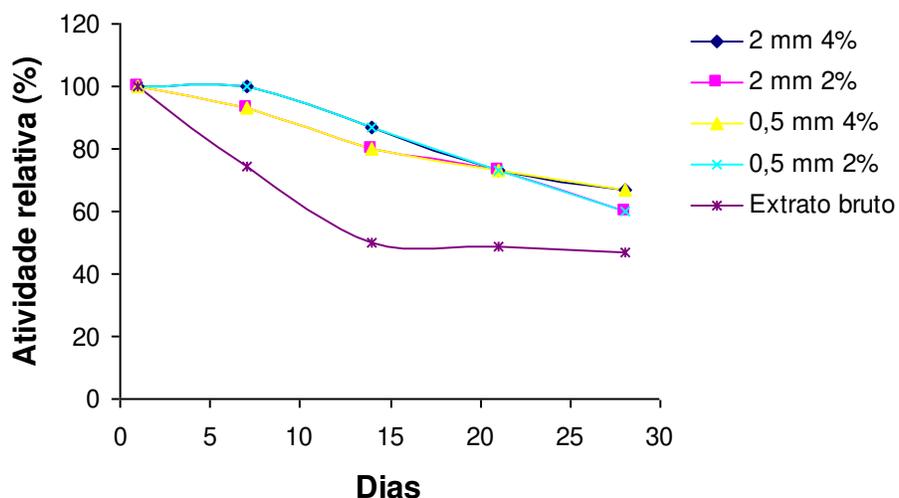


FIGURA 37. Estabilidade da lipase imobilizada em comparação ao extrato bruto durante 28 dias.

4.3.3 Morfologia e microestrutura

As microcápsulas apresentaram formas esféricas com variações de tamanho. A morfologia das microcápsulas hidratadas, incluindo o seu tamanho e sua distribuição contendo a lipase imobilizada, foi facilmente observada através de microscopia óptica. As Figuras 38 e 39 ilustram as micrografias nas diferentes concentrações de CaCl_2 com bico atomizador de 2 e de 0,5 mm, respectivamente.

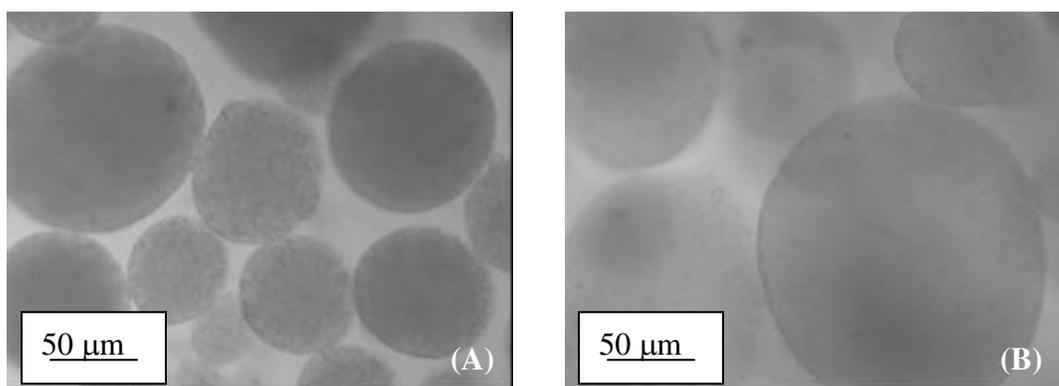


FIGURA 38. Imagem obtida por microscopia óptica das microcápsulas de alginato produzidas por atomização com bico de 2 mm (A) 2% de CaCl_2 (B) 4% de CaCl_2 .

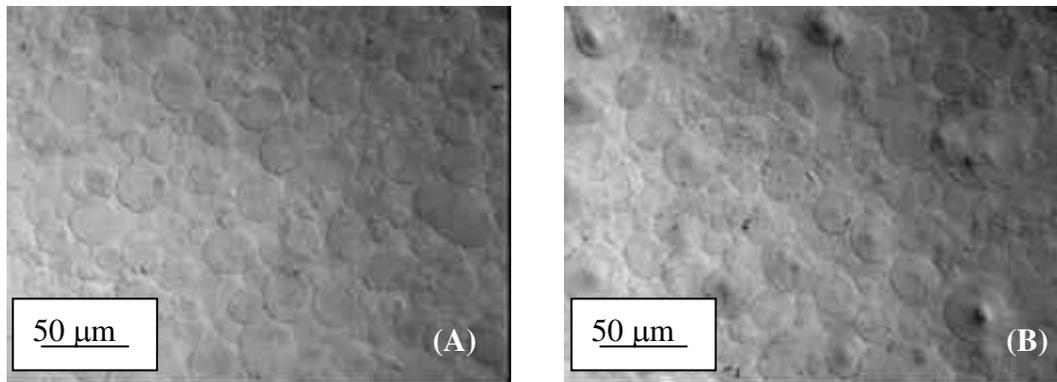


FIGURA 39. Imagem obtida por microscopia óptica das microcápsulas de alginato produzidas por atomização com bico de 0,5 mm (A) 2% de CaCl_2 (B) 4% de CaCl_2 .

Ao observar as figuras acima pode-se notar a formação das microcápsulas que contém a lipase imobilizada. A parte mais clara das figuras é referente ao meio em que as microcápsulas foram mantidas, isto pode ser melhor visualizado na Figura 35, pois devido à formação de maiores microcápsulas, é possível visualizar um espaçamento entre elas. Como essas análises ocorreram com as microcápsulas hidratadas, foi feita uma medida de atividade da água de conservação das microcápsulas a fim de verificar se havia atividade lipolítica, o qual não foi constatado.

A observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a morfologia das microcápsulas secas e os resultados de distribuição de tamanho das microcápsulas hidratadas das amostras produzidas com bico atomizador de 2 e 0,5 mm são apresentados nas Figuras 40 e 41, respectivamente.

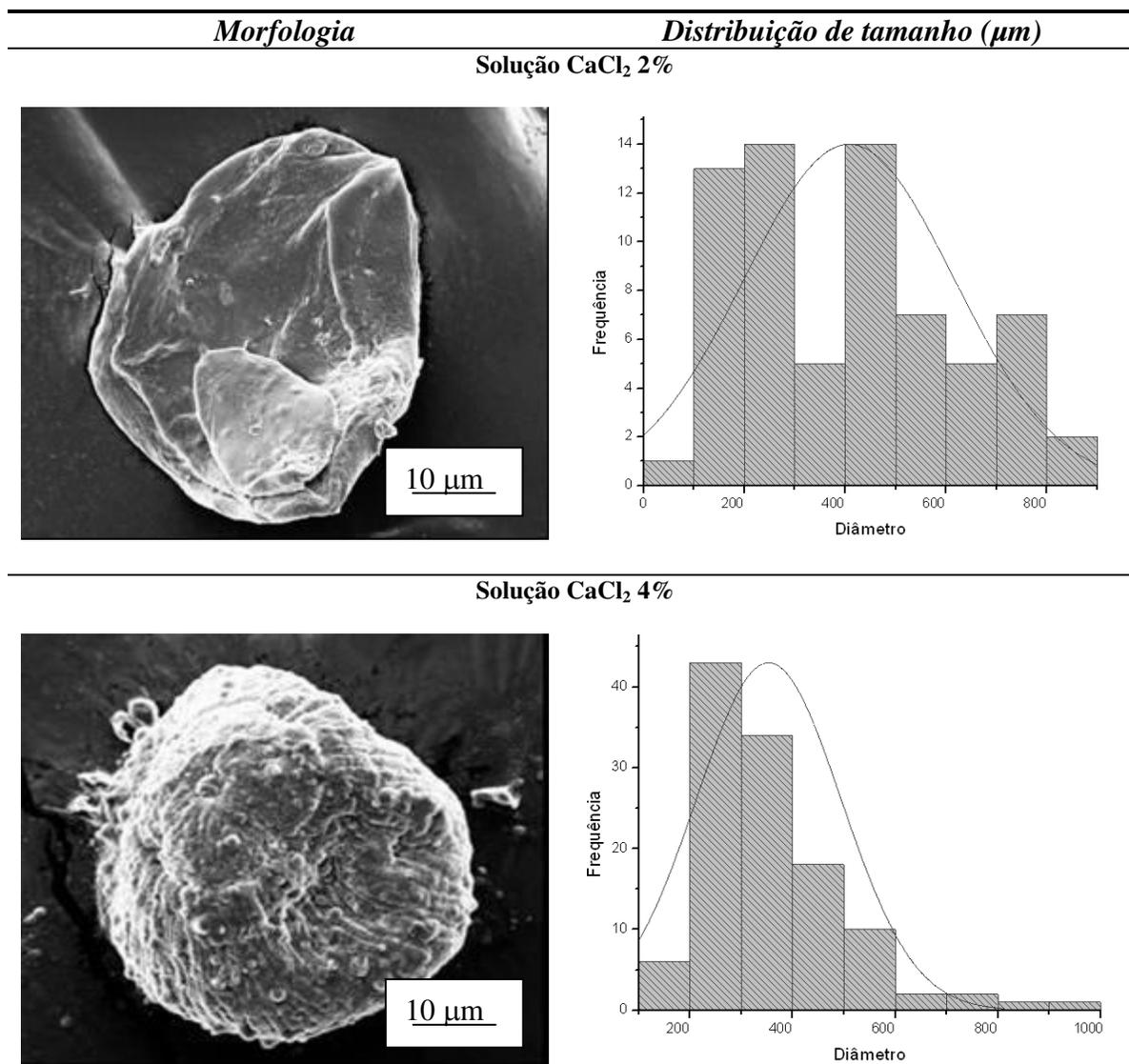


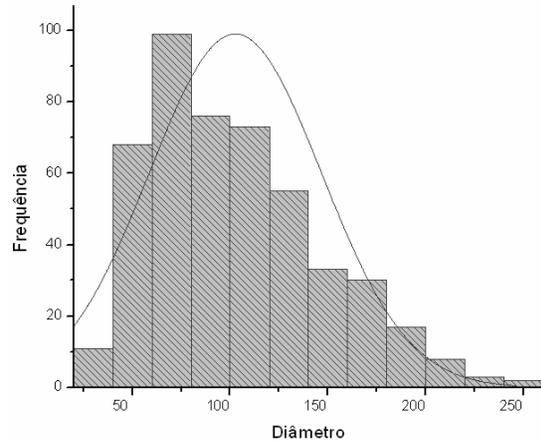
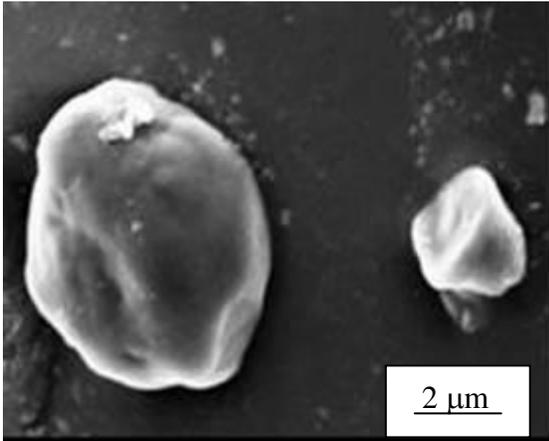
FIGURA 40. Aspecto morfológico das microcápsulas secas e distribuição de tamanho das microcápsulas hidratadas com bico atomizador de 2 mm.

Por MEV foi possível notar que as microcápsulas continuaram esféricas mesmo após a secagem em estufa. As microcápsulas produzidas com bico atomizador de 0,5 mm mostraram-se mais lisas e homogêneas quando comparadas com as produzidas com bicos de 2 mm. Esse fato pode ser atribuído ao próprio tamanho da microcápsula formada. Segundo ROSENBERG e colaboradores (1993), a estrutura das microcápsulas pode estar relacionada à capacidade de proteção apresentada pelo uso dos biopolímeros, em que as indicações dessa capacidade são fornecidas pelo grau de integridade e porosidade das microcápsulas.

Morfologia

Distribuição de tamanho (μm)

Solução CaCl_2 2%



Solução CaCl_2 4%

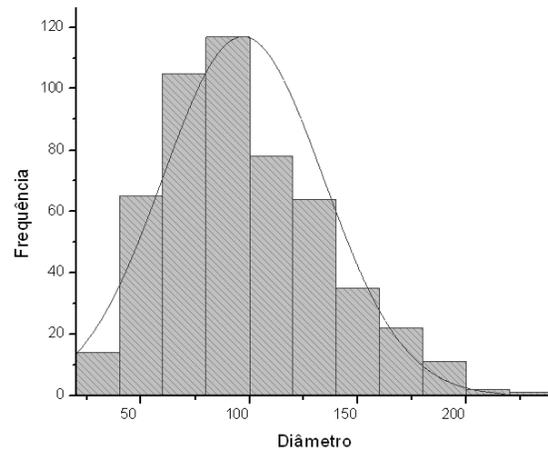
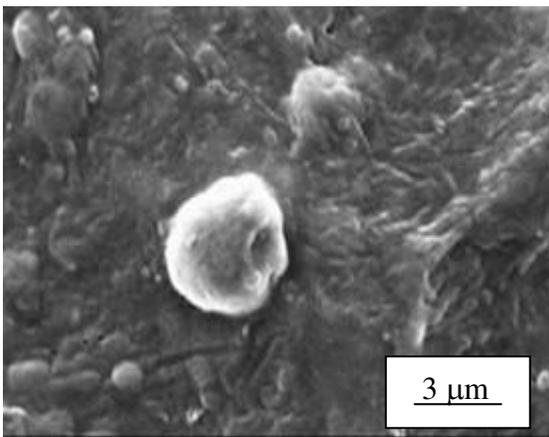


FIGURA 41. Aspecto morfológico das microcápsulas secas e distribuição de tamanho das microcápsulas hidratadas com bico atomizador de 0,5 mm.

Ao comparar as análises por MEV e por microscopia óptica, foi possível notar a alteração de tamanho das microcápsulas secas para as microcápsulas hidratadas. Essa observação pode ser justificada pela elevada quantidade de água que essas matrizes apresentavam quando úmidas. Para o bico atomizador de 2 mm nas concentrações de 2% e 4% (m/v) de CaCl_2 , a microcápsula seca analisada por MEV apresentou um tamanho de 139 e 150 μm , respectivamente, contra a média de 400 μm das hidratadas, embora ao analisar as imagens obtidas por microscopia óptica, na concentração de 2% houve maior

distribuição do diâmetro das microcápsulas quando comparado à concentração de 4% de CaCl₂.

Para os bicos atomizadores de 0,5 mm, o diâmetro médio das micropartículas hidratadas foi mais uniforme e unimodal nas diferentes concentrações de CaCl₂. Analisando por MEV notou-se uma redução mais significativa das microcápsulas secas para o bico atomizador de 0,5 mm nas concentrações de 2 e 4% (m/v) de CaCl₂, que apresentaram tamanhos de 15 e 6 µm, respectivamente. Neste caso, as microcápsulas secas reduziram aproximadamente 85% em relação às hidratadas.

A média de tamanho de 300 microcápsulas hidratadas obtidas por microscopia óptica foi de 400 e 100 µm para os bicos de 2 e 0,5 mm, respectivamente. Neste caso, a solução de CaCl₂ em diferentes concentrações não alterou o tamanho das esferas formadas, assim como a atividade da lipase após o encapsulamento nas diferentes condições de processo (Tabela 15), esses resultados corroboram com WON e colaboradores (2005) ao fazer um estudo de diferentes concentrações de CaCl₂ no encapsulamento da lipase de *Candida rugosa*.

TABELA 15. Medida de atividade e tamanho das esferas da lipase imobilizada em todas as condições de processo.

<i>Ensaio</i>	<i>x₁</i>	<i>x₂</i>	<i>Bico (mm)</i>	<i>Solução CaCl₂</i> <i>(%)</i>	<i>Atividade</i> <i>(U/mL)</i>	<i>Tamanho das</i> <i>esferas (µm)</i>
1	-1	-1	0,5	2	1,23	100
2	1	-1	2,0	2	1,23	400
3	-1	1	0,5	4	1,23	100
4	1	1	2,0	4	1,23	400

Segundo MUKAI-CORRÊA e colaboradores (2004), o tamanho da partícula pode ser manipulado pela variação do tamanho do orifício do bico atomizador, pela taxa de fluxo de ar e de solução a ser pulverizada, e pela relação entre os mesmos. A viscosidade da solução também pode ter ligação direta e pode estar associada ao tipo de emulsão formada na produção das microcápsulas gelificadas.

Embora, na literatura não tenham sido encontrados trabalhos acerca da imobilização da lipase produzida a partir da cepa de *Burkholderia cepacia*, utilizando o alginato como material de parede, alguns trabalhos utilizando a lipase comercial foram

destacados. WON e colaboradores (2005) otimizaram o encapsulamento da lipase comercial de *Candida rugosa* por gelificação iônica usando alginato e CaCl_2 . Os autores investigaram os efeitos da concentração de alginato e de CaCl_2 , percentagem total da enzima imobilizada e rendimento de imobilização (relação entre a atividade da enzima imobilizada e a enzima livre). Com o aumento da concentração de alginato de 1 para 2%, aumentou a quantidade de enzima encapsulada, mas houve diminuição do rendimento da imobilização. No entanto, quando a concentração de CaCl_2 foi aumentada de 50 para 300M a quantidade de enzima encapsulada não foi alterada. Para evitar o vazamento das lipases de dentro das micropartículas, os grânulos gelificados foram revestidos com quitosana e silicato. Os autores observaram que as microcápsulas revestidas apresentaram maior reutilização e maior atividade lipolítica. Em outro trabalho, MONDAL e colaboradores (2006), pelo método de adsorção simples, fizeram um bioconjugado da lipase de *Pseudomonas cepacia* com o alginato. Pelas imagens de microscopia de força atômica (AFM), os autores mostraram que o bioconjugado resultou em adsorção ao invés de aprisionamento da enzima, devido às moléculas da enzima ficarem visíveis na superfície do gel. Através dessa técnica, houve um aumento na efetividade de imobilização e aumento de 25 vezes o valor de V_{max}/K_m após a imobilização. O bioconjugado também mostrou-se mais estável a 55°C, em comparação com a enzima livre, podendo ser reutilizado para a hidrólise de óleo até 4 ciclos sem perda significativa de atividade.

Em trabalhos anteriores, SHARMA e GUPTA (2001) mostraram que lipases obtidas de germen de trigo, pâncreas suíno ou de microorganismos ao se ligarem ao alginato podem dispensar métodos de purificação. Neste caso, as lipases seletivamente captadas por alginato (a partir de um extrato bruto) podem ser eluídas por causa das fracas ligações, assim, o alginato estaria removendo seletivamente a enzima do extrato bruto.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que a lipase de *Burkholderia cepacia* pode ser imobilizada em alginato sem perda da atividade e talvez com maior concentração de enzima. Como o alginato é um polímero atóxico, a mistura lipase-alginato pode ser usada como um biocatalisador em diversos segmentos industriais, principalmente no processamento de alimentos, que é um dos setores que mais utilizam essas enzimas.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

As conclusões desse trabalho para a caracterização enzimática, purificação e encapsulamento de uma lipase de *Burkholderia cepacia* foram as seguintes:

1ª parte: Caracterização da enzima:

- Na etapa de caracterização da lipase, foi possível determinar parâmetros importantes para se obter bons rendimentos da lipase de *Burkholderia cepacia*. O processo de caracterização foi de extrema importância na etapa de purificação da lipase, a fim de evitar a perda de atividade pelo uso de condições que pudessem favorecer sua inativação;
- Os resultados do extrato bruto enzimático apresentaram condições ótimas de atividade à temperatura de 37°C. A energia de ativação da lipase de *Burkholderia cepacia* foi de 10,1 KJ/mol;
- Numa faixa de pH entre 3 a 11, utilizando diferentes tampões, obteve-se 8 como pH ótimo. A estabilidade da atividade enzimática do extrato bruto em diferentes tampões e pHs 5, 8, e 11 mostrou ser bastante estável;
- Quanto à influência dos íons na atividade da lipase observou-se uma ativação desta na presença do íon I^{-} , os íons Mn^{2+} , Co^{2+} e Ca^{2+} mantiveram a atividade, enquanto o Fe^{2+} , Hg^{2+} e Al^{3+} atuaram como inibidores, prejudicando a atividade catalítica da lipase;
- No estudo da estabilidade na presença de diferentes íons conclui-se que atividade enzimática foi mantida nos 30 dias de armazenagem quando o extrato bruto foi incubado junto aos íons Ba^{2+} , I^{-} , Ca^{2+} e Mn^{2+} , onde a enzima manteve 100% ou mais de atividade enzimática. Enquanto que íons Fe^{2+} e Hg^{2+} inativaram a enzima em menos de 10 dias;
- No estudo da medida de volume de NaOH gasto na titulação mostrou que é possível trabalhar com tempos menores que 30 minutos. A partir de 10 minutos até 30 minutos de incubação, a variação da quantidade de NaOH gasta na titulação foi muito pequena;

- Ao ajustar os dados experimentais ao modelo linearizado da equação de LINEWEAVER-BURK, determinou-se os valores de K_m 43,90 mg/mL e de $V_{máx}$ 0,0258 U/mg.

2ª parte: Purificação da enzima por SBA:

- Para a caracterização dos sistemas bifásicos formados por PEG/fosfato foi necessário determinação do diagrama de fases em diferentes pHs e massa molecular do polímero;
- Na caracterização dos sistemas bifásicos aquosos, em relação à massa molecular do polímero e manter fixo o pH do sistema, pode-se concluir que menores concentrações de soluções são necessárias para a formação de fases com PEG de maior massa molecular;
- Ainda na etapa de caracterização dos SBAs, em relação ao pH ao fixar a massa molecular do polímero, conclui-se que em menores valores de pH uma maior concentração dos componentes foi usada para a formação do SBA;
- Foi observado que não houve um deslocamento significativo da binodal em relação aos diferentes pHs estudados, assim como pouca influência nas composições das linhas de amarração;
- No planejamento fatorial 2^3 avaliou-se a influência da massa molecular do PEG, da linha de amarração e do pH sobre a partição da lipase de *Burkholderia cepacia* no sistema PEG/fosfato. Através dos resultados, conclui-se que os modelos apresentaram boa significância estatística, com boas porcentagens de variação explicáveis e bons coeficientes de correlação;
- Como a atividade enzimática específica é um indicador do grau de pureza da enzima no material protéico, esta foi usada no planejamento fatorial. O modelo que teve como resposta lnAE foi o que teve um ajuste mais significativo estatisticamente e foi o que demonstrou melhor a purificação que as demais formas de lnATIV e lnPROT;
- Os resultados do planejamento fatorial 2^3 mostraram que maiores valores de atividade específica podem ser obtidos usando PEG 1500 Da no pH 8. Em relação à massa molecular de PEG e comprimento da linha de amarração (TL), pouco se

perderá de atividade enzimática se usar o PEG 1500 Da e maior TL. No entanto, em relação à TL e ao pH do sistema, nota-se que haverá redução na atividade específica se a linha de amarração estiver no seu menor valor (TL 1) no pH 6;

- Analisando-se ainda a purificação da enzima, podemos concluir que esta foi melhor nos sistemas de pHs 6 e 8. Isto se deve ao fato de que esses dois pHs são próximos do ponto isoelétrico e do pH ótimo da lipase de *Burkholderia cepacia*;
- Para complementar os estudos de caracterização da lipase de *Burkholderia cepacia* foram feitas análises eletroforéticas SDS-PAGE e de ponto isoelétrico das enzimas purificadas. Os resultados encontrados foram massa molecular de 33 kDa e pI 6,0;
- Ao comparar, por eletroforese, a amostra purificada por SBA PEG/fosfato da lipase comercial, concluiu-se a eficiência do método de purificação devido a evidência da banda correspondente às lipases verificadas por outros autores.

3ª parte: Encapsulamento da enzima por gelificação iônica:

- As microcápsulas foram produzidas por gelificação iônica usando alginato de sódio e cloreto de cálcio. O recheio foi o extrato bruto da lipase de *Burkholderia cepacia*;
- Foi feito um planejamento fatorial 2^2 variando o tamanho do bico atomizador (2 e 0,5 mm), e a concentração de CaCl_2 (2 e 4%). Os resultados mostraram que não houve perda de atividade em todas as condições de processo após o encapsulamento por gelificação iônica;
- Ao imobilizar a enzima, foi feito um estudo de estabilidade durante 28 dias onde foi possível verificar, em todas as condições de processo, que a enzima encapsulada manteve maior estabilidade em relação ao extrato bruto;
- Ao analisar as microcápsulas hidratadas por microscopia óptica, estas apresentaram formas esféricas com variações de tamanho. A média do tamanho de 300 microcápsulas foi de 400 e 100 μm para os bicos de 2 e 0,5 mm, respectivamente. Neste caso, a solução de CaCl_2 em diferentes concentrações não alterou o tamanho das microcápsulas formadas;
- Para as análises por MEV, as microcápsulas foram secas em estufa e mantiveram as formas esféricas mesmo após este processo;

- Ao comparar as análises por MEV e por microscopia óptica, foi possível notar a alteração de tamanho das microcápsulas secas para as microcápsulas hidratadas. Usando o bico atomizador de 2 mm nas concentrações de 2% e 4% de CaCl_2 , a microcápsula seca apresentou um tamanho de 139 e 150 μm , respectivamente, contra a média de 400 μm das hidratadas. Para o bico atomizador de 0,5 mm nas concentrações de 2% e 4% de CaCl_2 , as microcápsulas apresentaram tamanhos de 15 e 6 μm , respectivamente. Neste caso, as microcápsulas secas reduziram aproximadamente 85% em relação às hidratadas.
- O método de gelificação iônica mostrou-se eficiente para encapsular as lipases de *Burkholderia cepacia* devido à enzima apresentar maior eficiência enzimática quando comparada à forma livre.

Os resultados apresentados nesse trabalho são originais nos aspectos da proposta da caracterização completa da lipase de *Burkholderia cepacia* que mostrou ser ativa e estável em diferentes condições de processamento. Essas análises abrem novas perspectivas de trabalho para a utilização dessa enzima em reações de interesse que envolva a biocatálise, dentre elas encontra-se a síntese de ésteres na conversão de biodiesel que é uma alternativa aos combustíveis derivados de petróleo.

Na etapa de purificação foi usado SBA PEG/fosfato. A lipase de *Burkholderia cepacia* purificada aumentou a atividade enzimática, muito desejada por diversos segmentos industriais e laboratoriais que utilizam essas enzimas. Isto porque ao utilizar enzimas no estado impuro, a presença de outras enzimas interfere nos substratos desviando as reações específicas. Além disso, a purificação por esse sistema não onera os custos do processo pelo baixo custo dos reagentes utilizados, viabilizando a produção e comercialização dessas enzimas.

E finalmente, na proposta de encapsular a lipase de *Burkholderia cepacia* por um método comumente empregado no encapsulamento de ingredientes para a indústria alimentícia. O encapsulamento da lipase por gelificação iônica apresentou vantagens devido à maior atividade enzimática quando comparada à enzima livre e ao custo, já que o método utilizado foi bastante simples e com reagentes convencionais. A lipase encapsulada, além da estabilidade superior em relação à enzima livre, permite a sua reutilização em meio

orgânico, facilita sua recuperação possibilitando o desenvolvimento de processos tecnológicos de conversão contínuos.

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os trabalhos desenvolvidos nesta Tese não encerram as possibilidades adicionais sobre o tema estudado. A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, sugere-se para trabalhos futuros:

1. Estudar a recuperação da lipase *Burkholderia cepacia* em outros sistemas bifásicos a fim de definir qual é o melhor sistema a ser utilizado na recuperação dessas enzimas;
2. Aplicar o método de purificação utilizado neste trabalho na purificação de outras enzimas que estejam dentro da faixa de pH estudado;
3. Comparação do estudo de caracterização enzimática da lipase encapsulada com a lipase livre;
4. Encapsular por gelificação iônica a lipase purificada por SBA PEG/fosfato;
5. Encapsular a lipase de *Burkholderia cepacia* testando outros materiais de parede;
6. Estudar a capacidade de síntese da lipase encapsulada de *Burkholderia cepacia* para a produção do biodiesel;
7. Fazer um estudo comparativo ao aplicar as lipases encapsuladas de *Burkholderia cepacia* na produção de biodiesel usando óleos vegetais e óleos residuais;
8. Aplicação da lipase livre e encapsulada de *Burkholderia cepacia* em reações de interesse.

CAPITULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFTABROUCHAD, C., DOELKER, E. Preparation methods for biodegradable microparticles loaded with water-soluble drugs. *STP Pharma Science*, v. 2, p. 365-380, 1992.

AGUILAR, G., MORLON-GUYOT, J., TREJO-AGUILAR, B., GUYOT, J.P. Purification and characterization of and extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme Microbiology Technology*, v 27, p. 406–413, 2000.

ALBERTSSON, P.A. *Partition of cell particles and macromolecules*. New York: Ed. John Wiley & Sons, 1986.

ALLOUE, W.A.M., DESTAIN, J., EL MEDJOUB, T., GHALFI, H., KABRAN, P., THONART, P. Comparison of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilization yield of entrapment, adsorption, and covalent bond techniques. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 150, n.1, p. 51-63, 2008.

ALMEIDA, M.C., VENÂNCIO, A., TEIXEIRA, J.A., AIRES-BARROS, M.R. Aqueous two-phase separation. In: ANSENJO, J.A. *Separation Processes in Biotechnology*. New York: Ed Marcel Dekker, 1998.

ALMEIDA, V.V., BONAFÉ, E.G., STEVANATO, F.B., SOUZA, N.E., VISENTAINER, J.E., MATSUSHITA, M., VISENTAINER, J.V. Catalisando a hidrólise de uréia em urina. *Química Nova na Escola*, n.28, p. 42-46, 2008.

ALVIM, I.B. Produção e caracterização de micropartículas obtidas porspray drying e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes (2005). Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2005.

BADR, M.K., CABEZAS, H. A thermodynamic model for the phase behavior of salt-polymer aqueous two-phase system. *Fluid Phase Equilibria*, v. 155, n. 17, p. 39-58, 1996.

BAMBERGER, S., BROOKS, E.D., SHARP, K.A., VAN ALSTINE, J.M., WEBBER, T.J. Preparation of phase systems and measurement of their physicochemical properties. In: *Partition in aqueous-phase systems: theory, methods, uses and application to biotechnology*. Orlando: Academic Press, 1985.

BANDMANN, N., COLLET, E., LEIJEIN, J., UHLÉN, M., VEIDE, A., NYGREN, P.A. Genetic engineering of the *Fusarium solani* pisi lipase cutinase for enhanced partition em PEG-phosphate aqueous two phase system. *Journal of Bioctechonology*, v. 79, p. 161-172, 2000.

BARON, A.M. Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em catálise (2008). Tese (Doutorado) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas: Editora da Unicamp, 1995.

BEISSON, F., TISS, A., RIVIÈRE, C., VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, p. 133-153, 2000.

BORGSTRÖM, B., BROCKMAN, H. *Lipases*, New York: Ed. Elsevier, 1984.

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

BRADDOO, S., SAXENA, R.K., GUPTA, R. Partitioning and resolution of mixture of two lipases from *Bacillus stearothermophilus* SB-1 in aqueous two-phase system. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 57-62, 1999.

BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release in the food and cosmetics industries. In: *Polymeric delivery systems: properties and applications*. Oxford: University Press, 1993.

CABRAL, J.M.S., AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid extraction of biomolecules using aqueous two-phase systems. In: *Recovery process for biological materials*. New York: Ed. John Wiley & Sons, 1993.

CANHOS, V.P., VAZOLLER, R.F. Síntese e recomendações. Disponível em www.biota.org.br/pdf/v1cap11.pdf. Acesso em 20 de março de 2010.

DO CANTO, W.L., MENEZES, T.J.B. *Estudos Econômicos – Alimentos Processados. Produção, usos e mercado de enzimas*. Campinas: Ital, 1995.

CARDELLO, H.M.A.B, CELESTINO, E.M. Encapsulação de aromas e sabores: utilização de amidos como agentes encapsulantes. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 2, p. 166-171, 1996.

CARNEIRO, R.M.D., GOMES, C.B. Encapsulação do fungo *Paecilomyces lilacinus* em matrizes de alginato-argila e avaliação da viabilidade dos conídios em duas temperaturas. *Neumatologia Brasileira*, v. 21, n.2, p.85-91, 1997.

CARVALHO, P.O., CAMPOS, P.R.B., NOFFS, M.D'A., OLIVEIRA J.G., SHIMIZU, M.T., SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, v. 26, n.1, p. 75-80, 2003.

CECHINEL, M.A.P., SKORONSKI, E., JOÃO J.J. Avaliação da estabilidade de *Lipozyme TL* imobilizada em gel de gelatina aplicada na síntese de ésteres em meio orgânico. *XVII Encontro de Química da Região Sul (17-SBQSul)*, FURG, 2009.

COSTA, V.E.U., AMORIM, H.L.M. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova*, v. 22, n. 6, p. 863-873, 1999.

DALLA-VECCHIA, R., NASCIMENTO, M.G. SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v.27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DESAI, K.G.H., PARK, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

DIAMOND, A.D., HSU, J.T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. *Advances in Biochemical Engineering*, v. 47, n. 135, p. 89-135, 1992.

DU, W., LIU, D., LI, L., XU, Y., LI, W. Processo para a produção de biodiesel a partir de óleo renovável na presença de catálise por lipase em um sistema de reação em meio orgânico. Patente nº PI0418062-3, 2007.

EITENMILLER, R.R., VAKIE, J.R., SWAHANI, K.M. Production and properties of *Penicillium roquefort* lipase. *Journal of Food Science*, v. 35, p. 130-133, 1970.

FAVARO-TRINDADE, C.S., PINHO, S.C., ROCHA, G.A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal Food Technology*, v. 11, p. 103-112, 2008.

FERNANDES, M.L.M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise (2007). Tese (Doutorado) – Faculdade de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FERREIRA, J.F. Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistemas de duas fases aquosas PEG/fosfato (2007). Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2007.

FORCINITI, D., HALL, C.K., KULA, M.R. Influence of polymer molecular weight and temperature on phase composition in ATPs. *Fluid Phase Equilibria*, v. 61, p. 243-262, 1991.

FRANCO, T.T. Use of modified proteins in aqueous two-phase systems. Effect of surface hydrophobicity and charge (1992). Thesis – Faculty of Agriculture and Food, University of Reading, UK, 1992.

FRASER, C.M., DUJON, B. The genomics of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*, v. 3, p. 443-444, 2000.

GARCIA-CRUZ, C.H., FOGGETTI, U., SILVA, A.N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.

GAVA, A.G. *Princípios de Tecnologia de Alimentos*, São Paulo: Ed. Nobel, 1984.

GIBBS, B.F., KERMASHA, S., ALLI, I., MULLIGAN, C.N. Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 50, p. 213-224, 1999.

GOMES, J.I.N.R., VIEIRA, R.M.M.V., BARROS, S.M.P.C. Microcápsulas com grupos funcionais reativos de ligação a fibras têxteis e processo de aplicação e fixação. Patente nº PI0608101-0A2, 2009.

GUERRA, M.P., TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. *Embrapa*, v.2. p. 533-568, 1998.

GUPTA, R., GUPTA, N., RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 64, p.763-781, 2004.

HAMMESTER, L., JOHANN, D., FLORES, M.D.F., ROLDO, L., KINDLEIN Jr., W. Microcápsulas: Uso da microtecnologia no design de produtos inovadores. São Paulo: *Anais do 8º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Design*, 2008.

HANKIN, L., ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, v. 67, p. 597-607, 1975.

HARRIS, J.M. *Poly (ethylene glycol) chemistry: Biochemical and biomedical applications*. New York: Plenum Press, 1992.

HASAN, F., SHAH, A.A., HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251, 2006.

HUSTEDT, H., KRONER, K.H., PAPAMICHEL, N. Continuous cocurrent aqueous two phase extraction from biomass-automated recovery in production scale. *Process Biochemistry*, v. 23, p. 129-137, 1988.

<http://www.amano-enzyme.co.jp>. Acesso em 20 de março de 2010.

<http://revistapesquisa.fapesp.br/>. Acesso em 20 de março de 2010.

JOHANSSON, G. Partition of proteins. In: Brooks, D.E., WALTER, H., FISCHER, D. *Partition in aqueous two-phase systems*. Orlando: Academic Press, 1995.

KAILASAPATHY, K., LAM, S.H. Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening. *International Dairy Journal*, v. 15, p. 929-939, 2005.

KAMIMURA, E.S., MENDIETA, O., SATO, H.H., PASTORE, G.M., MAUGERI, F. Production of lipase from *Geotrichum sp.* and adsorption studies on affinity resin. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 16, p. 103-112, 1999.

KIELING, D.D, FURIGO Jr., A. Enzimas – aspectos gerais. Disponível em: [www.eng.ufsc.br/labs/probio/disc.../enzimas aspectos gerais.pdf](http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/disc.../enzimas%20aspectos%20gerais.pdf). Acesso em 20 de março de 2010.

KING, A.H. Brown seaweed extracts (Alginates). In: *Food hydrocolloids*. Boca Raton: M.Glicksman, 1983.

KIRK, O, BORCHERT, T.V., FUGLSANG, C.C. Industrial Enzymes applications. *Current Opinion Biotechnology*, v. 13, p. 345–351, 2002.

KOJIMA, Y., SHIMIZU, S. A novel lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380: Gene cloning, overproduction, renaturation-activation, two-step purification, and characterization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 96, p. 242-249, 2003.

KORDEL, M., HOFMANN, B., SCHOMBURG, D., SCHMID, R. Extracellular lipase of *Burkholderia sp* Strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data. *Journal of Bacteriology*, v. 177, p. 4836-4841, 1991.

KORNBERG, A. Why purify enzymes? *Methods in Enzymology*, v. 182, p. 1-5, 1990.

KROUMOV, A.D., MÓDENES A.N., WENZEL, B.M. Desenvolvimento de um modelo da cinética enzimática da transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel. *Acta Science Technology*, v.19, n.1 p. 9-16, 2007.

NAWANI, N., SINGH, R., KAUR, J. Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus sp*: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 9, p. 559-565, 2006.

KULA, M.R. Extraction and purification of enzymes using aqueous two-phase systems. *Applied Biochemistry and Bioengineering*, v.2, p. 71-95, 1979.

KULA, M.R., KRONER, K.H., HUSTEDT, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. *Advances in Biochemistry Engineering*, v. 24, p. 73-118, 1982.

JACKSON, L.S., LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. *Food Science and Technology*, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

JAERGER, K., REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnology*, v. 16, p. 396-403, 1998.

- JAEGER, K., EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 390-397, 2002.
- LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, v.5, p. 677-680, 1970.
- LEAL, M.C.M.R., CAMMAROTA, M.C., FREIRE, D.M.G., SANT'ANNA Jr., G.L. Hydrolytic enzymes as adjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewater. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.
- LIMA, V.M.G., KRIEGER, N., MITCHELL, D.A., FONTANA, J.D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochemical and Engineering Journal*, v. 18, p. 65-71, 2004.
- LIN, S.F., CHIOU, C.M., YEH, C.M., TSAI, Y.C. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 3, p. 1093-1095, 1996.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MACEDO, G.A., PARK, Y.K., PASTORE, G.M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Journal of the Brazilian Society for Microbiology*, v. 28, p. 90-95, 1997.
- MACRAE, A.R. Lipase-catalysed interesterification of oils and fats. *Journal of the American Oil Chemisty*, v.60, n.2, p. 243-246, 1983.
- MACRAE, A.R., HAMMOND, R.C. Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v.3, p. 193-217, 1985.
- MAKHZOUM, A., APENTEN, R.K.O., KNAPP, J.S. Purification and properties of lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain 2D. *Elsevier*, v. 95, p. 459-472, 1995.
- MILED, N., CANAAN, S., DUPUIS, L., ROUSSEL, A., RIVIÈRE, M., CARRIÈRE, F., DE CARO, A., CABBILLAU, C., VERGER, R. Digestive lipases: from three-dimensional structure to physiology. *Biochimie*, v. 82, p. 973-986, 2000.
- 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.
- MORITA, T., ASSUMPCÃO, R.M.V. *Manual de soluções, reagentes e solventes. Padronização-preparação-purificação*. 2ª ed. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 1995.

MORRISSEY, J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, v. 117, p. 307-310, 1981.

MOTTA, V.T. *Bioquímica Clínica para o Laboratório*. 4ª ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2005.

MUKHERJEE, K.D., HILLS, M.J. In: WOOLEY, P., PETERSEN, S.B. *Lipases – their structure, biochemistry and application*, Cambridge: University Press, 1994.

MUKAI-CORRÊA, R.; PRATA, A.S.; ALVIM, I.D.; GROSSO, C.R.F. Controlled release of protein from hydrocolloid gel microbeads before and after drying. *Current Drug Delivery*, v.1, n.1, p. 265-273, 2004.

MUSSATO, S.I., FERNANDES, M., MILAGRES, A.M.F. Enzimas - Poderosa ferramenta na indústria. *Ciência Hoje*, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

OH, B.C., KIM, H.K., LEE, J.K., KANG, S.C., OH, T.K. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. *FEMS Microbiological Letters*, v.179, p. 385-392, 1999.

OKAZAKI, S., KAMIYA, N., GOTO, M., NAKASHIO, F. Purification and characterization of a novel lipolytic enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.78, n.6, p.413-419, 1997.

OLIVEIRA, A.M., SILVA, M.L.C.P., ALVES, G.M., SANTOS, A.M. Encapsulamento do Dióxido de Titânio (TiO₂) pela Técnica de Polimerização em Emulsão. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 12, p. 123-129, 2002.

OLIVEIRA, D., DI LUCCIO, M., FACCIO, C., ROSA C.D., BENDER, J.P., LIPKE, N., MENONCIN, S., AMROGINSKI, C., OLIVEIRA J.V. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 771, p. 113-116, 2004.

PADILHA, G.S., CASTIGIONI, G.L., MONTE ALEGRE, R., TAMBOURGI, E.B. Avaliação da lipase extracelular de *Pseudomonas cepacia* para purificação com sistema bifásico aquoso. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Artigo aceito para publicação em 2010.

PADILHA, G.S., CASTIGIONI, G.L., MONTE ALEGRE, R., TAMBOURGI, E.B. Avaliação de diferentes íons na atividade da lipase de *Pseudomonas cepacia*. *Exacta*, v.7, n. 2, p. 181-186, 2010.

PAIVA, A.L., BALCÃO, V.M., MALCATA, F.X. Kinetics and mechanics of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 187-204, 2000.

PALOCCI, C., SORO, S., CERNIA, E., FIORILLO, F., BELSITO, C.M.A., MONACELLI, B., MONACHE, G.D., PASQUA, G. Lipolytic isoenzymes from *Euphorbia Latex*. *Plant Science*, v.165, p. 577-582, 2003.

PANDEY, A., BENJAMIN, S., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., KRIEGER, N., SOCCOL, V.T. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology Applied Biochemistry*, v. 29, p. 119-131, 1999.

PAPAMICHEL, N., BOERNER, B., HUSTED, H. Continuous aqueous phase extraction of proteins: automated and recycling of process chemical. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 54, p. 47-55, 1992.

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

PAULA, A.V., MOREIRA, A.B.R., BRAGA, L.P., CASTRO, H.F., BRUNO, L.M. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. *Química Nova*, v. 31, n. 1, 2008.

PENCREAC'H, G., BARRATI, J.C. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 417-422, 1996.

PESSOA Jr., A., KILIKIAN, B.V. *Purificação de produtos biotecnológicos*, Barueri: Ed. Manole, 2005.

PIZA, F.A.T. Purificação da enzima quitosanase de *Bacillus cereus* em sistemas de duas aquosas (2008). Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2008.

PROTEIN DATA BASE. Disponível em www.pdb.org. Acesso em 21 de março de 2010.

REGULY, J.C. *Biotecnologia dos processos fermentativos*. Petotas: Ed. Universitária UFPel, 2000.

RÉ, M.I. Microencapsulação: Em busca de produtos inteligentes. *Ciência Hoje*, v. 27, p. 24-29, 2000.

Revista Cosméticos e Perfumes, v. VI, n. 38, 2005. Disponível em www.insumos.com.br/cosmeticoseperfumes/.../encapsulamento_n%2038.pdf. Acesso em 21 de março de 2010.

REMMINGHORST, U., REHM, B.H.A. *Microbial Production of Alginate: Biosynthesis and Applications*. Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and perspectives. Academic Press, 2009.

RIBEIRO, M.Z., SILVA, D.P., VITLO, M., ROBERTO, I.C., PESSOA Jr. A. Purificação parcial de glucose-6-fosfato desidrogenase por sistemas de duas fases aquosas poli (etilenoglicol)/fosfato. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 78-83, 2007.

RITO-PALOMARES, M., HERNANDEZ, M. Influence of system and process parameters on partitioning of cheese whey proteins in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 711, p. 81-90, 1998.

ROSENBERG, M., YOUNG, S. Whey proteins as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milk fat-structure evaluation. *Food Structure*, v.12, p. 31-41, 1993.

SALUM, T.F.C., BARON, A.M., ZAGO, E., TURRA, V., BARATTI, J.C., MITCHELL, D.A., KRIEGER, N. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from *Burkholderia cepacia*. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 26, n. 3, p. 197-203, 2008.

SANTOS, A.B, FERREIRA, V.P, GROSSO, C.R.F. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 3, p. 26-30, 2000.

SARMENTO, M.J., PIRES, M.J., CABRAL, J.M.S. Liquid-liquid extraction of a recombinant protein, cytochrome b5, with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. *Journal of Chromatography A*, v. 668, p. 117-120, 1994.

SARUBBO, L.A. Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com colunas de discos perfurados rotativos (2000). Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2000.

SAXENA, R.K., SHEORAN, A., GIRI, B., DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*, v. 52, p. 1-18, 2003.

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, n. 5, p. 1182-1187, 2007.

SEZER, A.D., AKBUGA, J. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: I. sustained release of a macromolecular drug from chitosan treated alginate beads. *Journal of Microencapsulation*, v. 16, n. 2, p. 195-203. 1999.

SHARMA, R., SONI, S.K., VOHRA, R.M., GUPTA, L.K., GUPTA, J.K. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a thermophilic *Bacillus sp.* RSJ-1. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 1075-1084, 2002.

SHARMA, S., GUPTA, M.N. Alginate as a macroaffinity ligand and an additive for enhanced activity and thermostability of lipases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 33, p.161–165, 2001.

SHIMADA, Y., WATANABE, Y., SUGIHARA, A., TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic on ScienceDirect*, v. 17, p. 133-142, 2002.

SILVA, L.H.M., LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, 2006.

SILVA, M.C.H., SILVA, L.H.M., PAGGIOLI, F.J. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1332-1339, 2006.

SOUZA, M.S.M. Ativos microencapsulados encontram mais aplicações. *Química e Derivados*. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/revista/qd388/microencap.1.htm>. Acesso 20 de março de 2010.

STAMATIS, H., XENAKIS, A. Biocatalysis using microemulsion-based polymer gels containing lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic on ScienceDirect*, v. 6, p. 399-406, 1999.

STUER, W., JAEGER, K.E., WINKLER, U.K. Purification of extracellular lipase from *Burkholderia aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, v.168, n.3, p. 1070-1074, 1986.

SUAVE, J., DALL'AGNOL, E.C., PEZZIN, A.P.T., SILVA, D.A.K., MEIER, M.M., SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Revista Saúde e Ambiente*, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

THIES, C. *How to make microcapsules combined lecture and laboratory manual*. Sant Louis: Thies technology, 1995.

UPPENBERG, J., PATKAR, S., BERGFORS, T., JONES, T.A. Crystallization and preliminary studies of lipase B from *Candida antarctica*. *Journal Molecular Biology*, p. 790-792, 1994.

VECCHIA, R.D., REBELO, A.M., RODRIGUES, C.A. Poços de Caldas: *Resumos da 21ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 1998.

- VENÂNCIO, A.A.D., TEIXEIRA, J.A. Protein mass transfer studies on Spray column using the PEG/Reppal PES 100 aqueous two-phase system. *Bioprocess Engineering*, v. 13, p. 251-255, 1995.
- VIDEIRA, M., AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate. *Journal of Chromatography A*, p. 237-240, 1994.
- WARNER, J.C., CANNON, A.S., DYE, K.M. Green Chemistry. *Environmental Impact Assessment Review*, v. 24, p. 775-799, 2004.
- WATANABE, Y., SHIMADA, Y., SUGIHARA, A., TOMINAGA, Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v.78, p. 703-707. 2001.
- WINKLER, U.K., STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, v.138, p. 663-670, 1973.
- WOLSKI, E. Estudo comparativo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium sp.* livre e imobilizado (2008). Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, 2008.
- WON, K., KIM, S., KIM, K.J., PARK, H.W., MOON, S.J. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2149–2154, 2005.
- ZAIA, D.M.A., ZAIA, C.T.B.V., LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, v.21, n.6, p. 787-793, 1998.
- ZUNICA, A.D.G., COIMBRA, J.S.R., MINIM, L.A. Coeficientes de partição da α -lactoalbumina e β -lactoalbumina em sistemas bifásicos aquosos: influência da massa molar do polímero. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 3, p. 149-155, 2001.
- ZUNICA, A.D.G., COIMBRA, J.S.R., MINIM, L.A., MEIRELLES, A.J.A. In: *Extração líquido-líquido usando sistemas aquosos bifásicos: uma revisão*. Campinas: *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.37, p.89-102, 2003.

ANEXO A

TABELA ANEXO A1. Dados obtidos para a curva de calibração pelo método de Bradford. Macroensaio

Concentração (mg/L)	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância 3	Média
100	0,079	0,079	0,0711	0,076367
200	0,1938	0,2252	0,1742	0,197733
400	0,3489	0,2749	0,3337	0,319167
600	0,5042	0,5074	0,4022	0,471267
800	0,59	0,597	0,59	0,592333
1000	0,796	0,7826	0,72	0,766200

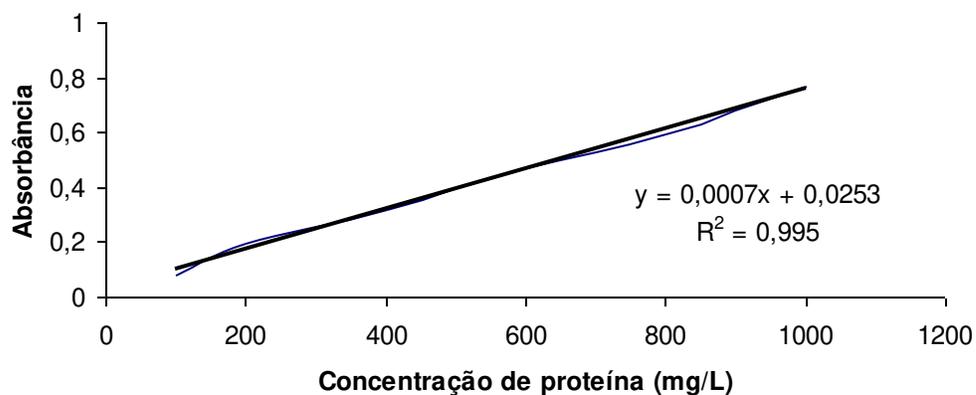


FIGURA ANEXO A1. Curva de calibração pelo método de Bradford.

ANEXO B

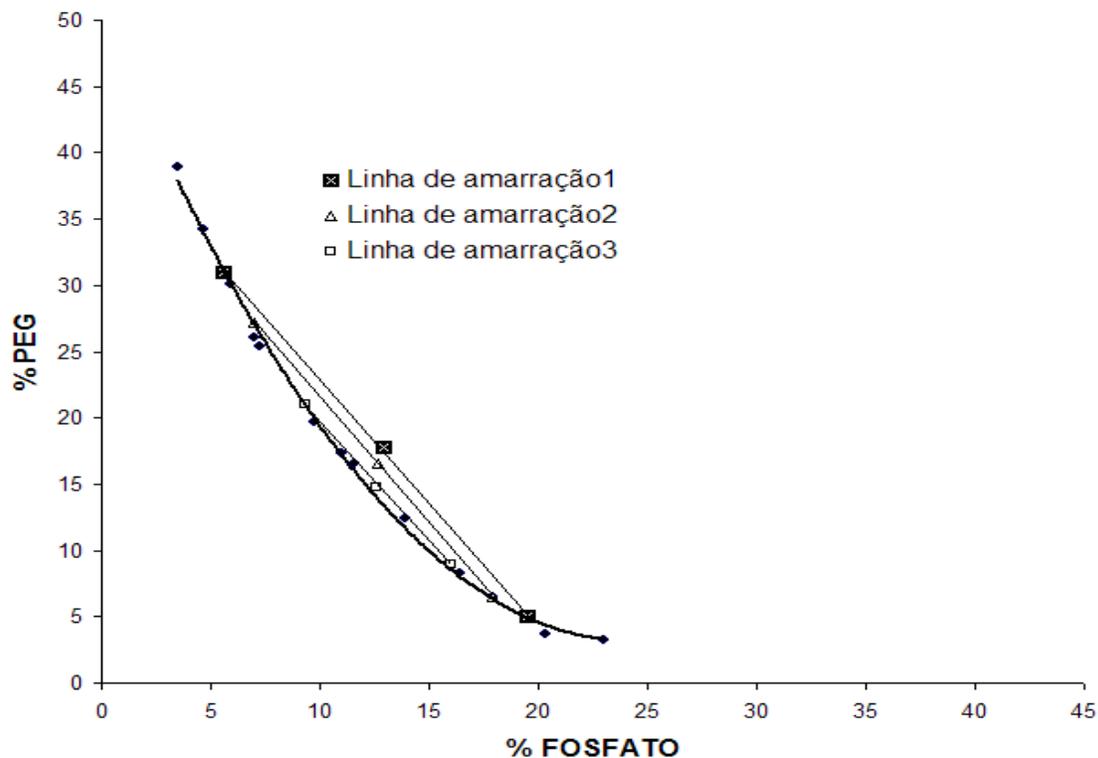


FIGURA ANEXO B1. Linhas de amarração PEG 1500 pH 6.

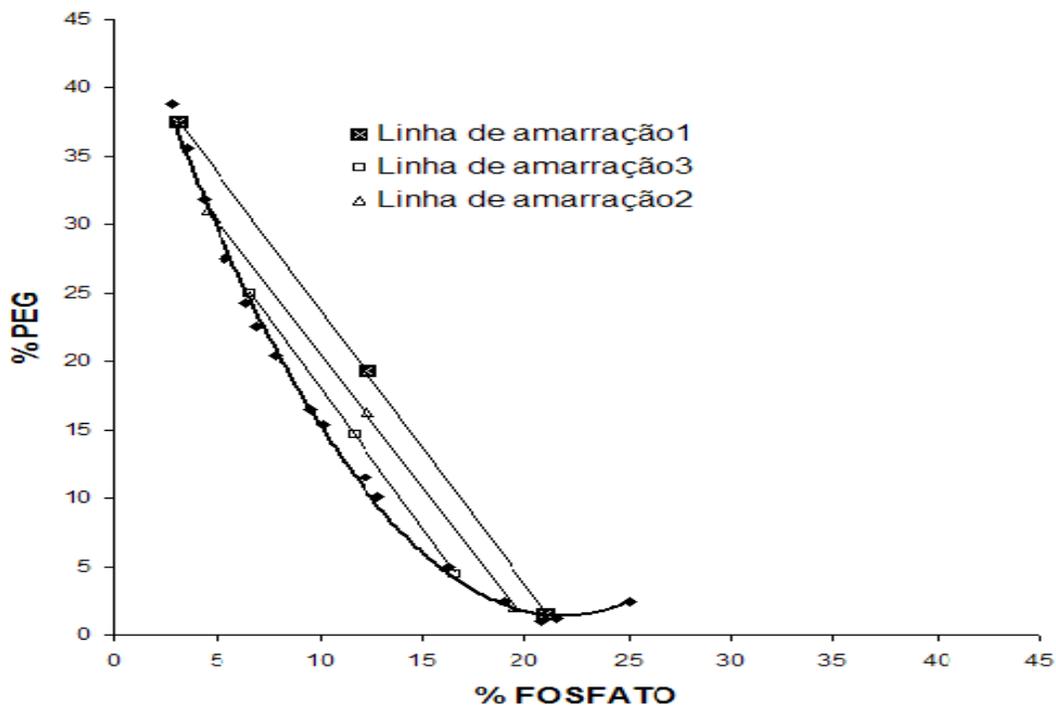


FIGURA ANEXO B2. Linhas de amarração PEG 1500 pH 7.

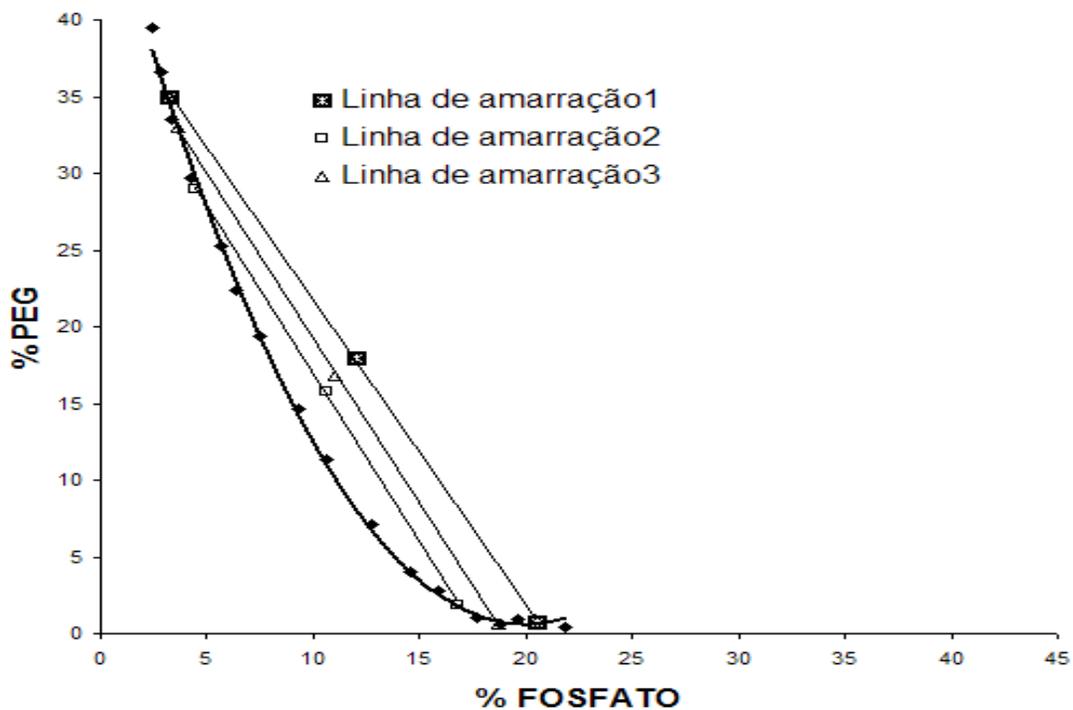


FIGURA ANEXO B3. Linhas de amarração PEG 1500 pH 8.

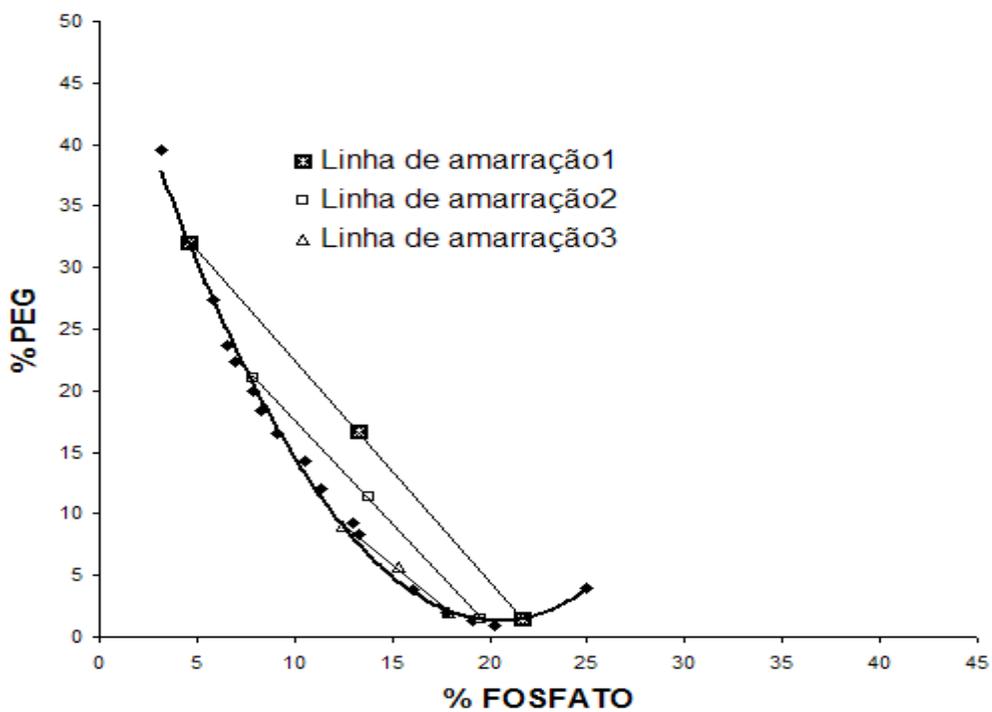


FIGURA ANEXO B4. Linhas de amarração PEG 4000 pH 6.

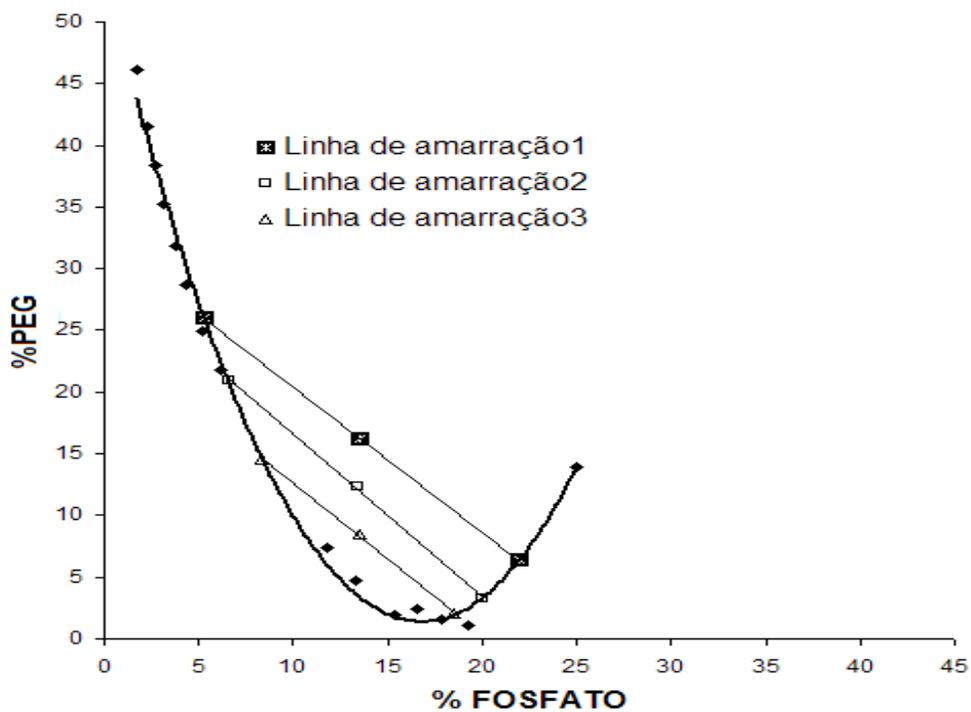


FIGURA ANEXO B5. Linhas de amarração PEG 4000 pH 7.

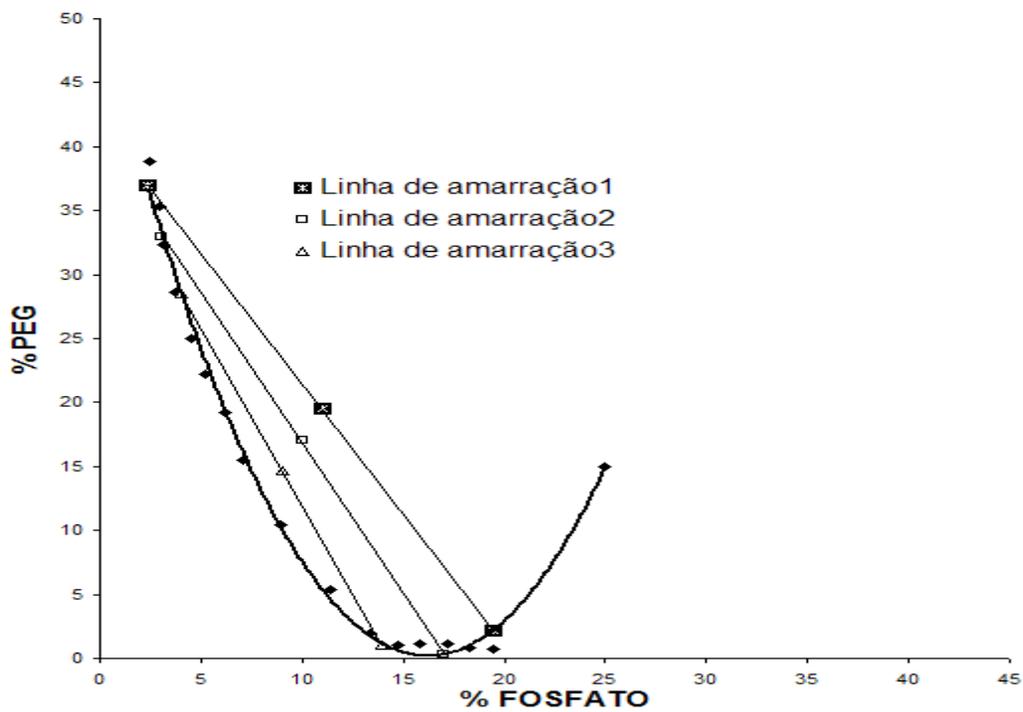


FIGURA ANEXO B6. Linhas de amarração PEG 4000 pH 8.

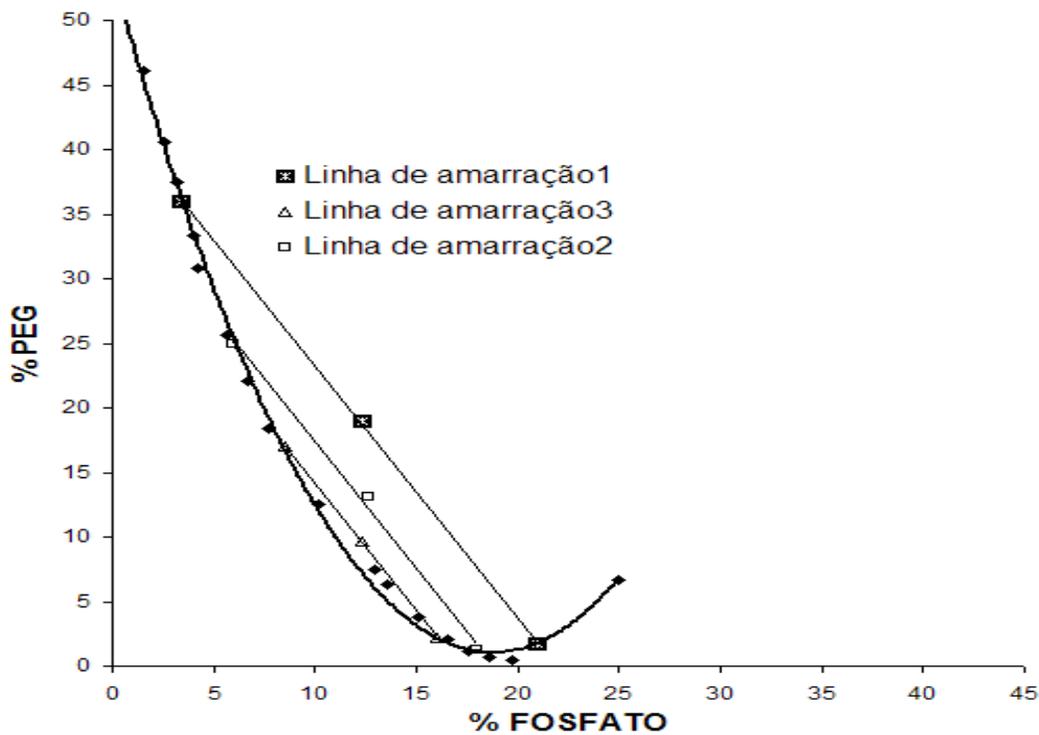


FIGURA ANEXO B7. Linhas de amarração PEG 6000 pH 6.

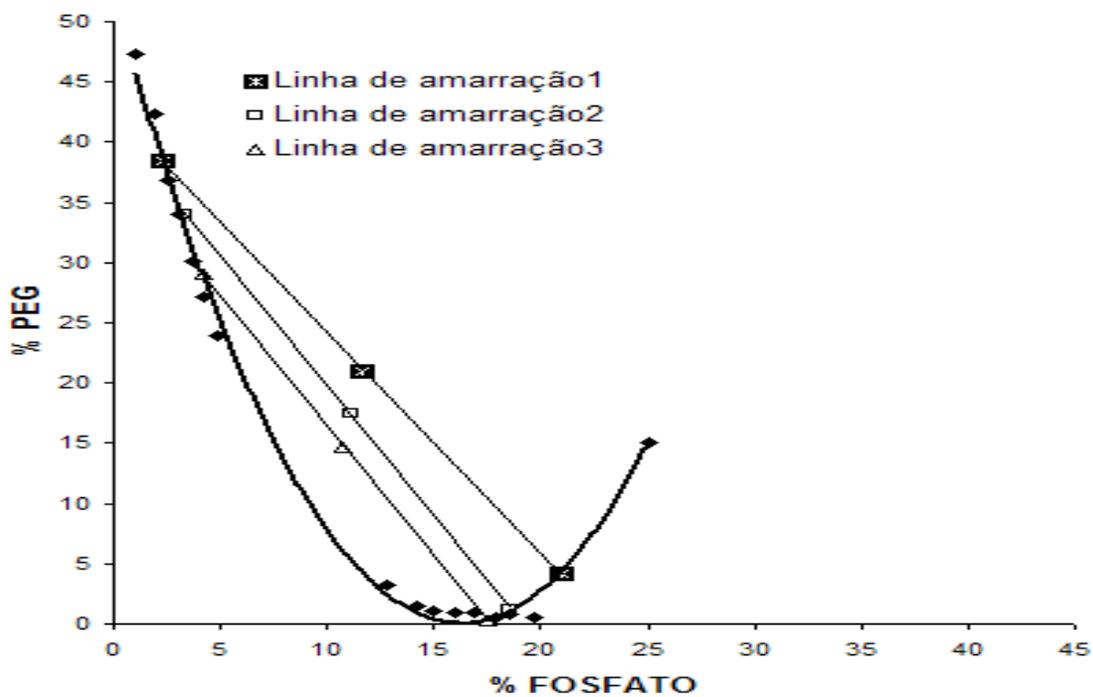


FIGURA ANEXO B8. Linhas de amarração PEG 6000 pH 7.

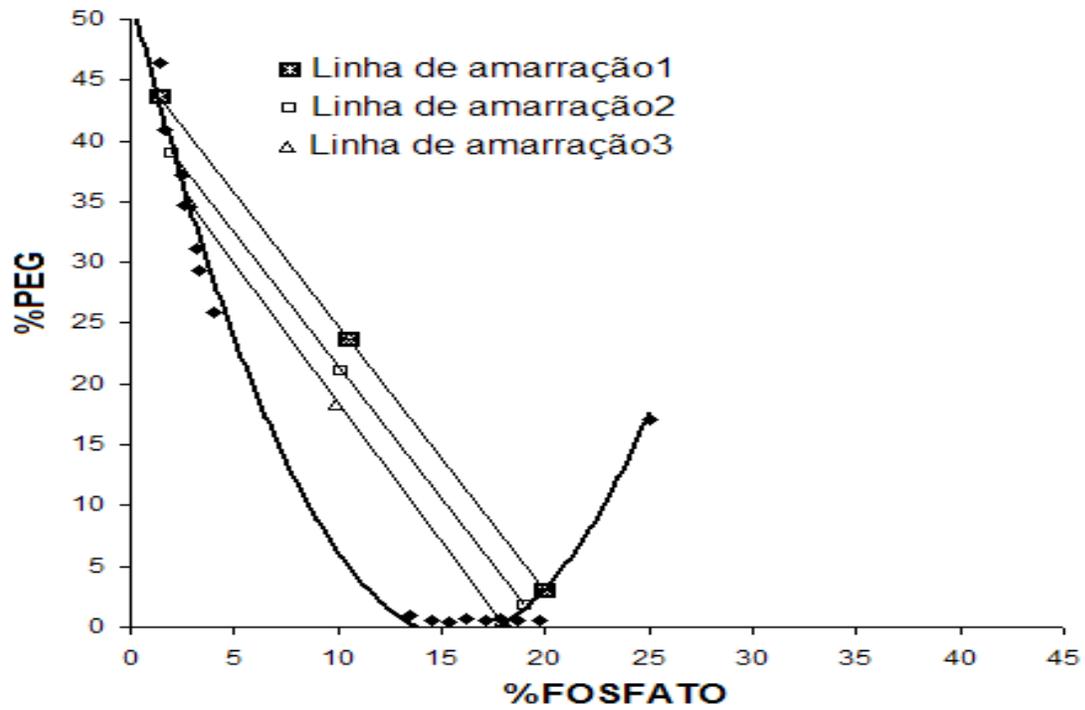


FIGURA ANEXO B9. Linhas de amarração PRG 6000 pH 8.