



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ADRIANA ELISA FERREIRA MORATO**

**PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO SIMULTÂNEAS DE  
ENZIMAS RECOMBINANTES PARA FINS INDUSTRIAIS:  
LIPASE B DE *Pseudozyma antarctica* COMO MODELO.**

Salvador  
2014

**ADRIANA ELISA FERREIRA MORATO**

**PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO SIMULTÂNEAS DE  
ENZIMAS RECOMBINANTES PARA FINS INDUSTRIAIS:  
LIPASE B DE *Pseudozyma antarctica* COMO MODELO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha.

Salvador  
2014

M831 Morato, Adriana Elisa Ferreira

Purificação e imobilização de enzimas recombinantes para fins industriais: lipase B de *Pseudozyma antarctica* como modelo / Adriana Elisa Ferreira Morato. – Salvador, 2014.  
85 f.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. Enzima. 2. Imobilização. 3. Enzima. 4. Lipase B. 5. Passo único. I. Cunha, Vitor Hugo Moreau da. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 577.1

## ADRIANA ELISA FERREIRA MORATO

### Purificação e imobilização simultâneas de enzimas recombinantes para fins industriais: Lipase B de *Pseudosyma antarctica* como modelo

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2014.

#### BANCA EXAMINADORA:

Vitor Hugo Moreau da Cunha – Orientador

Doutor em Química Biológica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.



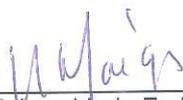
Marcelo Andres Umsza Guez

Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.



Heiddy Márquez Alvarez

Doutora em Química Inorgânica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.  
Universidade Estadual de Feira de Santana.



Ao meu esposo que esteve comigo em todos os momentos dessa jornada, participando dos momentos de alegria e de aflição. Você é o meu melhor amigo e grande amor. Te amo!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus, pelo renovo da minha fé durante essa caminhada, pelas bênçãos concedidas, pelo seu amor incondicional e por ser meu refúgio e fortaleza perante as dificuldades encontradas;

À minha família pelo incentivo, apoio emocional, boas risadas e pela compreensão nos momentos de ausência. Especialmente aos meus irmãos (Camila Morato, Manuela Morato, Melissa Morato e João Morato de Faria) pelos momentos de carinho e amor demonstrado. Vocês são presentes de Deus na minha vida.

Ao orientador Prof. Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha pela oportunidade, confiança, dedicação, paciência e pelo aprendizado adquirido durante este trabalho;

Aos meus amigos e colegas de turma: Ana Camila Andrade, Daiane Carvalho, Eduardo Muniz, Carine Aguiar, Ismael Fernandes, Marivaldo Santos, Mila Hughes, Paulo Teixeira, Tatiana Oliveira, Tereza Guedes (doutorado) e Wilian Oliveira. Em particular a Roberta Santoro e Sueli Carvalho pela amizade, pelas conversas, pela ajuda disponibilizada, pelos bons momentos de distrações e de aprendizagem compartilhados;

A todos os colegas e professores do Laboratório de Biotecnologia Industrial (FTC). De maneira especial as alunas de iniciação científica Iara Nunes, Karen Sadoyama e Thamires Soares e, a doutoranda Ilvania Vêras pela ajuda nos protocolos, dedicação e pelos momentos vivenciados;

Aos professores do mestrado pela dedicação a esse curso, pelo conhecimento e experiências acadêmicas compartilhadas;

A coordenação do curso de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA);

Ao CNPq pelo auxílio financeiro na realização deste trabalho;

À todos que contribuíram positivamente para a realização deste trabalho.

“Toda mente é um cofre. Não adianta arrombá-la, é necessário usar a chave certa”.

Augusto Cury (2012, p. 148)

MORATO, Adriana Elisa Ferreira. Purificação e imobilização de enzimas recombinantes para fins industriais: Lipase B de *Pseudozyma antarctica* como modelo. 85 f. 2014. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

## RESUMO

Atualmente, a produção de enzimas recombinantes é um dos mercados mais promissores para a biotecnologia. Processos catalisados por enzima são aplicados em diversos processos industriais por apresentarem alta eficiência catalítica, especificidade e seletividade, além do baixo consumo de energia, o que contribui positivamente com o Meio ambiente. A maioria dos biocatalisadores aplicados em processos industriais consiste em enzimas imobilizadas em resinas insolúveis. A imobilização aumenta a atividade catalítica, a estabilidade e também torna possível a aplicação da enzima em meio reacional contínuo assim como, sua reutilização no meio de reação. O interesse em torno do aprimoramento da técnica de imobilização e produção de biocatalisadores enzimáticos tem aumentado nos últimos anos, o que permite indicar o processo de purificação enzimática como o passo mais dispendioso na produção de enzimas. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um processo adequado de purificação e imobilização de enzimas recombinantes em passo único, baseados na interação do *his-tag* com resinas específicas, que permita a produção de catalisadores enzimáticos aplicáveis à produção industrial com baixo custo. Para tanto, foram utilizadas três tipos de resinas da série Amberlite, as quais foram avaliadas quanto à sua interação com os íons  $Ni^{2+}$  ou  $Co^{2+}$ , com proteínas inespecíficas e com a enzima lipase B de *Pseudosyma antarctica* transformada com cauda de hexahistidina. Paralelamente, análises da eficiência catalítica da lipase foram realizadas através da mensuração da atividade hidrolítica por meio de testes de degradação do *pNPP* e concentração da proteína pelo método colorimétrico de Bradford. No presente estudo, foi realizada uma prospecção tecnológica com o intuito de avaliar o desenvolvimento da tecnologia no mundo. Esse estudo indicou a necessidade de pesquisas no Brasil. Entre os suportes testados, a resina Amberlite IRN77 carregada com íons  $Ni^{2+}$  e pré-tratada com tampão Tris-HCl (pH 7.0) apresentou dados favoráveis quanto a ligação de íons metálicos e proteína inespecífica, sendo utilizada nas etapas de purificação e imobilização enzimática. A lipase PALB purificada na coluna apresentou uma boa atividade catalítica (522U/g) em meio aquoso, mesmo na presença de compostos desnaturantes. Com isso, um suporte de baixo custo foi empregado para o processo de purificação e imobilização enzimática. Este trabalho é um novo passo para o esclarecimento dos processos envolvidos na técnica de purificação e imobilização de enzimas em passo único, além de contribuir para a pesquisa no país por meio de uma patente que está sendo desenvolvida.

**Palavras chave:** Purificação, Imobilização, Enzima, Lipase B, passo único.

MORATO, Adriana Elisa Ferreira. Simultaneous purification and immobilization of recombinant enzymes for industrial purposes: Lipase B to *Pseudozyma antarctica* as model. 85 f. 2014. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

## ABSTRACT

Currently, the production of recombinant enzymes is one of the most promising markets for biotechnology. Catalyzed processes by enzymes are applied in many industrial processes because they have high catalytic efficiency, specificity and selectivity, in addition to low power consumption, which contributes positively to the environment. Most of biocatalysts in industrial processes are applied in immobilized enzyme insoluble resins. The immobilization enhances the catalytic activity, stability and also makes possible the use of continuous enzyme reaction medium as well as reuse in the reaction medium. The interest around the improvement of production technique and immobilization of enzyme biocatalysts has increased in recent years, allowing indicate enzymatic purification process as the most expensive step in the production of enzymes. This study aimed to develop an appropriate process of purification and immobilization of recombinant enzymes in one step, based on the interaction of his-tag with specific resins, allowing the production of enzymatic catalysts applicable to industrial production at low cost. For this purpose, three types of resins Amberlite series, which were evaluated for their interaction with Ni<sup>2+</sup> ions, were used or Co<sup>2+</sup>, with nonspecific proteins and their *Pseudosyma antarctica* lipase B transformed with hexahistidine tail. In parallel, analyses of the catalytic efficiency of lipase were performed by measuring the hydrolytic activity by testing the degradation of pNPP and protein concentration by the Bradford colorimetric method. In the present study, a technological exploration was performed in order to evaluate the development of technology in the world. This study indicated the need for research in Brazil. Among the tested media, the Amberlite IRN77 charged with Ni<sup>2+</sup> ions and pre-treated with Tris-HCl buffer (pH 7.0) presented favorable data for binding of metal ions and nonspecific protein being used in purification and immobilization stage of enzyme. The purified lipase PALB column showed good catalytic activity (522U/g) in an aqueous medium, even in the presence of denaturing compounds. With this, a low-cost support was used for the process of purification and enzyme immobilization. This work is a further step towards the understanding of the processes involved in the art for purification and immobilization of enzymes in a one step, as well as contributing to research in the country through a patent that is being developed.

**Keywords:** Purification, Immobilization, Enzyme, Lipase B, one step.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	–	Reações químicas catalisadas por lipases .....	20
Figura 2	–	Características da Lipase B de <i>Pseudozyma antarctica</i> .....	21
Figura 3	–	Estrutura cristalina de <i>PALB</i> com os aminoácidos que compõem a tríade catalítica .....	22
Figura 4	–	Principais métodos de imobilização enzimática .....	26
Figura 5	–	Representação comparativa entre as formas da lipase após diferentes formas de imobilização.....	27
Figura 6	–	Estrutura química da resina quelante Amberlite IRC748 .....	32
Figura 7	–	Fluxograma da metodologia aplicada .....	35
Figura 8	–	Mapa do plasmídeo pET28b(+) com <i>Histag</i> .....	45
Figura 9	–	Esquema da transformação de células competentes por eletroporação .....	46
Figura 10	–	Reator Tecbio-1,5 durante produção de proteínas recombinantes .....	47
Figura 11	–	Esquema da preparação da coluna com resinas do grupo Amberlite .....	50
Figura 12	–	Esquema do processo de purificação enzimática .....	51
Figura 13	–	Principais códigos relacionados na prospecção tecnológica .....	55
Figura 14	–	Evolução Anual de Depósitos de Patentes .....	57
Figura 15	–	Número de Patentes depositados por País .....	58
Figura 16	–	Perfil de depositantes das Patentes .....	58
Figura 17	–	Quantidade de Patentes depositadas de acordo com a Titularidade .....	59
Figura 18	–	Principais depositantes de Patentes .....	60
Figura 19	–	Representação das principais Academias depositantes por País	61
Figura 20	–	Representação dos principais Inventores depositantes .....	62

Figura 21 – Quantidade de Íons Ni <sup>2+</sup> e Co <sup>2+</sup> (mmol/g) ligados às Resinas Amberlite IRC748, 200C e IRN77 .....	65
Figura 22 – Ligação e Retenção de Proteína inespecífica nas Resinas Amberlite .....	68
Figura 23 – Carregamento e Ligação de Proteína inespecífica (mmol/g) com Íons Ni <sup>2+</sup> e Co <sup>2+</sup> nas Resinas Amberlite .....	70
Figura 24 – Comportamento das Amberlites com Íons metálicos na ligação de Proteínas inespecífica .....	72
Figura 25 – SDS-PAGE das amostras eluídas na coluna His-GraviTrap TALON .....	74
Figura 26 – Atividade Funcional de PALB após carregamento e eluição da Resina IRN77 .....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de Palavras-chave e Códigos ECLA utilizadas na busca de patentes .....	36
Tabela 2 – Palavras-chave e códigos utilizados na prospecção .....	54
Tabela 3 – Significado dos Códigos das Patentes .....	56
Tabela 4 – Variação de pH das resinas nos diferentes tratamentos .....	66
Tabela 5 – Carregamento de Íons divalentes de Níquel e Cobalto (mmol/g) nas Resinas Amberlite.....	67
Tabela 6 – Carregamento inespecífico de Proteína (mmol/g) nas Resinas Amberlite.....	69
Tabela 7 – Carregamento inespecífico de Proteína padrão (mmol/g) em Resinas Amberlite pré-carregada com Íons de Níquel e Cobalto.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2YT	Meio bacto-triptona
Abs	Absorvância
BSA	Albumina sérica bovina
CI	Corpos de inclusão
D.O.	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPO	European Patent Office
HCl	Ácido Clorídrico
His-Tag	Cauda de Histidina – proteína recombinante
IMAC	Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Meio Luria-Bertani
mM	Milimolar
NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetro
PALB	Lipase B de <i>Pseudozyma antarctica</i> recombinante
PET28b	Vetor de expressão – plasmídeo
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pnp	<i>p</i> -nitrofenol
pNPP	Palmitato de <i>p</i> -nitrofenila
r.p.m	Rotações por minuto
RNA <sup>t</sup>	Ácido ribonucléico transportador
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
Tris-HCl	Tris hidrocloreto
U	Unidades de atividade enzimática
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
$\epsilon$	Coefficiente de extinção molar
$\mu$ L	Microlitros
kDa	quiloDaltons
v/v	Volume/ volume
w/v	Peso/ volume
mL/g	Mililitro/ grama
U	Unidade enzimática
U/g	Unidade enzimática/ grama
U/mL	Unidade enzimática/ mililitros

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	17
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
3.1	ENZIMAS .....	18
<b>3.1.1</b>	<b>Lipases</b> .....	19
3.1.1.1	Lipase B de <i>Pseudozyma antarctica</i> .....	21
3.2	APLICAÇÃO DE ENZIMAS PARA FINS INDUSTRIAIS .....	23
3.3	IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA .....	25
3.4	RESINAS DE TROCA IÔNICA .....	28
<b>3.4.1</b>	<b>Resinas do Grupo Amberlite</b> .....	31
3.4.1.1	Propriedades e Aplicações das Resinas Amberlite IRC748, 200C e IRN77 .....	31
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
4.1	FLUXOGRAMA ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA .....	35
4.2	PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA .....	35
4.3	REAGENTES E SOLUÇÕES .....	37
<b>4.3.1</b>	<b>Crescimento da Bactéria e Expressão heteróloga da Lipase</b> .....	37
<b>4.3.2</b>	<b>Eletroforese de Proteínas (SDS-PAGE)</b> .....	39
<b>4.3.3</b>	<b>Lise Celular</b> .....	42
<b>4.3.4</b>	<b>Ligação de Íons e Proteína inespecífica ao Suporte</b> .....	43
<b>4.3.5</b>	<b>Purificação e Imobilização da Enzima</b> .....	43
<b>4.3.6</b>	<b>Atividade Hidrolítica da Enzima em Solução Aquosa</b> .....	44
<b>4.3.7</b>	<b>Atividade Funcional da Enzima em Meio Orgânico</b> .....	44
4.4	MÉTODOS EXPERIMENTAIS .....	45
<b>4.4.1</b>	<b>Expressão Heteróloga das Lipases de <i>Pseudozyma antarctica</i> modificadas</b> .....	45
<b>4.4.2</b>	<b>Crescimento da Lipase em reator com alta densidade celular</b> .....	46
<b>4.4.3</b>	<b>Lise celular e Isolamento de Lipases dos Corpos de Inclusão (CI)</b> .....	48
<b>4.4.4</b>	<b>Purificação e Imobilização das Enzimas em passo único</b> .....	49
4.4.4.1	Preparação dos Suportes contendo Resinas do grupo Amberlite .....	49
4.4.4.2	Testes de Ligação de Íons e Proteína inespecífica ao Suporte com Resinas do grupo Amberlite .....	49
4.4.4.3	Utilização das Colunas no Processo de Purificação e Imobilização enzimática .....	50
4.5	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	51

4.5.1	<b>Ensaio da Atividade Funcional da Lipase B de <i>Pseudozyma antarctica</i></b> .....	51
4.5.1.1	Ensaio da Atividade Hidrolítica da Lipase em Solução aquosa .....	51
4.5.1.2	Ensaio da Atividade Lipolítica em Meio orgânico .....	52
4.5.2	<b>Determinação da Concentração de Proteína</b> .....	52
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
5.1	<b>PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA</b> .....	54
5.1.1	<b>Prospecção Tecnológica do Processo de Purificação e Imobilização enzimática em Resinas de Troca iônica</b> .....	54
5.2	<b>ANÁLISE DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA LIPASE B DE <i>Pseudozyma antarctica</i> MODIFICADA E SEUS POSSÍVEIS INTERFERENTES</b> .....	63
5.3	<b>LIGAÇÃO E RETENÇÃO DE ÍONS METÁLICOS E PROTEÍNAS INESPECÍFICAS AO SUPORTE AMBERLITE</b> .....	64
5.3.1	<b>Ligação e Retenção de Íons de Níquel e Cobalto às resinas Amberlite</b> .....	64
5.3.2	<b>Ligação e Retenção de Proteínas inespecífica às resinas Amberlite</b> .....	68
5.3.3	<b>Cruzamento das taxas de carregamento e ligação dos íons divalentes e proteína inespecífica nas Resinas Amberlite</b> .....	70
5.4	<b>PURIFICAÇÃO DE PALB NA RESINA AMBERLITE IRN77</b> .....	72
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	76
7	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse em torno das pesquisas a cerca do aprimoramento dos processos de imobilização e produção de biocatalisadores tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Relativamente comum no mercado industrial, o uso de enzimas abrange diversos setores, entre esses, alimentício, de detergentes, biodiesel e especialidades químicas (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006; FARIA, 2010; MENDES *et al.*, 2011; MESSIAS *et al.*, 2011).

Grande parcela do mercado industrial ainda está direcionada para o emprego de catalisadores químicos. No entanto, muitas são as limitações encontradas neste processo industrial. Diferentemente das enzimas, os catalisadores químicos são pouco versáteis, exigem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reações, possuem baixa especificidade e geralmente fornecem produtos de composição química mista ou contaminados. (CASTRO, OLIVEIRA e SOARES, 1997; MENDES *et al.*, 2011; FIAMETTI, 2012). Fáceis de controlar e eficientes energeticamente, o uso tecnológico das enzimas é vantajoso por uma série de propriedades que as tornam altamente requisitadas como catalisadores: obtenção de produtos altamente puros; alta eficiência catalítica; condições brandas de temperatura e pressão atmosférica; alta taxa de seletividade e especificidade (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004; DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004; SOUZA, 2010; BORTOLAZZO, 2011; COLEN, 2006; SILVA, 2012), além de redução no consumo de energia e da extensão da degradação térmica (HOUDE, KADEMI e LEBLANC, 2004; HASAN, SHAH e HAMEED, 2006).

O grupo com maior potencial para aplicações biotecnológicas consiste das enzimas lipolíticas que se tornam atrativas pela ampla disponibilidade e facilidade de uso por não necessitar de cofatores (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004; GRIS, 2010). Dividido em dois tipos: lipases e esterases, esse grupo de enzimas é facilmente encontrado na natureza e está associado ao metabolismo e à hidrólise dos lipídeos. As lipases agem especificamente na interface óleo/água e podem ser definidas como hidrolases que atuam sobre ligações éster presentes em gliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, capazes de catalisar diversos tipos de reações em meios aquosos como de hidrólise e não aquoso como a esterificação e transesterificação (GONÇALVES, 2007; GRIS, 2010; MOURA *et al.*, 2013; MULLER, 2013).

Embora as lipases sejam bastante estudadas e possam ser produzidas em larga escala, ainda têm sido relativamente pouco empregadas industrialmente (GONÇALVES, 2007). Mesmo que sua utilização em escala industrial venha ser menor do que em escala laboratorial, sua versatilidade e alta capacidade enantiosseletiva as tornam muito atrativas para as indústrias, principalmente química e farmacêutica. Ainda assim, existem limitações para a expansão da aplicação de lipases tanto em escala laboratorial, quanto industrial. A recuperação e reutilização da enzima e a utilização em meios não-convencionais, tais como solventes orgânicos, está entre os principais fatores que impedem a utilização de biocatalisadores enzimáticos (MOURE, 2009). Com o intuito de aumentar a atividade catalítica das enzimas industriais, incluindo as lipases, vários procedimentos de imobilização são empregados envolvendo diferentes graus de complexidade e eficiência (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

A imobilização é uma técnica que consiste em manter as características físicas do suporte retendo a atividade biológica da enzima na sua forma solúvel. O complexo enzima-suporte permite a condução de reações em reatores contínuos, facilitando a separação do catalisador-produto e proporcionando o aumento da produtividade dos processos, com uma redução dos custos (CASTRO *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2011).

Os processos de imobilização ainda encontram barreiras em seu uso industrial e isso se deve principalmente ao custo dos suportes e reagentes, baixa eficiência dos métodos de imobilização e baixa estabilidade operacional da enzima imobilizada. Para viabilizar o uso industrial é necessário otimizar parâmetros como o custo da imobilização com a aquisição de suportes mais resistentes e baratos e tornar a enzima operacionalmente e funcionalmente mais estável (CASTRO *et al.*, 2008).

Com essa pesquisa pretende-se contribuir para o desenvolvimento de processos de purificação e imobilização enzimática em escala industrial utilizando como modelo a enzima lipase B da *Pseudozyma antarctica* que é utilizada em muitas aplicações industriais devido à sua alta enantiosseletividade, grande variedade de substratos, estabilidade térmica e estabilidade em solventes orgânicos.

## 2. OBJETIVO

❖ Este trabalho propõe desenvolver um processo adequado de purificação e imobilização em passo único de enzimas recombinantes, aplicáveis à produção industrial utilizando-se a enzima Lipase B de *Pseudozyma antarctica* como modelo.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar através da prospecção tecnológica, o estado atual do desenvolvimento científico e tecnológico de biocatalisadores purificados e/ou imobilizados através do levantamento de patentes existentes;
- Avaliar a atividade funcional das lipases em meio aquoso;
- Avaliar a ligação de  $Ni^{2+}$  e  $Co^{2+}$  em resinas comerciais ligadoras de íons divalentes da família Amberlite;
- Avaliar a ligação inespecífica de proteínas às resinas selecionadas tanto na presença quanto na ausência de  $Ni^{2+}$  e  $Co^{2+}$ ;
- Avaliar a interação das resinas selecionadas carregadas com  $Ni^{2+}$  ou  $Co^{2+}$  com a enzima recombinante (lipase B de *Pseudozyma antarctica*) transformada com cauda de hexahistidina;
- Comparar a atividade hidrolítica funcional das lipases purificadas e/ou imobilizadas nas diferentes combinações de resinas e íons em relação com a forma livre da mesma enzima;
- Avaliar efeitos de parâmetros físico-químicos, como pH, temperatura, concentração de proteína, etc, na ligação da enzima ao suporte e sobre a atividade da enzima imobilizada.
- Avaliar a viabilidade técnica e econômica da produção de biocatalisadores utilizando o processo de purificação e imobilização simultâneas da enzima estudada em comparação com os métodos estabelecidos no estado da técnica.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. ENZIMAS:

Enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por longas cadeias de aminoácidos, presentes em todos os organismos vivos, que desempenham a função de um catalisador ao atuar reduzindo a barreira energética das reações e acelerando os processos metabólicos no interior das células vivas, sendo capazes de agir do mesmo modo fora das células (KIELING, 2002; DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004; OLIVEIRA, 2010). Apresentam propriedades que tornam o seu uso altamente desejável como catalisadores, como alta atividade catalítica e seletividade específica sobre o substrato (LEHNINGER, NELSON e COX, 1995; BORGES, 2012)

Assim como outras proteínas, as enzimas possuem peso molecular variando entre 12 000 até mais de 1 000 000. Possuem diferentes formas e papéis biológicos devido a sua estrutura terciária e quaternária que é dotada de dobramentos tridimensionais nas cadeias polipeptídicas. Cada enzima é formada por um grupo de resíduos de aminoácidos podendo, ou não, requerer um componente químico adicional chamado cofator. Cada um também possui uma região que se liga ao substrato e confere os grupamentos catalíticos que participarão da geração e quebra de ligações. Essa região é conhecida por sítio ativo (LEHNINGER, NELSON e COX, 1995; STRYER, 1996; MAIOLINI, 2009).

Existem seis tipos principais de classificação para as enzimas. Cada uma delas aceita um determinado substrato e catalisa uma reação em particular, e podem ser classificadas de acordo com a União Internacional de Bioquímica como: Oxidoredutases, Transferases, Liasas, Isomerasas, Hidrolases, e Ligases. As Oxidoredutases catalisam reações de oxido-redução envolvendo oxigenação ou adição total de átomos equivalente de hidrogênio. Já as transferases mediam a transferência de grupos, tais como acil, fosforil e aldeído ou radicais de cetona a partir de uma molécula para outra. As Liasas catalisam reações de adição ou reversas enquanto as Isomerasas realizam a migração de duplos carbonetos ou funções de oxigênio, racemização e rearranjos. Já as Hidrolases promovem a hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, éteres peptídeos e outras funções contendo C-N, hidratação de ligações C=C. Por último as Ligases, que medeiam a formação de ligações éster fosfato (CASTRO e ANDERSON, 1995).

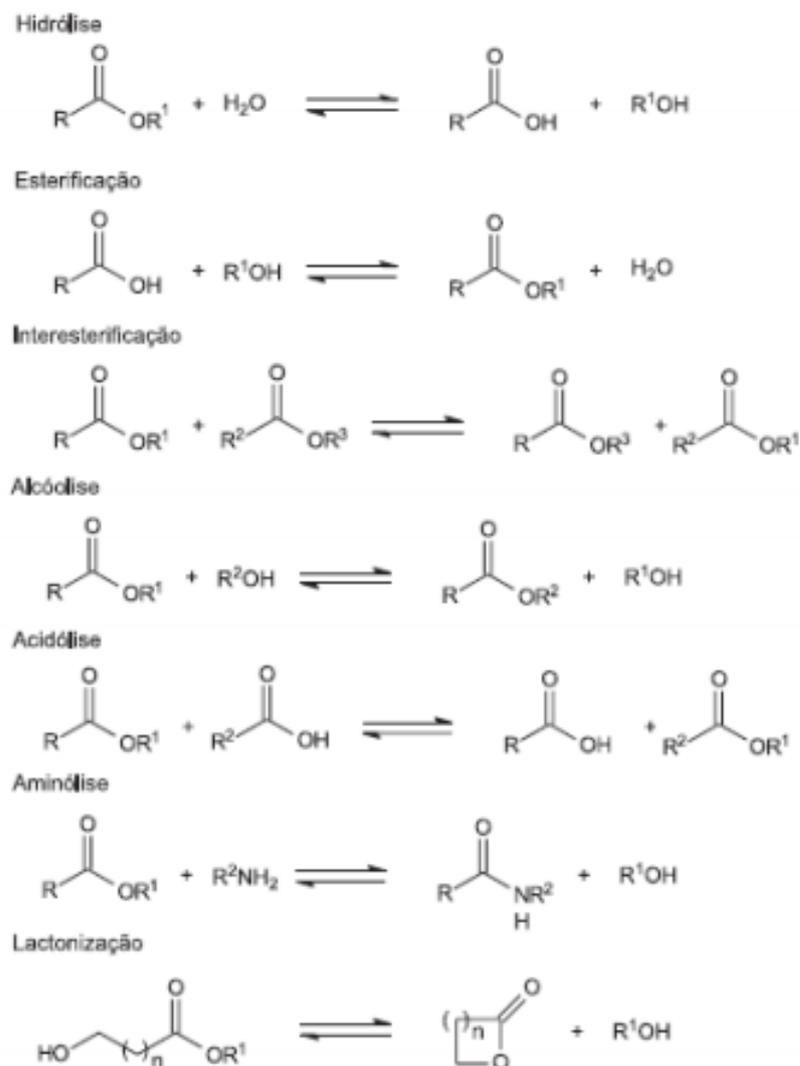
Dentre os biocatalisadores, as enzimas hidrolases são as mais empregadas nos processos de biotransformação industrial. Elas correspondem a 80% do consumo mundial quando comparada com a utilização de todos os grupos de enzimas. As Lipases se destacam nesse grupo, devido a características como: (I) serem estáveis em solventes orgânicos, (II) não requer cofator, (III) possuir especificidade a diferentes substratos e, (IV) apresentarem alta enantiosseletividade (MOURE, 2009).

A demanda mundial desses catalisadores engloba diferentes setores industriais podendo ser utilizadas para diferentes finalidades. Apenas na América Latina, a demanda de enzimas corresponde a 3,4% da demanda mundial, sendo o Brasil o país mais expressivo desta região com 60% do consumo de enzimas. Em termos mundiais, o Brasil já representava 2,4% do mercado no ano de 2006. Os fatores que dificultam uma maior expansão da produção de enzimas no Brasil e a sua colocação no mercado interno e externo está diretamente relacionado ao limitado desenvolvimento tecnológico, que se reflete na qualidade de variados produtos exportados pelo Brasil (POLITZER e BON, 2006; MAIOLINI, 2009).

### **3.1.1. Lipases**

As Lipases (triacilglicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas carboxilesterases que catalisam tanto a hidrólise de triacilgliceróis quanto a síntese de acilgliceróis de cadeia longa, liberando ácidos graxos e glicerol (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999; COLEN, 2006; MOURE, 2009). A sua catálise pode ser por hidrólise parcial ou total do triacilglicerol a diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos. Apresentam a capacidade única de agir apenas na interface óleo/água e, desempenham um papel fundamental no metabolismo dos lipídios podendo ainda, em meios reacionais com restrição de água, catalisar outros tipos de reações, a exemplo da alcoólise ou transesterificação (CARVALHO *et al.*, 2003; PAQUES e MACEDO, 2006; LOTTI e ALBERGHINA, 2007; SOUZA, 2010; FIAMETTI, 2012). A Figura 1 ilustra as principais reações catalisadas por lipases.

**Figura 1** – Reações químicas catalisadas por lipases.



Fonte: PAQUES e MACEDO, 2006.

Distribuídas em toda natureza, são encontradas em organismos vivos como animais, vegetais e micro-organismos. Nos animais, as lipases estão envolvidas com o metabolismo de lipídeos, e nas plantas, são encontradas em tecidos de reserva energética. O grupo de lipases microbianas é o mais utilizado para os interesses tecnológicos já que apresenta uma maior variedade, rápido crescimento, facilidade no controle, possibilidade de recombinações por manipulação genética e redução do seu custo de obtenção. (COLEN, 2006; HASAN, SHAH e HAMEED, 2006; FARIA 2010; SOUZA, 2010).

Pertencentes à classe das Hidrolases, não necessitam de cofatores para que possam atuar. Além disso, a ação dessas enzimas, além da natural, é uma reação

reversível, logo o equilíbrio pode ser alterado pela variação de concentração, reagente ou produto (CASTRO e ANDERSON, 1995; SILVA, 2012).

O grau de eficiência catalítica das lipases depende das propriedades físico-químicas da enzima, e conseqüentemente, da sua origem. Como biocatalisadores, apresentam vantagens importantes sobre os catalisadores químicos, como a especificidade, a regioseletividade e a enantioseletividade, que permitem a catálise de reações com um número reduzido de coprodutos e sob condições brandas de temperatura e pressão (PAQUES e MACEDO, 2006; LOTTI e ALBERGHINA, 2007; SOUZA, 2010).

A enorme potencialidade de aplicação das lipases e as características diferenciadas destas enzimas, variável entre micro-organismos e mesmo entre espécies, justificam a procura por novas linhagens produtoras bem como a caracterização da enzima produzida (COLEN, 2006).

#### 3.1.1.1. Lipase B de *Pseudozyma antarctica*

Dois tipos diferentes de lipase são produzidas pela levedura *Pseudozyma antarctica* basidiomicetos (conhecida anteriormente como *Candida antarctica*), nomeadas A e B. A Lipase B de *Pseudozyma antarctica* (PALB) é uma enzima extracelular, da superfamília de  $\alpha/\beta$  hidrolases, formada por uma estrutura de 317 aminoácidos, peso molecular de 30 a 33kDa, ponto isoelétrico (PI) igual a 6, tendo algumas das suas principais características representadas na Figura 2.

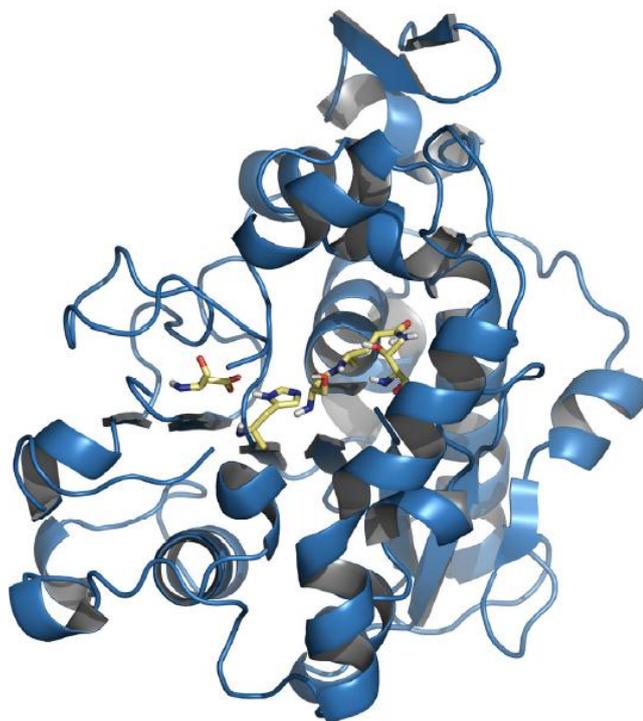
**Figura 2** – Características da Lipase B de *Pseudozyma antarctica*.

Peso molecular (kDa)	33
Ponto isoelétrico (pI)	6,0
pH ótimo	7
Atividade específica (IU/mg)	435
Termoestabilidade a 70°C <sup>a</sup>	15[0]
pH estabilidade <sup>b</sup>	7-10
Ativação interfacial	Não
Especificidade posicional para triacilglicerol	1-3 específica

<sup>a</sup> Uma atividade residual após incubação a 60°C em tampão tris 0,1 M (pH 7.0) por 20 min e 120 min. <sup>b</sup> pH no qual a atividade maior que 75% é mantida após incubação de 20h em temperatura ambiente.

Pertencente ao grupo das carboxiesterases, essa enzima é muito versátil. Possui alta termoestabilidade e elevado grau de seletividade, sendo altamente enantiosseletiva na resolução de inúmeros compostos opticamente ativos como aminas, ácidos e álcoois, e regiosseletiva na síntese de monoésteres de hidratos de carbono. Possui uma grande área de uso com elevada atividade catalítica em sínteses químicas (SUN et al., 2010; ALMEIDA, 2011; MANOEL, 2011; URSOIU et al., 2012; VÉRAS, 2012). A estrutura tridimensional está representada na Figura 3.

**Figura 3** – Estrutura cristalina de *PALB* com os aminoácidos que compõem a tríade catalítica.



Fonte: Protein Data Bank [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) (UPPENBERG et al., 1994).

A maioria das lipases apresenta ativação interfacial. No entanto, a tampa anfifílica que cobre os sítios ativos de *PALB* não está diretamente relacionada com a ativação interfacial (ALMEIDA, 2011; VÉRAS, 2012). O sítio ativo é constituído pela tríade catalítica Ser105-Asp187-His224, composta pelos aminoácidos serina, ácido aspártico e histidina (MANOEL, 2011; ALMEIDA, 2011; VÉRAS, 2012). O acesso ao sítio ativo é feito por um canal estreito que contém uma pequena hélice com grande mobilidade (MANOEL, 2011; VÉRAS, 2012).

A Lipase B de *Pseudozyma antarctica* (*PALB*) destaca-se por apresentar atividade em soluções aquosas e em meios orgânicos. É considerada um dos principais biocatalisadores utilizados em síntese orgânica, tanto em escala laboratorial quanto industrial. Isso se faz pela ampla capacidade dessa enzima em hidrolisar diferentes substratos e sua tolerância a diferentes meios aquo-restritos e resistência à desativação térmica (ALMEIDA, 2011; VÉRAS, 2012). É encontrada no mercado na forma livre ou imobilizada através de ligações iônicas em um suporte inerte. Atualmente, um dos principais fatores limitantes do uso industrial de *PALB* é o custo elevado do catalisador imobilizado disponível comercialmente, Novozym 435. O uso desse produto imobilizado é geralmente destinado para finalidades onde o custo é menos importante do que o desempenho e a pureza do catalisador. O desenvolvimento de um catalisador imobilizado com custos mais baixos pode ser disponibilizado e, conseqüentemente, aplicado em novos processos industriais como na produção de biodiesel ou outros ésteres simples usados em grande quantidade (SUN et al., 2010; MANOEL, 2011).

### 3.2. APLICAÇÃO DE ENZIMAS PARA FINS INDUSTRIAIS:

O estágio atual da indústria de enzimas é resultante de um rápido desenvolvimento acontecido inicialmente nas quatro décadas passadas, graças à evolução da biotecnologia moderna. O desenvolvimento dos processos fermentativos, acontecido no final do último século, concentrou-se especificamente na produção de enzimas pelo uso de linhagens microbianas produtoras selecionadas. Isso tem permitido a obtenção de enzimas bastante purificadas e preparações bem caracterizadas mesmo quando produzidas em larga escala. O uso da tecnologia do DNA recombinante impulsionou os processos de manufatura permitindo a comercialização de enzimas que até então não eram produzidas. Enfim, mais recentemente, a introdução da engenharia de proteínas e da técnica da evolução direta tem revolucionado o desenvolvimento do setor de enzimas industriais. Estes avanços têm possibilitado a produção de enzimas sob medida, apresentando atividades novas e adaptadas às novas condições de processo, o que tem provocado a expansão de seus usos industriais (COLEN, 2006).

As Lipases microbianas apresentam um amplo espectro de aplicações industriais, uma vez que são mais estáveis que as lipases animais e vegetais, além

de poderem ser produzidas com menor custo, com alta velocidade de síntese, com grande versatilidade, e com maior simplicidade na manipulação ambiental e genética da capacidade produtiva dos micro-organismos (CIHANGIR E SARIKAYA, 2004; ELLAIAH *et al.*, 2004; FARIA, 2010). São, em sua maioria, extracelulares, fato que facilita sua extração, seu isolamento e sua purificação (CARVALHO *et al.*, 2003; FARIA, 2010).

Transformações químicas catalisadas por enzimas são alternativas de grande potencial de aplicação na indústria de alimentos, na indústria farmacêutica e na área de química fina, tornando-se um mercado crescente e promissor, movimentando um valor estimado em cerca de US\$ 3,6 bilhões por ano. Sabe-se que mais de 500 tipos de enzimas garantem 50 aplicações biotecnológicas para diversos segmentos econômicos como curtumes, papel e celulose, têxtil e na indústria de alimentos, entre outros (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006; BORGES, 2012).

Uma das áreas que a catálise enzimática tem se tornado uma alternativa promissora é na produção industrial de biodiesel. Apesar da catálise química em meio alcalino ainda prevalecer como rota tecnológica, a catálise enzimática tem despertado o interesse nos setores acadêmico e industrial por apresentar vantagens na baixa quantidade de resíduos finais produzido, o que contribui no custo final de produção que passa a ser seis a doze vezes menor do que na catálise química que necessita do tratamento de efluentes (LEUNG, WU e LEUNG, 2010; POLITZER e BON, 2006; SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS, 1998; SOUZA, 2010; STOYTCHEVA *et al.*, 2011).

Considerando o crescimento da utilização desse biocombustível em âmbito nacional, o emprego da rota enzimática na produção do biodiesel é de relevante importância (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004). Segundo Politzer e Bon (2006), a produção de enzimas e o desenvolvimento de um sistema de lipases imobilizadas são recomendados para esse segmento industrial, já que, em uma visão mais promissora de produção nacional de biodiesel por meios enzimáticos, o consumo de enzimas, principalmente lipase, poderá alcançar 517 toneladas anuais com um custo de importação em torno de US\$ 52 milhões.

O mercado global da indústria de enzimas abrange outros setores como produtos alimentícios, detergentes, têxteis e tratamento de couro. No setor alimentício, destaca-se a aplicação de enzimas na produção de alimentos

fermentados, edulcorantes, etanol de cereais, produtos lácteos, sucos de frutas, e em cervejarias e panificação (PIZARRO E PARK, 2003; CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004; FARIA, 2010).

### 3.3. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA:

Enzimas na sua forma livre têm sido usadas por séculos na produção industrial. A grande desvantagem da utilização de enzimas na forma solúvel é a sua relativa instabilidade, sua separação para posterior aplicação, o alto custo de isolamento, assim como a contaminação do produto desejado, pois enzimas são compostos solúveis em água. Desta forma, técnicas de imobilização têm sido empregadas tendo como principais objetivos o aumento da estabilidade operacional e reutilização das enzimas (BRENA e BATISTA-VIERA, 2006; CASTRO *et al.*, 2008).

O termo 'enzima imobilizada' foi proposto por Katchalski-Katzir em 1971, para indicar uma enzima fisicamente confinada ou localizada numa certa região, com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser usada repetida e continuamente. A partir da década de 1960 a tecnologia enzimática despontou com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos, ocorrendo também, um aumento explosivo em publicações (LIMA e ANGNES, 1999; ZANIN e MORAES, 2004; BRENA e BATISTA-VIERA, 2006; CASTRO *et al.*, 2008), que vem desde então, relacionando uma série de vantagens e razões para a escolha de biocatalisadores imobilizados, além do método ideal que deve ser empregado.

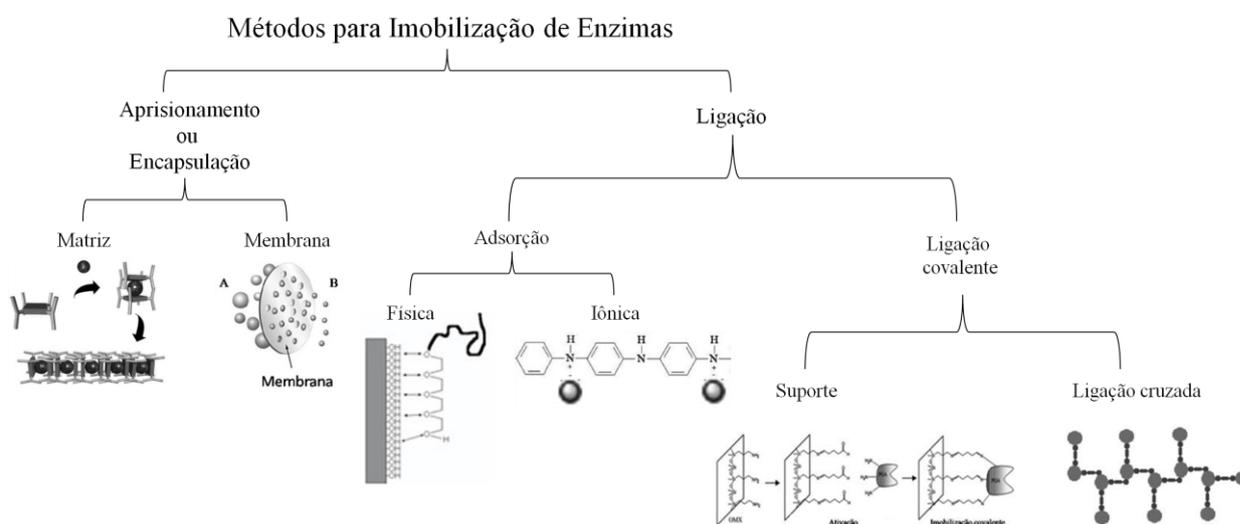
A imobilização de enzimas amplia consideravelmente a utilização desses biocatalisadores em meios reacionais. Por ser solúvel em água, a enzima livre e solúvel só tende a ser utilizada em meios reacionais que utilizem o método de batelada, já que a maior parte das enzimas é considerada instável para uso prolongado em reatores. Com isso, a imobilização torna-se atrativa por permitir a modificação das enzimas de forma a torná-las insolúveis em água; a utilização de enzimas na forma solúvel em reatores equipados com membranas de ultrafiltração, que permitem o escoamento dos produtos da reação, porém retendo a enzima no interior do reator e; a restrição da mobilidade da enzima pela ligação à outra molécula, que torna o sistema insolúvel no meio reacional. Além disso, esta estratégia também é uma importante ferramenta para estabilizar e reduzir a

inativação por distorção da sua estrutura nativa por influência da temperatura, pH e de solventes orgânicos, o que pode ser atrativo para a aplicação de enzimas no setor industrial (ZANIN e MORAES, 2004; CASTRO *et al.*, 2008).

Cada sistema de enzima imobilizada apresenta características únicas dependentes de fatores como fonte de enzima, tipo de suporte, método de imobilização e interação da enzima-suporte. Basicamente falando, a técnica de imobilização enzimática resume na escolha de um suporte e do método de imobilização nesse suporte, que resulte num preparado imobilizado ativo e estável (BRENA e BATISTA-VIERA, 2006; CASTRO *et al.*, 2008).

As enzimas podem ser imobilizadas por diferentes métodos, conforme visualizado na Figura 4. Podem ser encapsuladas, adsorvidas em materiais insolúveis como resinas de troca iônica, copolimerizadas com algum monômero ou se ligar a uma matriz insolúvel por ligações covalentes (PAULA, BARBOZA e CASTRO, 2005; CASTRO *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2010).

**Figura 4** – Principais Métodos de Imobilização enzimática.



Fonte: ADAPTADO (FERNANDES, LIMA e LOPES, 2010; MADALOZZO, 2013).

Dentre os métodos disponíveis, a adsorção é um dos mais simples e mais empregado. Isso se dá pelo fato de ser menos custoso e, principalmente, por auxiliar na preservação da estrutura conformacional da enzima, o que irá influenciar diretamente na retenção da sua alta atividade catalítica (Figura 5). Nesse caso, o

biocatalisador é estabilizado no suporte por interações hidrofóbicas fracas, como forças de van der Waals, por pontes de hidrogênio ou por ligações iônicas. Sua principal desvantagem está na possível dessorção da enzima do suporte devido a variações de temperatura, pH e força iônica (BRUNO, 2004; PAULA, BARBOZA e CASTRO, 2005; CASTRO *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2010).

**Figura 5** – Representação comparativa entre as formas da Lipase após diferentes formas de imobilização.



Fonte: PALOMO *et al.*, 2002.

No entanto, a maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte. Grande é o número de matrizes encontradas, englobando materiais orgânicos e inorgânicos, naturais ou sintéticos (TISCHER, 1999; ZANIN e MORAES, 2004; BRENA e BATISTA-VIERA, 2006; CASTRO *et al.*, 2008). Apesar da existência de suportes baratos, como polímeros e minerais naturais, a utilização de enzimas imobilizadas tem exigido a elaboração de matrizes específicas, que resultem em preparados imobilizados com elevadas atividades e características hidrodinâmicas adequadas ao uso em reatores (CASTRO *et al.*, 2008).

O suporte precisa ser criteriosamente selecionado, pois se por um lado pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, de outro pode afetar adversamente não só na estabilidade térmica, mas no desempenho global do sistema quando erroneamente escolhido. Na seleção do suporte, devem ser avaliadas as propriedades físico-químicas, além da capacidade de regeneração do material. As principais características a serem observadas são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e

composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, biocompatibilidade, resistência mecânica e custo (BRUNO, 2004; PAULA, BARBOZA e CASTRO, 2005; BRENA e BATISTA-VIERA, 2006; CASTRO *et al.*, 2008).

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização enzimática, não há um método eficientemente aplicável a todas. Os procedimentos ainda tendem a ser bastante demorados além de acarretarem limitações difusionais e custos adicionais. Portanto, é necessário conhecer previamente o processo mais simples e menos custoso para a aplicação do seu tipo de enzima que lhe resulte um derivado com alta estabilidade operacional e boa retenção da atividade enzimática (LIMA e ANGNES, 1999; CASTRO *et al.*, 2008; MALVESSI, 2008; GUIDINI, SHAH e HAMEED, 2009; MENDES *et al.*, 2011).

#### 3.4. RESINAS DE TROCA IÔNICA:

O processo de troca iônica é um fenômeno de difusão, reversível, que se dá pela troca de íons de uma solução por um ou mais íons de carga igual adsorvidos em uma partícula sólida inerte até a equiparação das cargas iônicas. Esta fase sólida, também conhecida como trocador de íons, é insolúvel, possui cargas elétricas positivas ou negativas e apresentam diferentes formas e estruturas, podendo ser constituídos de material inorgânico natural ou uma resina orgânica sintética, o que mostrará os diferentes comportamentos dos íons. Dentre esses trocadores, as resinas de troca iônica são as mais utilizadas (HARLAND, 1994; DINIZ, 2000; CHEPCANOFF, 2001; MELO, 2006).

No mercado atual, muitos são os tipos de resinas de troca iônica disponíveis, as quais são classificadas de acordo com três características fundamentais (SANTOS, 2006; SHEK *et al.*, 2009; FRANCO, 2011):

- a) Composição da matriz polimérica funcional;
- b) Grupamento iônico;
- c) Características físico-químicas.

Basicamente, as resinas trocadoras de íons variam em dois tipos estruturais quanto à constituição da sua matriz, podendo estas ser formadas por material em

gel ou macrorreticular. A matriz polimérica apresenta forma tridimensional e uma estrutura homogênea e contínua (MORAIS, 1993; MELO, 2006).

As resinas microporosas, ou tipo gel, são caracterizadas por cadeias individuais interconectadas onde os tamanhos dos canais e poros são pequenos. Apresentam aspecto de esferas transparentes e rígidas e, sua matriz polimérica é tridimensional com estrutura homogênea e contínua. Essas resinas são compostas por 12% de poliestireno e mais de 12% de agente reticulante, o que caracteriza a matriz uma grande resistência ao inchamento. Essa é uma das características das resinas gelatinosas que limitam o seu uso na catálise. Em função dos limites apresentados por essa resina, surgiram as resinas macroporosas ou macrorreticulares (MORAIS, 1993; MELO, 2006).

O tipo de resina macroporosa é formado por estruturas heterogêneas compostas por dezenas de microesferas conectadas entre si, formadas por microporos e macroporos intercalados, formando uma estrutura de alta resistência mecânica no formato de esferas opacas e rígidas. Essa estrutura proporciona a essa resina uma área superficial grande que permite uma melhor alocação dos sítios catalíticos no interior destas superfícies. Essas características permitem o uso dessas resinas em catálises (MORAIS, 1993; MELO, 2006).

Em geral, a matriz polimérica é formada por uma cadeia de hidrocarbonetos de alto peso molecular, insolúvel, irregular, macromolecular e elástica, sendo as mais comuns no mercado, as resinas resultantes da copolimerização de estireno e divinilbenzeno (CHEPCANOFF, 2001; MENDES, 2005; SANTOS, 2006; SHEK *et al.*, 2009; FRANCO, 2011). A matriz hidrocarbônica apresenta grupos iônicos funcionais positivos e negativos firmemente ligados, os quais são compensados por íons de sinais contrários. Além disso, é formada por uma estrutura capaz de oferecer a máxima resistência a oxido-redução, desgaste mecânico, além de serem insolúveis nos solventes comuns e apresentarem formas com propriedades hidráulicas apropriadas (MENDES, 2005).

A classificação da resina dependerá da natureza dos grupos iônicos fixados à matriz polimérica. Podem ser classificadas como resinas trocadora de cátions (catiônicas) ou trocadora de ânions (aniônicas) (MENDES, 2005; SANTOS, 2006).

As resinas catiônicas são as mais usadas comercialmente e dependendo do grau de acidez do grupo funcional, podem ser de ácidos fortes ou fracos (MENDES, 2005). Caracterizadas por uma matriz negativa de grupos funcionais ácidos, apresentam a capacidade de trocar cátions com os grupamentos iônicos fixados à matriz. As resinas catiônicas mais usadas são as sulfônicas (forte) e carboxílicas (fraco).

Já as resinas aniônicas são formadas por uma matriz positiva de grupo funcional básico que também podem ser de bases fortes ou fracas, a depender do seu grau de basicidade (MENDES, 2005).

A capacidade de troca iônica das resinas são intrinsecamente influenciadas pela variação do pH, do tipo do solvente ou eluente, da temperatura, da natureza da resina, do tamanho da partícula, além de outras variáveis (CHEPCANOFF, 2001). Os trocadores iônicos ácidos e básicos fortes, por exemplo, tendem a ser totalmente ionizáveis em uma larga faixa de pH, enquanto que os trocadores iônicos ácidos e básicos fracos têm o grau de dissociação diretamente influenciado pelo pH (MELO, 2006).

Além dos trocadores de cátions e ânions, a matriz pode ser funcionalizada por grupos quelantes capazes de complexar metais. Essas resinas foram desenvolvidas com o intuito de suprir a falta de seletividade das resinas de troca iônica convencionais. Elas recuperam seletivamente os metais de transição presentes na solução, uma vez que formam complexos quelantes altamente estáveis ou quelatos metálicos com estes cátions. Isto porque, o processo de adsorção se dá pela formação de um complexo entre o grupo quelante da resina e o metal a ser adsorvido, formando um processo de separação mais efetivo (MENDES, 2005; MELO, 2006).

Resinas quelantes podem ser conceituadas como copolímeros com grupos funcionais covalentemente ligados em cadeias laterais que contêm um ou vários átomos doadores que podem formar ligações coordenadas com a maioria dos íons metálicos (MENDES, 2005; MELO, 2006). São formadas pelo mesmo tipo de matriz estireno-divinilbenzeno como as resinas catiônicas e aniônicas. Entretanto, essas resinas contêm grupos ativos que estão diretamente fixados à matriz estireno e fornecem alta afinidade para cátions polivalentes de metais pesados (MENDES, 2005).

As resinas sintéticas são de grande utilidade em diferentes processos industriais. Em geral, a importância dessas resinas é justificada pela sua capacidade de adsorção, resistência química e mecânica, altas taxas de troca iônica e pela ampla possibilidade de variação de suas propriedades em razão da natureza sintética. Sua comercialização é oferecida em grau padrão, cromatográfico e analítico, devendo satisfazer os requisitos de insolubilidade, estabilidade química, capacidade de troca iônica e difusão, necessários para o processo requerido (CHEPCANOFF, 2001; MENDES, 2005).

### **3.4.1. Resinas do Grupo Amberlite:**

As resinas da série Amberlite começaram a ser comercializadas em 1967, sendo os primeiros adsorventes poliméricos macrorreticulares no mercado. Em 2009, a empresa *Rohm and Haas Company*, então produtora das resinas, foi comprada pela *Dow Chemical Company*, a qual continua até os dias atuais produzindo as resinas da série Amberlite da *Rohm and Haas* (HUBBARD, FINCH e DARLING, 1998; FREITAS, 2007; DOW, 2013).

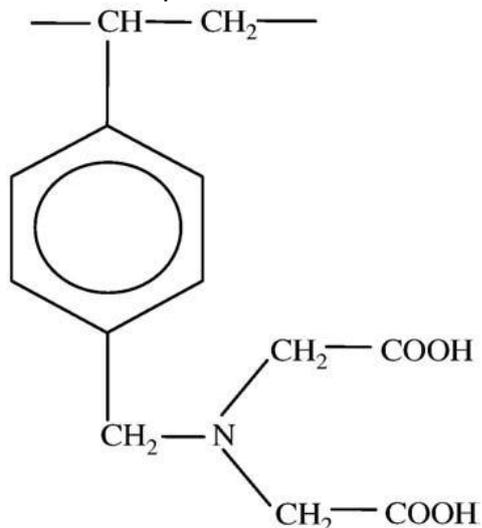
Apesar de atualmente existirem vários tipos de resinas poliméricas, as resinas da série Amberlite são muito utilizadas na impregnação de reagentes, reações de funcionalização ou remoção de substâncias, aditivos no processo de fabricação de plásticos, remoção de poluentes orgânicos, compostos polares, apolares, não aromáticos, aromáticos e na indústria farmacêutica. Além disso, essas resinas têm sido modificadas física ou quimicamente com ligantes com o intuito de obter novos materiais, pré-concentrar ou separar metais e impurezas (FREITAS, 2007; DOW, 2013).

#### **3.4.1.1. Propriedades e Aplicações das resinas Amberlite IRC748, 200C e IRN77:**

Dentre os três tipos de resinas Amberlite utilizadas neste trabalho, a mais citada na literatura é a Amberlite IRC748. Essa resina possui propriedade quelante de troca catiônica com alta seletividade para cátions de metais pesados. A seletividade dessa resina é alcançada pelo seu grupo funcional, o ácido iminodiacético, ligado a uma matriz macrorreticular de estireno-divinilbenzeno (Figura 6). Por apresentar excelente desempenho cinético e ser altamente seletiva para

metais, a Amberlite IRC748 pode remover metais de soluções, mesmo na presença de altas concentrações de sais de sódio ou de cálcio. A estrutura macrorreticular da IRC748 é altamente resistente a choque osmótico e possui uma excelente estabilidade física, podendo operar em até 90°C com pH variando entre 1.5 a 14 (MENDES, 2005).

**Figura 6** – Estrutura química da resina quelante Amberlite IRC748



Fonte: ZAINOL e NICOL, 2009

A resina Amberlite IRC748 é adequada para usos industriais e podem ser utilizadas em diversos procedimentos como na purificação de salmoura na indústria alcalina, indústria eletrônica, indústria de galvanização, purificação de processos contendo vestígios de metais e recuperação de metais pesados a partir de fluxos de lixiviação hidrometalúrgicas (MENDES, 2005).

Essa resina foi utilizada por Almeida *et al.* (2004) para verificar a capacidade de carregamento da Amberlite IRC748 para extração de Ni e Co do efluente, visando a reutilização do líquido no processo industrial. Essa resina também foi utilizada com a finalidade de adsorver principalmente Zinco e Cádmo presentes no efluente de uma usina permitindo a sua reutilização no processo industrial (MELO, 2006).

Em sua tese de Doutorado, Mendes (2005) verificou os efeitos do carregamento de níquel na estrutura química da resina IRC748. A autora examinou o processo de adsorção do Ni<sup>2+</sup> no grupamento funcional da resina visando sua aplicação à solução na lixiviação sulfúrica. Essa resina é citada como uma das três

principais resinas quelantes utilizadas na recuperação de níquel nos ensaios em batelada com um rendimento superior a 99%. Além disso, a seleção da resina Amberlite IRC748 pela autora, foi empregada em processos de adsorção de níquel e cobalto a partir da lixiviação ácida de alta pressão (MENDES e MARTINS, 2005).

Lin e Juang (2005) verificaram uma maior taxa de remoção de íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  por troca iônica utilizando a resina Amberlite IRC748. Em outro estudo (LIN e JUANG, 2007), utilizaram a mesma resina no estudo da cinética do equilíbrio da troca iônica para os mesmos íons em meio aquoso utilizando o processo de batelada. A influência do pH e das concentrações iniciais dos metais utilizados na cinética da reação, também foram estudadas (FRANCO, 2011).

Melo (2006) utilizou a resina Amberlite IRC748 no processo de troca iônica para a recuperação dos metais  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  além de determinar os parâmetros operacionais e de processo do sistema de colunas de troca iônica aplicadas à purificação da solução efluente obtida do processo industrial de recuperação de metais e reutilização da água em sistema contínuo.

Em outro trabalho, Zainol e Nicol (2009) investigaram as propriedades de adsorção da resina Amberlite IRC748 para com os íons metálicos  $\text{Ni}^+$ ,  $\text{Co}^+$ ,  $\text{Mn}^+$  e  $\text{Mg}^+$  em diferentes valores de pH, a partir de uma solução aquosa na lixiviação ácida. Esse estudo indicou uma maior seletividade da resina para com o níquel e com o cobalto.

Recomendada para os processos de desmineralização e sistemas que envolvam altas temperaturas ou potenciais oxidativos, a resina Amberlite 200C é uma resina de troca catiônica, ácido forte, com grupo funcional formado pelo ácido sulfônico em uma matriz macroreticular de poliestireno. Possui elevado grau de reticulação, o que confere maior estabilidade à estrutura macroreticular, conferindo uma maior resistência à oxidação química e maior estabilidade contra choques mecânicos, térmicos e osmóticos do que quaisquer outras resinas catiônicas disponíveis comercialmente (LENNTECH, 2013).

Fernandes (2003) utilizou na parte experimental da sua dissertação, a resina Amberlite 200C na purificação dos sedimentos provenientes de diferentes regiões litorâneas.

A resina Amberlite IRN77 é uma resina de grau nuclear. O seu processo de fabricação é controlado para manter as impurezas inorgânicas no nível mais baixo possível e, procedimentos especiais são adotados para a remoção de vestígios de compostos orgânicos solúveis. Esta resina pode ser utilizada no tratamento primário de água, tratamento de resíduos radioativos e descontaminação. Os elevados padrões na fabricação dessa resina auxiliam a manter os processos livres de contaminantes (LENNTECH, 2013).

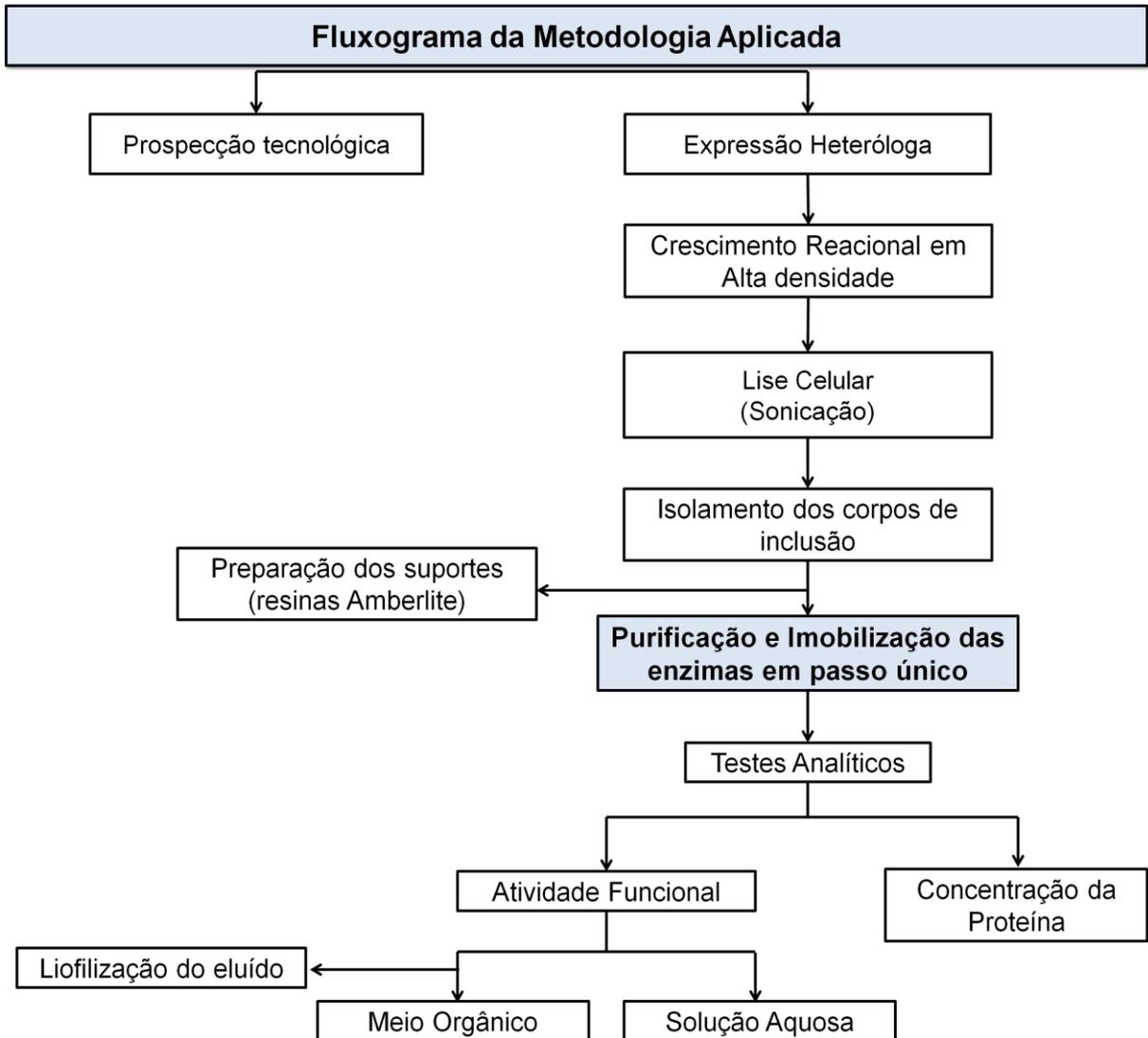
É uma resina catiônica de ácido forte, do tipo gel (microporosa), com o grupo funcional ácido sulfônico e a matriz formada por copolímero de estireno-divinilbenzeno. Esta resina foi utilizada por Kang *et al.* (2004) que verificaram a adsorção competitiva dos íons  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  na resina amberlite IRN77 em águas residuais (RIANI, 2008; LENNTECH, 2013).

Tendo em vista a aplicação dessas pesquisas, não foram encontrados trabalhos que proponham a utilização das resinas Amberlite IRC748, 200C e IRN77, na imobilização de enzimas. No entanto, comparada a outros suportes, a série Amberlite oferece uma capacidade de adsorção elevada e boa estabilidade a longo prazo da lipase imobilizada (HIOL *et al.*, 2000). Devido a isso, a proposta deste trabalho é desenvolver um processo adequado de purificação e imobilização enzimática em um único passo, utilizando as propriedades de adsorção de íons metálicos e seletividade das resinas Amberlite.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. FLUXOGRAMA ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA:

Figura 7: Fluxograma da Metodologia aplicada.



### 4.2. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA:

A prospecção tecnológica foi desenvolvida a partir do mapeamento realizado em janeiro de 2014 no banco de patentes ESPACENET®, utilizando o banco de dados Worldwide (Collection of Published applications from 90+ countries). A escolha pelo ESPACENET® dá-se pelo fato dos dados encontrados serem mais completos, com fácil acessibilidade, boa diversificação, permitindo uma prospecção mais analítica.

O estudo foi realizado utilizando as palavras-chave e códigos da classificação europeia (ECLA) relacionados no Tabela 1. Dentre as patentes exportadas da base ESPACENET® para o Programa Excel, 180 patentes foram analisadas após o tratamento dos dados, onde foram retiradas todas as repetições encontradas. Tendo em mãos as informações disponíveis no banco de patentes, foi feito um levantamento com as principais informações das patentes encontradas.

**Tabela 1 – Relação de Palavras-chave e Códigos ECLA utilizadas na busca de patentes.**

PALAVRAS-CHAVE								ECLA			ESPACENET®
Lipase*	Enzym*	Immobiliz*	Resin*	Ion* Exchang*	Cation* Exchang*	Amberlit*	Purific*	C12N11	C12N9	C12P7	Quantidade
		X									44.419
	X	X									6.813
		X						X			2.542
							X		X		2.433
	X	X						X			1.281
		X					X				1.085
		X							X		1.031
X		X									717*
	X						X		X		650
		X								X	539
	X	X							X		530*
							X			X	446
X	X	X									378
	X	X								X	222*
	X	X					X				182
X							X				169*
							X	X			158
X		X						X			125*
X		X								X	102*
	X						X			X	67
X		X							X		47*
	X						X	X			38
X		X	X	X							22*
	X	X					X		X		22*
X							X		X		20*
X							X			X	20*
X		X					X				17*
	X	X					X	X			16*
X	X	X					X				8
X							X			X	8

						X			X		6
	X	X				X					4*
						X			X		4
	X	X					X		X		4
	X					X	X				3*
X		X	X		X						2*
X		X					X			X	2
X		X					X		X		1
X		X	X	X		X					0
X		X	X			X					0
X		X	X	X			X				0
X		X	X		X		X				0
X						X	X				0
X		X				X					0
X		X				X	X				0
X							X	X			0
X		X					X	X			0
						X		X			0

\* Correspondências utilizadas na pesquisa da prospecção tecnológica.

#### 4.3. REAGENTES E SOLUÇÕES:

##### 4.3.1. Crescimento da Bactéria e Expressão Heteróloga da Lipase:

###### a. Meio Luria-Bertani (LB) – Líquido (SAMBROOK *et al.*, v.3, A.2.2)

---

Triptona	10g
NaCl	10g
Extrato de Levedura	5g
Água destilada (q.s.p)	1000mL

---

O pH foi ajustado para 7.0 com NaOH 5 mol/L. O Meio foi autoclavado a 120°C por 20min.

###### b. Meio Luria-Bertani (LB) – Sólido (SAMBROOK *et al.*, v.3, A.2.2)

---

Triptona	10g
NaCl	10g
Extrato de Levedura	5g
Ágar	13g
Água destilada (q.s.p)	1000mL

---

O pH foi ajustado para 7.0 com NaOH 5 mol/L. Adicionar o ágar bacteriológico após ajuste do pH e volume. O Meio foi autoclavado a 120°C por 20min.

**c. Meio 2YT – LÍQUIDO (SAMBROOK, p.13)**

---

Triptona	16g
NaCl	5g
Extrato de Levedura	10g
Água destilada (q.s.p)	1000mL

---

O pH foi ajustado para 7.0 com NaOH 5 mol/L. O Meio foi autoclavado a 120°C por 20min.

**d. Meio 2YT 10X Concentrado – LÍQUIDO (SAMBROOK, p.13)**

---

Triptona	16g
NaCl	5g
Extrato de Levedura	10g
Ágar	2%
Água destilada (q.s.p)	100mL

---

O pH foi ajustado para 7.0 com NaOH 5 mol/L. O Meio foi autoclavado a 120°C por 20min.

**e. Solução de IPTG 1mM – LÍQUIDO**

---

IPTG	1g
Água Ultra-pura (q.s.p)	4,19mL

---

**f. Solução de Kanamicina 50µg/mL – LÍQUIDO**

---

Kanamicina	250mg
Água Ultra-pura (q.s.p)	5mL

---

Passar a solução em um filtro Millipore de 0,22µm. Aplicar 0,5mL para 500mL de Meio.

**4.3.2. Eletroforese de Proteínas (SDS-PAGE):****a. Gel de Concentração 5% - 5mL (MANIATZ, V. 3, p.A843)**

---

Água Deionizada	3,4mL
Mix Acrilamida (30%)	830µL
TRIS 1M (pH 6.8)	630µL
SDS 10%	50µL
PSA 10%	50µL
TEMED	5µL

---

O PSA (10%) e TEMED devem ser adicionados na hora da transferência.

**b. Gel de Separação 12% - 10mL (MANIATZ, V. 3, p.A843)**

---

Água Deionizada	3,3mL
Mix Acrilamida (30%)	4mL
TRIS 1,5M (pH 8.8)	2,5mL
SDS 10%	100µL
PSA 10%	100µL
TEMED	4µL

---

O PSA (10%) e TEMED devem ser adicionados na hora da transferência.

**c. Gel de Separação 12% - 10mL (MANIATZ, V. 3, p.A843)**

---

Água Deionizada	3,3mL
Mix Acrilamida (30%)	4mL
TRIS 1,5M (pH 8.8)	2,5mL
SDS 10%	100µL
PSA 10%	100µL
TEMED	4µL

---

O PSA (10%) e TEMED devem ser adicionados na hora da transferência.

**d.** Mix de Acrilamida - 50mL (MANIATZ, V. 3)

---

Acrilamida 29%	14,5g
Bis Acrilamida 1%	0,5g
Água Ultra-pura (q.s.p)	50mL

---

Armazenar solução ao abrigo da luz.

**e.** TRIS 1M pH 6.8 - 50mL (MANIATZ, V. 3)

---

TRIS	6,06g
Água Ultra-pura (q.s.p)	50mL

---

Guardar em temperatura ambiente se for usada em pouco tempo. Em longo período, armazenar na geladeira.

**f.** TRIS 1,5M pH 8.8 - 50mL (MANIATZ, V. 3)

---

TRIS	9,08g
Água Ultra-pura (q.s.p)	50mL

---

Guardar em temperatura ambiente se for usada em pouco tempo. Em longo período, armazenar na geladeira.

**g.** SDS 10% - 50mL (MANIATZ, V. 3)

---

SDS	5g
Água Ultra-pura (q.s.p)	50mL

---

Guardar em temperatura ambiente.

**h.** PSA 10% - 1mL (MANIATZ, V. 3)

---

PSA	0,1g
Água Ultra-pura (q.s.p)	1mL

---

Estocar em alíquotas de 100 $\mu$ L no freezer.

**i.** Azul de Coomassie Brilhante - 100mL (MANIATZ, V. 3)

---

Azul de Coomassie	0,25g
Solução de Metanol (q.s.p)	100mL

---

Guardar em temperatura ambiente.

**j.** Tampão de Amostra - 10mL (MANIATZ, V. 3)

---

TRIS 50mM (pH 6.8)	0,06g
Glicerol 10%	1mL
SDS 2%	0,2g
Azul de Bromofenol 0,1%	0,01g
Água deionizada (q.s.p)	10mL

---

Guardar em temperatura ambiente.

**k.** Tampão de Amostra com DTT - 1mL (MANIATZ, V. 3)

---

Tampão de Amostra puro	450 $\mu$ L
DTT 1M	50 $\mu$ L

---

Adicionar o DTT na hora que for usar. Guardar no Congelador.

\* No caso de adicionar  $\beta$ -mercaptoetanol no tampão, substituir o DTT por 1 $\mu$ L/mL de  $\beta$ -mercaptoetanol.

**l.** Tampão de Corrida 5X Concentrado (pH 8.3) - 1L (MANIATZ, V. 3)

---

TRIS 25mM	15,14g
Glicina 250mM	93,84g
SDS 0,1%	10g
Água Ultra-pura (q.s.p)	1000mL

---

Solução para estoque. Diluir antes de usar.

**m. Solução descorante - (MANIATZ, V. 3)**


---

Metanol	50% (v/v)
Água	40% (v/v)
Ácido Acético Glacial	10% (v/v)

---

**4.3.3. Lise Celular:****a. Tampão de Lise – 100mL (AKBARI et al., 2010)**


---

Tris-HCl (pH 8.0) 100mM	1,21g
EDTA 1mM	0,02g
Água Ultra-pura (q.s.p)	100mL

---

Preparar no dia em que for utilizar. Manter refrigerado.

**b. Tampão de Desnaturação – 10mL (AKBARI et al., 2010)**


---

Tris-HCl (pH 8.0) 100mM	0,30g
Uréia 8M	4,81g
DTT 10mM	0,02g
Água Ultra-pura (q.s.p)	10mL

---

Preparar no dia em que for utilizar. Manter refrigerado.

**c. Tampão de Diálise – 1L (AKBARI et al., 2010)**


---

Tris-HCl (pH 8.0) 50mM	6,06g
Uréia 6M	360,36g
Água Ultra-pura (q.s.p)	1000mL

---

Pode ser preparado e estocado. Manter refrigerado.

#### 4.3.4. Ligação de Íons e Proteína inespecífica ao suporte:

a. Solução Sulfato de Níquel – 100mL

---

NiSO <sub>4</sub> 400mM	10,51g
Água Ultra-pura* (q.s.p)	100mL

---

\* A água ultra-pura foi substituída por Tampão Tris-HCl 50mM (pH 7) quando necessário.

b. Solução Sulfato de Cobalto – 100mL

---

CoSO <sub>4</sub> 400mM	11,24g
Água Ultra-pura* (q.s.p)	100mL

---

\* A água ultra-pura foi substituída por Tampão Tris-HCl 50mM (pH 7) quando necessário.

#### 4.3.5. Purificação e Imobilização da Enzima:

a. Tampão de Equilíbrio da Coluna – 10mL (AKBARI et al., 2010)

---

Tris-HCl (pH 8.0) 50mM	0,06g
Uréia 6M	3,60g
Água Ultra-pura (q.s.p)	10mL

---

Preparar no dia em que for utilizar.

b. Tampão de Lavagem da Coluna – 10mL (AKBARI et al., 2010)

---

Tris-HCl (pH 8.0) 50mM	0,06g
Uréia 6M	3,60g
Imidazol 35mM	0,02g
Água Ultra-pura (q.s.p)	10mL

---

Foi preparada a solução padrão e adicionado diferentes concentrações de Imidazol (35mM e 50mM). Utilizou 0,03g/10mL para 50mM de Imidazol.

**c. Tampão de Eluição da Amostra – 10mL (AKBARI et al., 2010)**

---

Tris-HCl (pH 8.0) 50mM	0,06g
Uréia 6M	3,60g
Imidazol 250mM	0,17g
Água Ultra-pura (q.s.p)	10mL

---

Preparar no dia em que for utilizar.

**4.3.6. Atividade Hidrolítica da Enzima em Solução Aquosa:**

**a. Solução de pNPP – 10mL (KORDEL et al., 1991; PENCREAC'H e BARATTI, 2001)**

---

pNPP 16,5mM	0,06g
Isopropanol	10mL

---

Preparar no dia em que for utilizar. Substância volátil.

**b. Tampão Tris-HCl – 100mL (KORDEL et al., 1991; PENCREAC'H e BARATTI, 2001)**

---

Tris-HCl (pH 8.0) 50mM	0,60g
Triton X-100 (w/v)	0,4%
Goma Arábica (w/v)	0,1%
Água Ultra-pura (q.s.p)	100mL

---

Preparar no dia em que for utilizar.

**4.3.7. Atividade Funcional da Enzima em Meio Orgânico:**

**a. Solução de pNPP – 25mL (PENCREAC'H e BARATTI, 1996; 2001)**

---

pNPP 50mM	0,47g
Hexano	25mL

---

Preparar no dia em que for utilizar. Substância volátil.

**b. Solução Tris-HCl – 25mL (PENCREAC'H e BARATTI, 1996; 2001)**

Tris-HCl (pH 8.0) 10mM	0,03g
Água Ultra-pura (q.s.p)	10mL

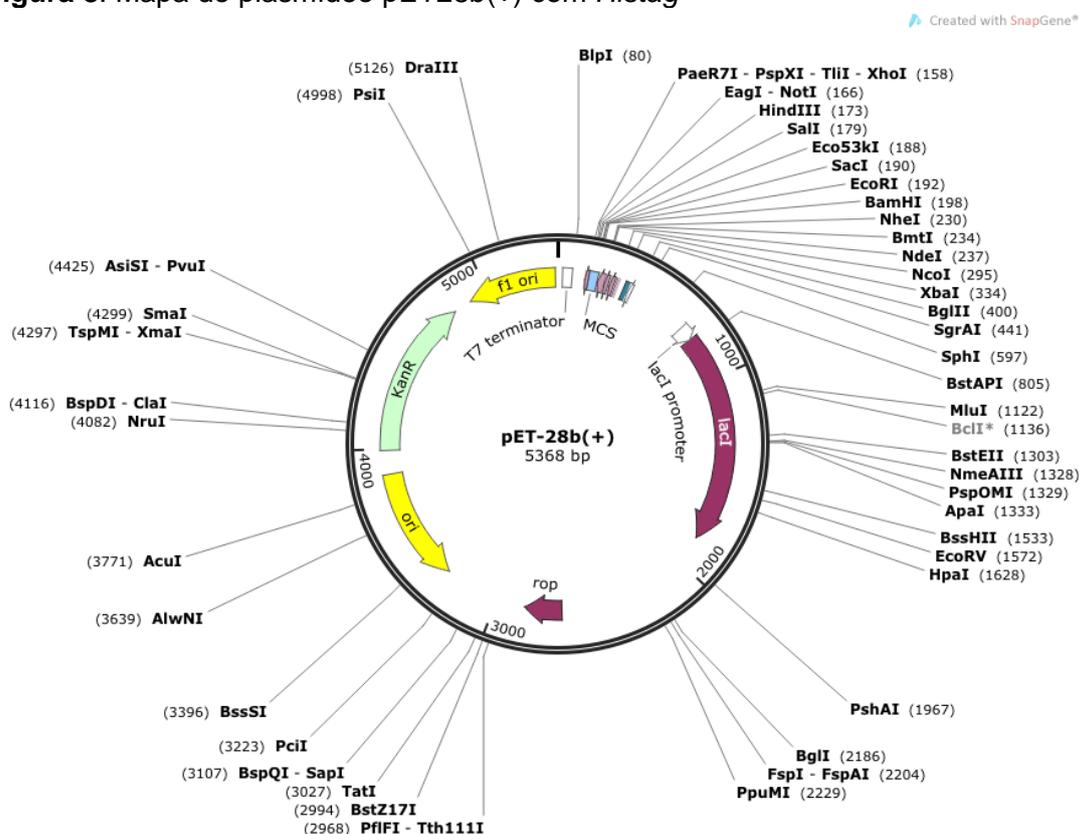
Solução armazenada em temperatura ambiente.

#### 4.4. MÉTODOS EXPERIMENTAIS:

##### 4.4.1. Expressão Heteróloga de Lipase de *Pseudozyma antarctica* modificadas:

Clones de lipase foram desenhados e adquiridos pelo grupo do Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI/FTC) e da empresa GeneScript, especializada na produção de clones para a expressão heteróloga de proteínas. Os clones foram desenhados segundo as seqüências de lipase B de *Pseudozyma antarctica* obtidas do Genebank (Figura 8). Substituições de nucleotídeos foram efetuadas para atender as abundancias de RNA<sub>t</sub> presentes em *Escherichia coli*.

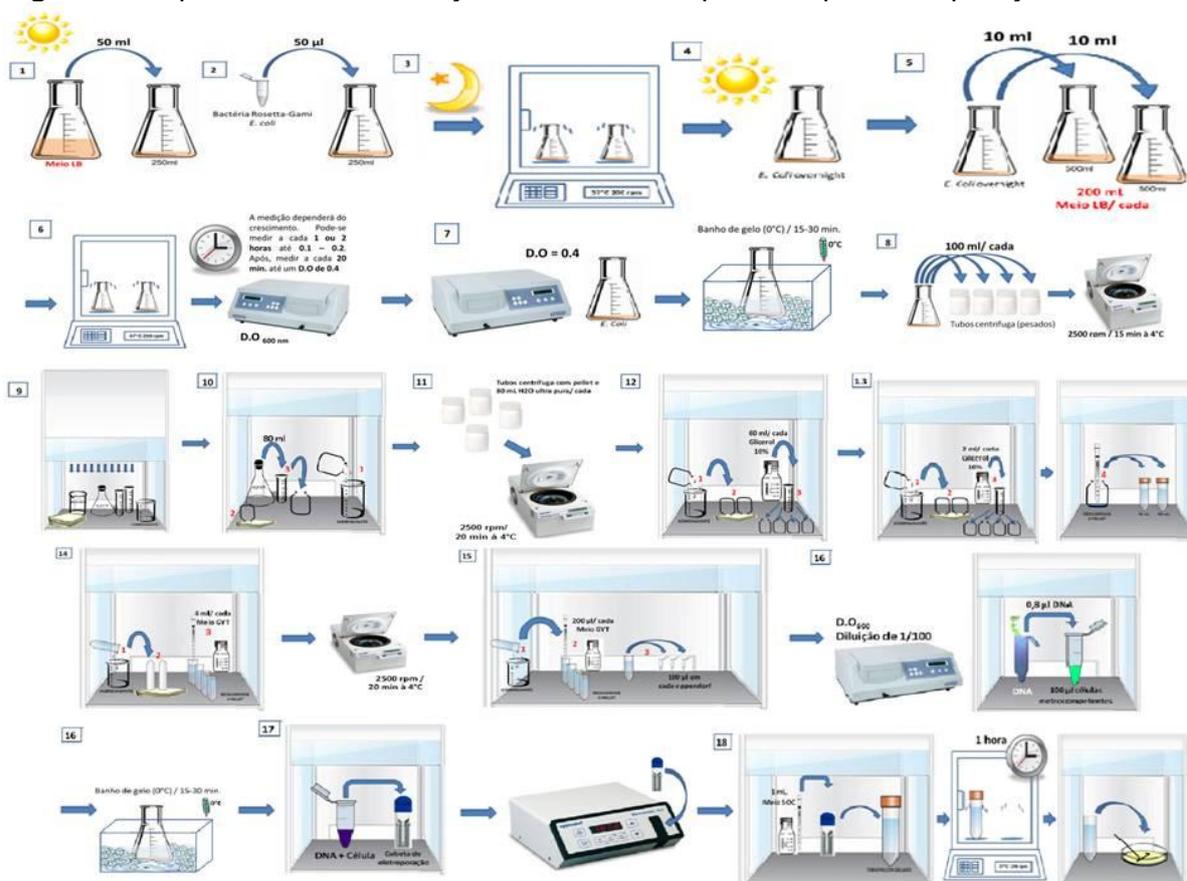
**Figura 8:** Mapa do plasmídeo pET28b(+) com *Histag*



Fonte: ADDGENE, 2013 ([www.addgene.org/vector-database/2566/](http://www.addgene.org/vector-database/2566/))

Plasmídeos de expressão protéica de alta saída (Pet28b) contendo o gene da lipase B foram transformados em células competentes de *E. coli* Rosetta-gammi 2 por eletroporação (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989) conforme esquema apresentado na Figura 9. Testes de expressão foram realizados por indução de IPTG e a expressão protéica foi otimizada pela detecção da lipase por SDS-PAGE.

**Figura 9:** Esquema da transformação de células competentes por Eletroporação.



#### 4.4.2. Crescimento da Lipase em reator com alta densidade celular:

Em um fermentador automatizado Tecbio-1,5 da Tecnal (Figura 10) foi realizada uma alta produção de células de proteínas recombinantes. Uma colônia positiva foi pré-inoculada em um frasco Erlenmeyer contendo 10 mL de meio líquido LB - Luria-Bertani (SAMBROOK *et al.*, 1989) suplementado com o antibiótico Kanamicina (50 µg/mL). A amostra foi incubada por, aproximadamente, 12 horas a 37°C e 200 rpm. Conseqüente, um novo inóculo foi realizado, com os mesmos parâmetros de temperatura e agitação, até uma densidade ótica (D.O) entre 0.5 e

0.6. A leitura foi realizada em uma absorvância de 600nm. Após, a cultura foi resfriada e foi realizada a indução com 1mg/mL de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranoside) por 3 horas à 37°C.

**Figura 7** – Tecbio-1,5 durante produção de proteínas recombinantes.



Após cerca de 8 horas de crescimento à 37°C foi adicionado 2mM de IPTG para iniciar a expressão da proteína. O crescimento foi conduzido com introdução ativa de oxigênio, quando necessário, e agitação constante. O pH do meio e oxigênio dissolvido foram constantemente monitorados e corrigidos por adição automatizada de HCl e NaOH ou por aumento do fluxo de ar e/ou da agitação. Através do monitoramento do oxigênio dissolvido pelo programa computacional do foi controlada também a renovação de nutrientes através da introdução automatizada de meio 2YT 100x concentrado (SIVASHANMUGAM et al., 2009). Após este período, as células foram separadas por centrifugação (2500rpm por 30 minutos) do sobrenadante. No fermentador, a adição da cultura bacteriana corresponde a uma proporção de 10% da quantidade total do meio.

A fração celular do meio de cultura foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 13% na presença de DTT ou  $\beta$ -mercaptoetanol corado por Azul de Comassie. Aplicou-se 5 $\mu$ L (para os pellets) e 15 $\mu$ L (amostras no sobrenadante) das amostras preparadas com tampão de amostra e DTT (Ditiotreitol) em cada poço. O marcador de padrão de peso molecular de proteína utilizado foi de 10 a 220 kDa (BENCK MARK PROTEIN LADDER, INVITROGEN ou BENCK MARK PRESTAINED PROTEIN LADDER, NOVEX by LIFE TECHNOLOGIES).

#### **4.4.3. Lise celular e Isolamento de Lipases dos Corpos de Inclusão (CI):**

Estes procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo citado em Akbari *et al.* (2010). Após centrifugação da amostra a 4°C por 30 minutos, a fração celular foi pesada em balança analítica e ressuspensa em tampão de lise com uma proporção de 5mL/g. A suspensão de células foi sonicada por 7 ciclos de 30 segundos a uma potência de 80w e, em seguida, centrifugada a 4°C e 2500rpm por 15-20 minutos. O sobrenadante contendo proteínas solúveis foi armazenado para análise da atividade funcional da enzima e para expressão em SDS-PAGE. O pellet contendo proteínas insolúveis em CIs e restos celulares da lise foi lavado 3 vezes com tampão Tris-HCl pH 8.0, centrifugado, e ressuspendido em tampão de desnaturação onde foi incubado a 37°C por 60 minutos sob agitação suave. Decorrido o tempo, a amostra foi centrifugada a 4°C e 2500rpm por 20 minutos. Procedido, a amostra foi transferida para membrana de diálise (Dialysis tubing cellulose membrane, largura 10mm e 76mm – SIGMA-ALDRICH), sendo que, previamente foi retirada uma alíquota de 1mL para análise em SDS-PAGE. O tampão de diálise foi adicionado em um béquer na proporção de 1:100 (v/v) sob agitação constante, à 4°C por 48h com 3 trocas (12/12 horas). O intuito dessa diálise é a retirada total e parcial de compostos como o DTT e Uréia, respectivamente. Além disso, com a retirada parcial da uréia, ocorre o *refold* da proteína, já que a mesma foi desnaturada para sua retirada dos corpos de inclusão. Decorrido o tempo, a amostra foi retirada da membrana de diálise e armazenada em tubo falcon à 4°C para utilização na etapa posterior.

#### 4.4.4. Purificação e Imobilização das Enzimas em passo único:

Estratégias de purificação e imobilização em um passo único foram desenvolvidas em laboratório. Estas estratégias baseiam-se na modificação de resinas específicas para a adsorção seletiva das proteínas recombinantes através das propriedades quelantes da cauda de hexahistidina introduzidas na proteína recombinante. Para tal propósito, resinas acrílicas e matrizes queladoras de  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  foram utilizadas. Desta forma, pretendeu-se não apenas acelerar o processo de purificação, mas também, permitir a viabilização econômica das lipases através da diminuição dos custos de produção destes catalisadores.

##### 4.4.4.1. Preparação dos Suportes contendo Resinas do Grupo Amberlite:

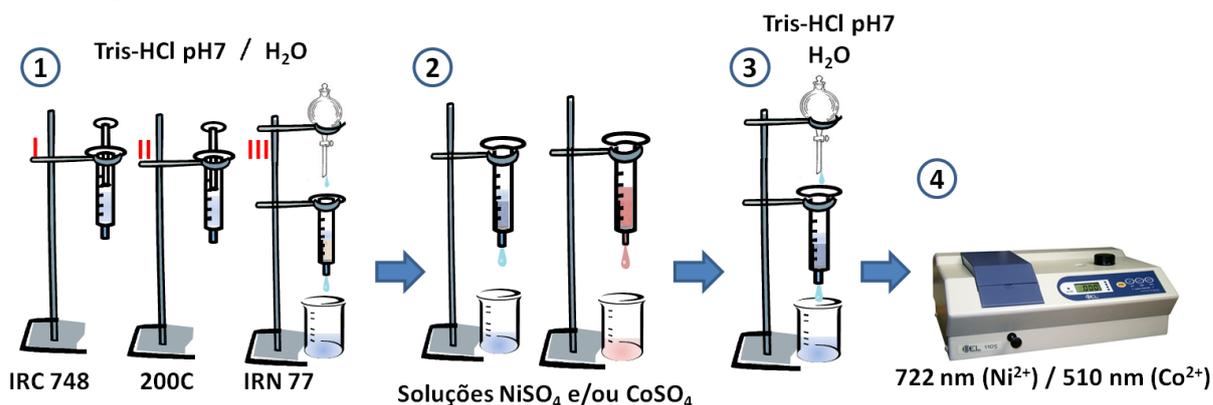
As resinas do grupo Amberlite selecionadas para os experimentos de purificação e imobilização foram: IRC748, 200C, IRN77. O suporte foi montado tendo como base a técnica de coluna com fluxo gravitacional onde seringas de 5-10mL foram carregadas com 1g a 5g das resinas. A preparação da seringa foi realizada com a colocação de discos de gase ou filtro na ponta da seringa com o intuito de evitar o vazamento da resina durante o seu uso. Depois, foi verificado o peso da seringa em uma balança analítica com/sem a resina a fim de verificar o peso exato da resina que foi adicionada. Em seguida, as colunas contendo as resinas foram pré-tratadas com  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada ou Tampão Tris-HCl (pH=7.0) até atingirem o pH neutro.

##### 4.4.4.2. Testes de ligação de íons e proteína inespecífica ao Suporte com Resinas do Grupo Amberlite:

Para avaliar a ligação dos íons, soluções contendo 400mM  $\text{NiSO}_4$  e/ou  $\text{CoSO}_4$  em água deionizada, ou no referido tampão Tris-HCl (pH7.0), foram adicionadas nas colunas e monitoradas quanto a absorção do eluente a 722nm para  $\text{Ni}^{2+}$  e 510nm para  $\text{CO}^{2+}$  (Figura 11). Com relação à ligação de proteínas inespecíficas, foi utilizado o método de Bradford (1976) onde foi dosada a quantidade de proteínas presentes no eluente. Para avaliação da ligação inespecífica à proteínas, soluções com 0,5mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) e/ou ovoalbumina de galinha foram preparadas.

Os dados obtidos foram analisados no programa (Linux) a fim de verificar a melhor resina e suas combinações de íons para a etapa de purificação e imobilização.

**Figura 11** – Esquema da preparação da coluna com resinas do grupo Amberlite. (1) Pré-lavagem das resinas com água deionizada ou tampão Tris-HCl pH7.0; (2) Carregamento das Amberlites com as soluções de níquel ( $\text{NiSO}_4$ ) e cobalto ( $\text{CoSO}_4$ ); (3) Lavagem das resinas; (4) Medição dos eluídos das colunas em espectrofotômetro UV-Vis.



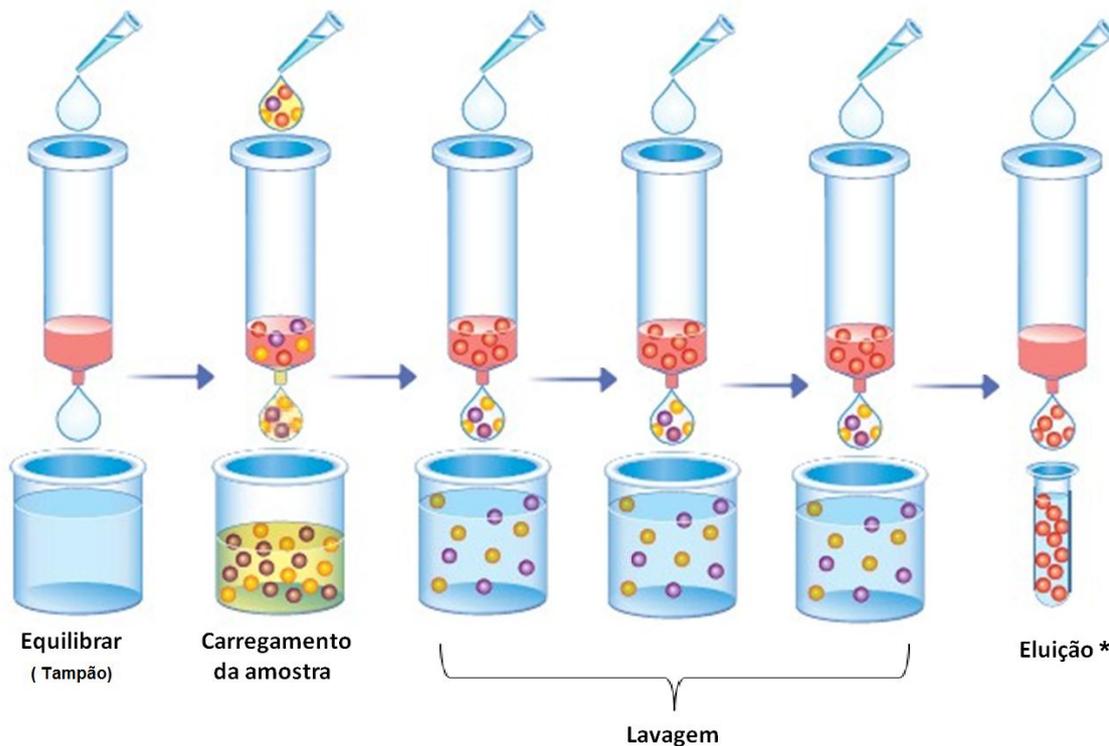
#### 4.4.4.3. Utilização das Colunas no Processo de Purificação e Imobilização enzimática:

Para o processo de purificação e imobilização em passo único, duas colunas foram testadas para fins comparativos. A resina Amberlite que apresentou dados mais favoráveis para o processo, foi analisada em comparativo com a Coluna comercial His GraviTrap TALON (GE Healthcare, *Life Sciences*). Além disso, a coluna GraviTrap foi utilizada nesse trabalho com a finalidade de verificar a presença da calda de hexahistidina na enzima. Esta coluna já vem pré-embalada e previamente equilibrada em tampão, possui o mesmo sistema de fluxo gravitacional requerido na Amberlite, além de ser carregada com íons de cobalto e é específica para proteínas com cauda de histidina.

Nesta nova etapa foi utilizado o protocolo de purificação de Akbari *et al* (2010) onde as colunas foram equilibradas com 5mL de tampão. Após, 10mL da amostra resultante do procedimento de “Lise celular e Isolamento de Lipases dos Corpos de Inclusão” (Item 4.2) foi adicionada na coluna. A seguir, a coluna foi lavada com tampão de lavagem contendo três concentrações diferentes de imidazol: 0mM, 35mM e 50mM. A amostra foi posteriormente eluída da coluna com uma

concentração final de 250mM de Imidazol para análises quantitativas e analíticas. Em todas as etapas, as amostras eluídas foram coletadas em tubos (eppendorfs) para análises da atividade enzimática e SDS-PAGE. Um breve esquema do processo de purificação e imobilização é visualizado na Figura 12.

**Figura 12** – Esquema do processo de purificação e imobilização enzimática da lipase B. Para testes analíticos, ou quando for necessário, a amostra purificada é eluída.



Fonte: ADAPTADO. Ficha técnica His GraviTrap TALON Columns (GE Healthcare – Life Sciences, 2013) e AKBARI et al. (2010).

#### 4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS:

##### 4.5.1. Ensaio da Atividade Funcional da Lipase B de *Pseudozyma antarctica*:

###### 4.5.1.1. Ensaio da Atividade Hidrolítica da Lipase em Solução aquosa:

A atividade hidrolítica foi mensurada pelo método de degradação do palmitato de para-nitrofenila (pNPP) de acordo com Kordel *et al.* (1991) e Pencreac'h e Baratti (2001), com pequenas modificações com relação a quantidade da enzima e tempo de reação. Foi misturado 1 volume de uma solução de pNPP em isopropanol com 9 volumes de tampão 50mM Tris-HCl pH 8.0. Em seguida, 1,35mL dessa mistura foi pré-equilibrada em banho-maria à 37°C. Para tal, foi utilizado uma cubeta de quartzo

(2mL) de espectrofotômetro UV-Visível. A reação foi iniciada com a adição de 50-150µL do sobrenadante, onde foi monitorada a liberação de pNP em intervalos de tempo previamente determinados (0–10 minutos). A variação da absorbância foi medida em 410nm contra um branco sem enzima. A taxa (de velocidade) da reação foi calculada a partir do declive da curva de absorção em função do tempo utilizando um coeficiente de extinção molar do para-nitrofenila de  $18 \cdot 10^3 \text{ cm}^2/\text{mol}$ . Os dados coletados na curva de absorção foram relacionados em um gráfico onde são analisados os pontos de absorbância e intervalos de tempo gerados ao longo de toda a reação. A regressão linear da reta obtida gerou um coeficiente que representa a taxa de consumo do substrato por unidade de tempo. Após, os dados obtidos foram incluídos na fórmula  $A = \epsilon \cdot b \cdot c$  (onde **A** é a absorbância, **ε** é o coeficiente de extinção molar do pNP, **b** é o comprimento da cubeta e **c** é a concentração a ser encontrada) e obteve-se a concentração enzimática. Uma unidade de enzima é igual à quantidade de enzima (U/g) que 1µmol de para-nitrofenila liberou por minuto, nas condições citadas.

#### 4.5.1.2. Ensaio da Atividade Lipolítica em Meio orgânico:

A taxa de reação foi determinada pelo método de degradação do palmitato de para-nitrofenila (pNPP) de acordo com Pencreac'h e Baratti (1996) e Pencreac'h e Baratti (2001), sendo realizadas modificações no protocolo em relação a enzima, quantidade da enzima, tempo da reação, agitação e quantidade de pNPP. Uma determinada quantidade da amostra (20-150µL) foi congelada dentro de tubos falcon, os quais corresponderam a um determinado tempo de análise que variou de 0 a 25 minutos. As amostras foram liofilizadas (Liofilizador de bancada série LT – Terroni) até completa desidratação. Decorrido o processo, todos os tubos foram pré-equilibrados à 37°C em banho Maria. A reação foi iniciada pela adição de 400µL de uma solução de pNPP em hexano. A mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto e incubada à 37°C em banho Maria com agitação de 100rpm. Decorrido o tempo, foi adicionado à mistura 1mL de tampão 10mM Tris-HCl pH 8.0. Novamente a amostra foi agitada (30s) e aguardou-se por 2 minutos a separação completa das fases. Após, foi retirada uma alíquota de 800µL da amostra com pNPP e transferida para uma cubeta (1mL). A leitura da absorbância foi a 410nm em espectrofotômetro UV-Visível contra um branco sem enzima. A taxa (velocidade) da reação foi calculada a

partir do declive da curva de absorção em função do tempo utilizando um coeficiente de extinção molar do p-nitrofenol de  $18 \cdot 10^3 \text{ cm}^2/\text{mol}$ . Os dados coletados na curva de absorção seguiram o mesmo caçulo apresentado no ensaio da atividade hidrolítica da Lipase em solução aquosa para a obtenção da concentração enzimática. Uma unidade de enzima (U/g) é igual à quantidade de enzima que liberou  $1 \mu\text{mol}$  de para-nitrofenila por minuto.

#### **4.5.2. Determinação da Concentração de Proteína:**

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando o Reagente da Sigma (Bradford Reagent, ref. B6916). O teste é realizado através da diluição em série da amostra da lipase e do padrão de proteína (BSA ou ovoalbumina a  $0,5\text{mg/mL}$ ). Uma quantidade da amostra do sobrenadante foi previamente filtrado (Filtro VertiPure Nylon Syringe, 13mm,  $0,45\mu\text{m}$ , 100/pk, vertical) e diluído com água deionizada ou tampão Tris-HCl (pH7.0), quando se fez necessário. Para a realização do teste, quantidades variáveis da amostra ( $0\text{-}100 \mu\text{L}$ ) foram colocadas em tubos eppendorfs e misturadas a  $1,5\text{mL}$  do reagente de Bradford em temperatura ambiente. Após a adição do reagente, o tubo é agitado em vórtex por poucos segundos até a completa homogeneização da amostra. Decorridos os 5 minutos necessários para reação do reagente, as amostras foram transferidas para uma cubeta de vidro (com capacidade de  $2\text{mL}$ ) onde foi realizada a leitura a  $595\text{nm}$  de absorbância em espectrofotômetro UV-Vis.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

A prospecção tecnológica é uma ferramenta de mapeamento de futuros desenvolvimentos científicos e tecnológicos capaz de influenciar significativamente o mercado industrial, a economia ou a própria sociedade como um todo. Os seus métodos vêm sendo aplicados há muito tempo por instituições públicas ou privadas de diversos países, como uma ferramenta para orientar os esforços empreendidos para o desenvolvimento de tecnologias (MAYERHOFF, 2008). Utilizando esta sistemática ferramenta é possível relacionar todas as tecnologias existentes, sendo possível identificar o estágio de amadurecimento da tecnologia e como ela se insere na sociedade. Também é possível identificar as tecnologias concorrentes e as lacunas a serem preenchidas por novas tecnologias ou suas variações, os inventores envolvidos no mesmo tema, os principais países depositantes de patentes, principais empresas e academias, entre outros (QUINTELLA *et al.*, 2011).

#### 5.1.1. Prospecção Tecnológica do Processo de Purificação e Imobilização enzimática em Resinas de Troca iônica

No levantamento de dados realizados, 16 combinações de palavras e códigos foram utilizadas, representando um total de 2038 dados, que após o tratamento se resumiram em 180 patentes, conforme Tabela 2.

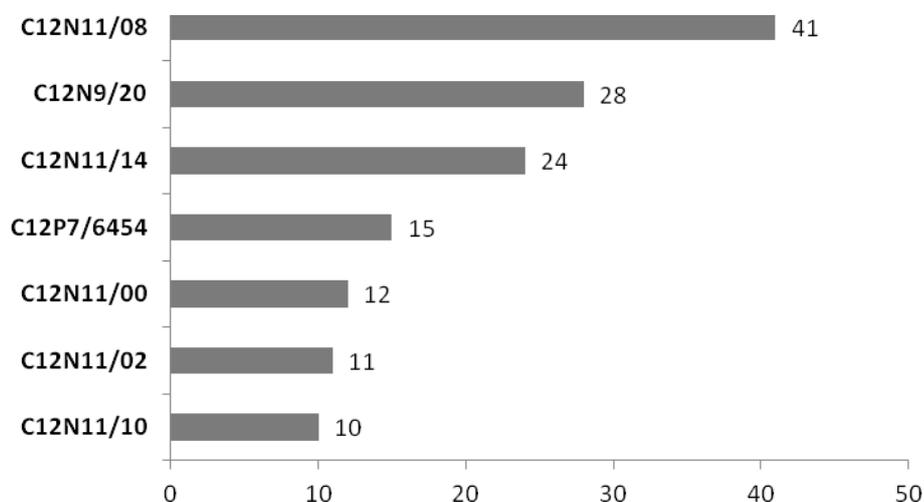
**Tabela 2 –** Palavras-chave e Códigos utilizados na prospecção.

<b>PALAVRAS-CHAVE/ ECLA</b>	<b>ESPACENET@</b>
Lipase*; Immobiliz*	717
Lipase*; Purific*	169
Enzym*; Immobiliz*; C12N9	530
Enzym*; Immobiliz*; C12P7	222
Lipase*; Immobiliz*; Purific*	17
Lipase*; Immobiliz*; C12N11	125
Lipase*; Immobiliz*; C12P7	102
Lipase*; Immobiliz*; C12N9	47
Lipase*; Purific*; C12N9	20
Lipase*; Purific*; C12P7	20
Enzym*; Immobiliz*; Amberlit*	4
Enzym*; Amberlit*; Purific*	3
Lipase*; Immobiliz*; Resin*; Cation* Exchang*	2

Lipase*; Immobiliz*; Resin*; Ion* Exchang*	22
Enzym*; Immobiliz*; Purific*,C12N9	22
Enzym*; Immobiliz*; Purific*,C12N11	16
<b>TOTAL DE DADOS SELECIONADOS</b>	<b>2038</b>
<b>TOTAL DE DADOS APÓS TRATAMENTO</b>	<b>180</b>

Pela análise das patentes estudadas foi possível verificar os principais códigos citados (Figura 13). Os códigos mencionados nas patentes representam a sua constituição e uso, do qual os significados podem ser obtidos em inglês pela EPO na página virtual do ESPACENET® (QUINTELLA *et al.*, 2009). Verifica-se que o código mais utilizado foi C12N11/08 que corresponde a 29% e é descrito como enzimas ou células microbianas imobilizadas sobre ou no interior de suportes orgânicos: polímeros sintéticos.

**Figura 13** – Principais códigos relacionados na prospecção tecnológica.



Ao observar a Tabela 3 com os significados dos principais códigos relacionados, é evidente que os três códigos mais representativos (C12N11/08, C12N9/20 e C12N11/14) correspondem ao processo de imobilização de enzimas ou células.

**Tabela 3 – Significado dos Códigos das patentes.**

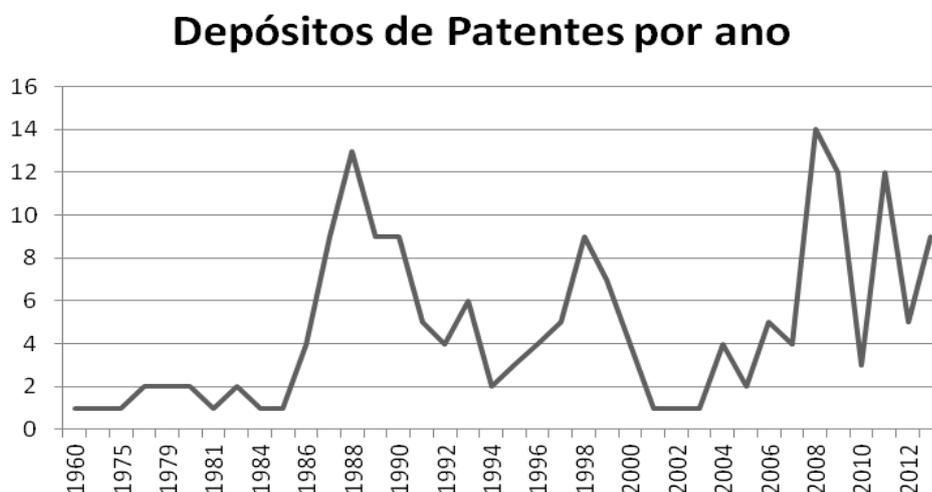
Legenda dos Códigos	
<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>
<b>Seção</b>	
C	Química; Metalúrgica
<b>Subseção</b>	
C12N	Microrganismo ou Enzimas; Composição destes; Propagação, Preservação ou Manutenção dos micro-organismos; Mutação ou Engenharia Genética; Meio de Cultura
C12P	Fermentação ou Processos usando Enzimas para sintetizar um composto químico ou composição desejada; ou Separação de Isômeros ópticos de uma mistura racêmica
<b>Grupo</b>	
C12N11	Enzimas imobilizadas ou ligada ao suporte; Células microbianas imobilizadas ou ligadas ao suporte; Preparação destes
C12N9	Enzimas; Proenzimas; Composições de Enzimas e Proenzimas
C12P7	Preparação de Compostos Orgânicos contendo Oxigênio
<b>Subgrupo</b>	
C12N11/10	Enzimas ou Células microbiológicas sendo imobilizadas sobre ou dentro de suportes orgânicos: suporte sendo um carboidrato
C12N11/02	Enzimas ou Células microbiológicas sendo imobilizadas sobre ou dentro de suportes orgânicos
C12N11/00	Enzimas imobilizadas ou ligada ao suporte; Células microbianas imobilizadas ou ligadas ao suporte; Preparação destes
C12P7/6454	Gorduras; Óleos graxos; Ceras tipo éster; Ácidos graxos superiores, isto é, possuem 7 átomos de carbono em uma cadeia contínua ligada a um grupo carboxil; Gorduras ou Óleos oxidados: {Ésteres de Ácido Graxo}: {por esterificação}
C12N11/14	Enzimas ou células microbiológicas sendo imobilizadas sobre ou dentro de um suporte inorgânico
C12N9/20	Enzimas ou células microbiológicas sendo imobilizadas sobre ou dentro de um suporte orgânico: agindo sobre ligações éster (3.1): Divisão de Triglicerídeos, por exemplo, por meio de Lipase
C12N11/08	Enzimas ou células microbiológicas sendo imobilizadas sobre ou dentro de um suporte orgânico: suporte sendo um polímero sintético

Dentre as subseções relacionadas na Figura 13, C12N representa 76%, seguido por C12P com 24%. A seção C – Química; Metalúrgica, é 100% predominante na análise dos códigos mais representativos. De acordo com Quintella *et al.* (2009) essa seção representa 84% dos códigos mais utilizados no planeta e 47% das patentes brasileiras. Todos os significados são apresentados na Tabela 1.

A evolução anual de patentes (Figura 14) mostra um número maior de depósitos nos anos de 1988 (13), 2008 (14), 2009 (12) e 2011 (12). Entre os anos de 1960 e 1980 o número de patentes depositadas é reduzido, indicando que a tecnologia pode-se encontrar em uma fase de acúmulo do conhecimento, o que é extremamente importante para o desenvolvimento e aperfeiçoamento da técnica e, também, para grandes possibilidades de investimentos (QUINTELLA *et al.*, 2011).

É também possível observar um aumento do número de patentes depositadas a partir de meados dos anos 80 que coincide com o uso de enzimas como biocatalisadores em síntese orgânica. No Brasil, a utilização de processos enzimáticos em síntese orgânica teve início na década de 90 através das academias. O crescimento do depósito de patentes observado varia durante o decorrer dos anos, mostrando um crescimento lento. Esse comportamento é esperado pela tecnologia de enzimas imobilizadas devido à complexidade do tema (OLIVEIRA e MANTOVANI, 2009; GUIDINI *et al.*, 2010).

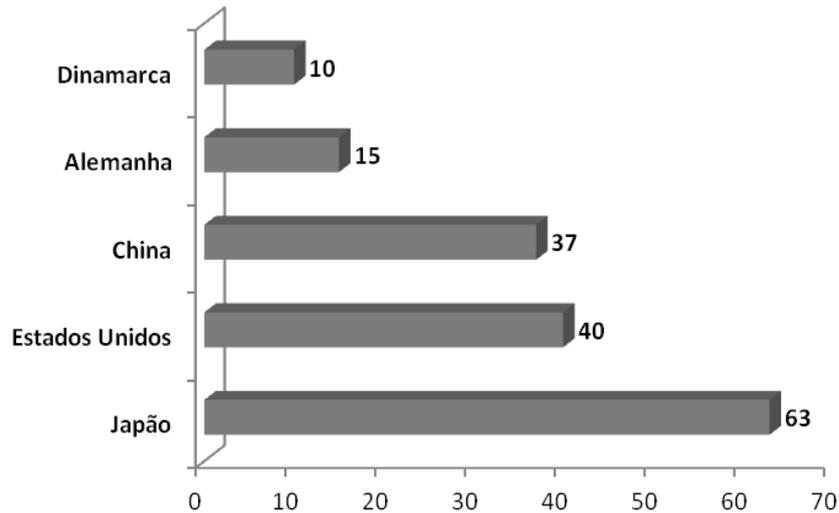
**Figura 15** – Evolução Anual de Depósitos de Patentes.



Os grandes detentores da tecnologia é o Japão, EUA e China (Figura 15). O Japão corresponde a 38% com 63 patentes depositadas, seguido pelos EUA com 24% (40) e China com 23% (37). Conforme dados apresentados por Guidini e colaboradores (2010) o Japão foi o primeiro país a aplicar enzimas imobilizadas na indústria em 1960. E, segundo Gramacho (2008) os EUA é o país de maior índice de depósito de patentes sobre enzimas (33%), sendo que a maioria dessas enzimas é

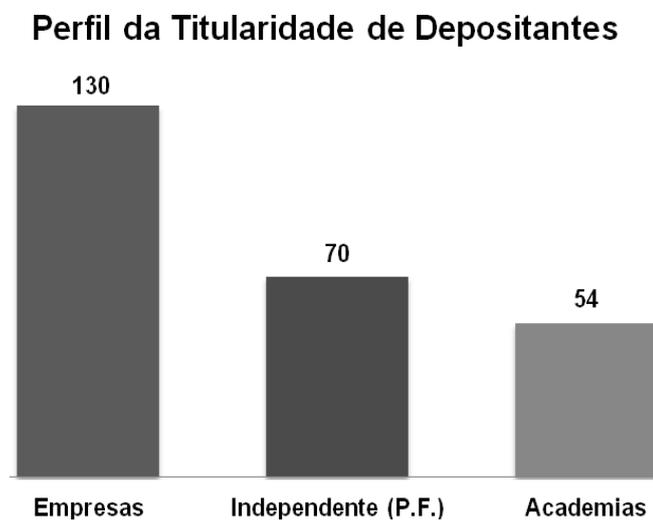
aplicada na área da alimentação (45%). O Brasil não aparece entre os depositantes encontrados nessa prospecção, entretanto, pode estar representado pela WO e EP.

**Figura 15** – Número de patentes depositadas por país (1960-2012).



O perfil da titularidade (Figura 16) permite identificar o número de patentes depositadas por cada grupo. As empresas detêm a maior parcela da tecnologia com 51% das patentes, seguida pelos inventores independentes (28%) e academias (21%). O delineamento apresentado indica que os independentes representam boa percentagem nesta área tecnológica. No entanto, é relevante citar que alguns desses inventores estão associados às empresas ou academias.

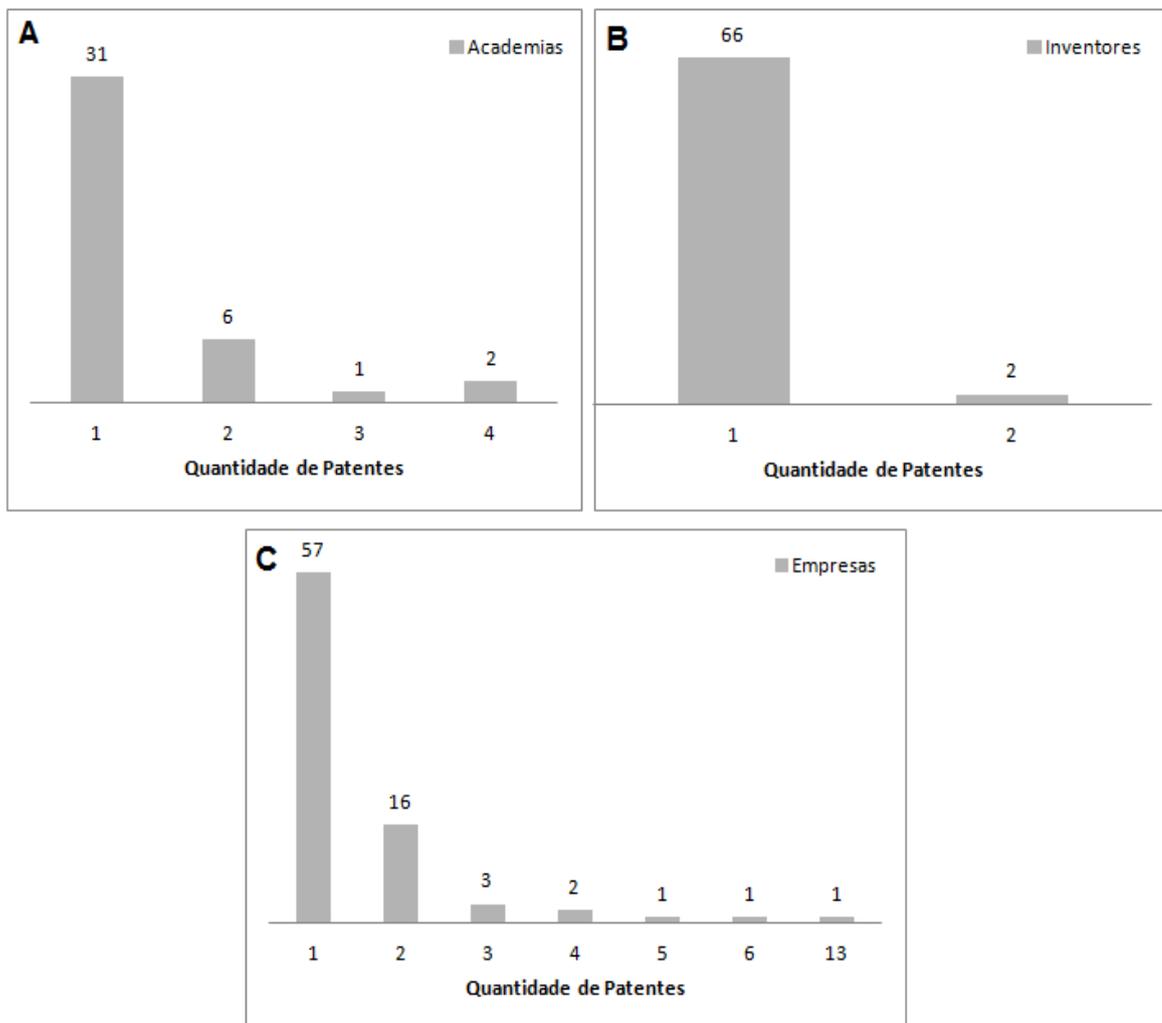
**Figura 16** – Perfil de depositantes das patentes.



Outro fato importante observado é a distribuição das patentes depositadas por cada grupo, ou seja, quantidade de patente depositada por cada empresa, pessoa física e academias. A Figura 17 demonstra que não existe um monopólio desta tecnologia por nenhuma dessas três vertentes. A maioria das empresas, academias e inventores apresentam apenas uma ou duas patentes.

**Figura 17** – Quantidade de Patentes Depositadas de acordo com a Titularidade. (A) Academias como depositantes; (B) Inventores como depositantes; (C) Empresas como depositantes.

### Distribuição de Patentes por Depositante



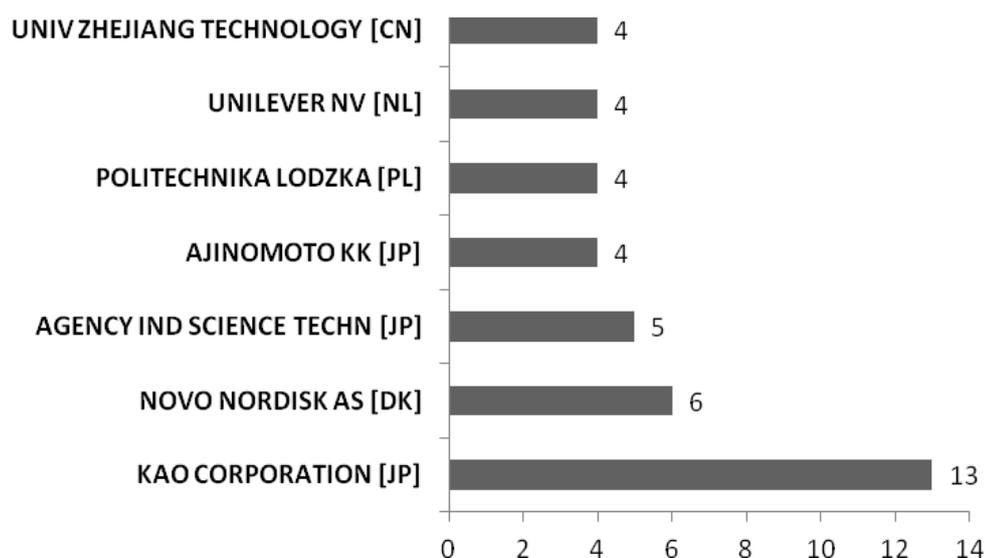
Os principais depositantes de patentes estão relacionados na Figura 18. Nessa relação consta quatro empresas e duas academias. Dentre as empresas com maior depósito de patentes, a KAO CORPORATION do Japão foi a mais representativa,

depositando um total de treze patentes, seguida pela empresa NOVO NORDISK S/A da Dinamarca, com seis patentes depositadas e, posteriormente, pela empresa governamental AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY do Japão com cinco patentes.

O grupo KAO atua em diversos setores industriais, através da produção de produtos químicos, cosméticos e produtos para cabelos, bebidas funcionais para saúde, produtos femininos, para o cuidado do bebê e detergentes. Esse grupo possui representantes em diversos países, inclusive no Brasil ([www.kao.com](http://www.kao.com)).

A NOVO NORDISK S/A originou-se da fusão de duas grandes empresas. Com a fusão a empresa NOVO tornou-se o maior produtor mundial de enzimas industriais, enquanto que NORDISK continuou desenvolvendo medicamentos para o tratamento da diabetes. O interesse por ambas as áreas gerou amplo conhecimento nas áreas de fermentação, recuperação e biotecnologias relacionadas. No entanto, devido a grande divergência das áreas, a empresa se desmembrou. A empresa que trabalhava com enzimas passou a ser conhecida como Novozymes S/A, que é uma das principais empresas que comercializam catalisadores imobilizados em suportes sólidos para aplicações biotecnológicas e industriais (<http://novonordisk-us.com>).

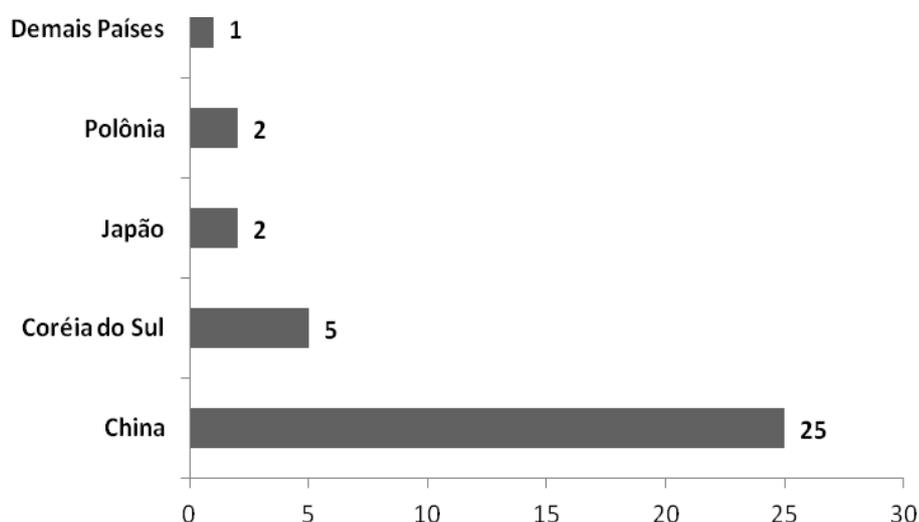
**Figura 18** – Principais depositantes de Patentes (1960-2012).



Ambas as academias relacionadas na Figura 18 apresentam 4 patentes depositadas. A Universidade Zhejiang Technology da China destaca-se pelas

pesquisas voltadas para a química verde. A pesquisa na instituição baseia-se em três áreas principais: química aplicada, catálise industrial e engenharia bioquímica (<http://www2.zjut.edu.cn>). Além dessa instituição acadêmica, a China é representada por mais 24 academias, com um total de 34 patentes, o que corresponde a 71% das instituições representadas, conforme Figura 19.

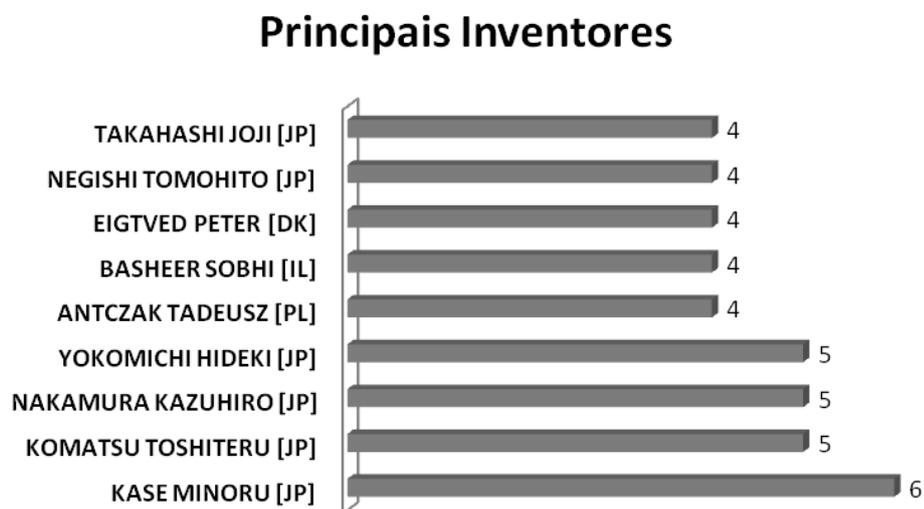
**Figura 19** – Representação das principais academias depositantes por país (1960-2012).



Relacionando os inventores, o Japão volta a se destacar pela quantidade de pesquisadores independentes no país. Conforme dados apresentados na Figura 20, esse país é representado por seis dentre os nove principais inventores individuais. Esse fato pode estar diretamente relacionado à parceria de empresas e pesquisadores individuais no depósito de patentes em alguns países.

Dentre as 41 patentes apresentadas na Figura 20, o Japão é representado por seis inventores, com 29 depósitos de patentes registradas, tendo um percentual de 70% e uma média aproximada de cinco patentes por inventor. Além do Japão, dois outros países são relacionados dentre os principais inventores (Dinamarca e Israel) sendo que cada um, apresenta apenas um inventor com quatro patentes registradas, por inventor.

**Figura 20** – Representação dos Principais Inventores.



A prospecção tecnológica mostrou que existem relativamente poucas patentes depositadas relacionadas à tecnologia de imobilização e purificação de enzimas em suportes de troca iônica. O Japão se destaca nas pesquisas a cerca dessa tecnologia, sendo representado principalmente por empresas e inventores individuais. A China é o país com mais patentes por academia. Nenhuma patente do Brasil foi relacionada no estudo, indicando uma necessidade de pesquisas na área.

## 5.2. ANÁLISE DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA LIPASE B DE *Pseudozyma antarctica* MODIFICADA E SEUS POSSÍVEIS INTERFERENTES:

No decorrer deste trabalho foram estudados diferentes protocolos a fim de obter os melhores resultados da atividade funcional de *PALB* em meio aquoso e orgânico. Os testes realizados em bancada permitiram um maior entendimento do comportamento cinético da enzima, constatando que a leitura da atividade funcional através da absorbância é influenciada pelos compostos utilizados durante a preparação da amostra, ou seja, um composto utilizado durante a lise celular ou etapa da purificação e imobilização, pode interferir ou favorecer na taxa de atividade.

Para a mensuração da atividade funcional de *PALB*, foi utilizada a amostra da coluna do eluído purificado contendo 6M de uréia (Akbari *et al.*, 2010). Em meio aquoso, *PALB* apresentou uma atividade de 250U/g com uma concentração de proteína de 0,23mg/mL. Segundo Pencreac'h e Baratti (2001), a atividade específica relatada para lipases de *Candida* são apresentadas no intervalo de 30 a  $3 \times 10^5$  U/g, sendo que *Candida antarctica* (*Pseudozyma antarctica*) apresenta uma atividade de 23U/g de proteína. Outras lipases de leveduras apresentam valores intermediários na faixa de  $3 \times 10^3$  a  $4 \times 10^3$  U/g.

Em meio orgânico, *PALB* apresentou uma atividade funcional de 52U/g em uma concentração de proteína de 0,23mg/mL. Geralmente, lipases apresentam uma atividade significativamente menor em meio orgânico do que em meio aquoso (PENCREAC'H e BARATTI, 1996; RAHMAN *et al.*, 2005; SALUM, 2010; MADALLOZO, 2011). Esse resultado dá-se pelo efeito negativo do solvente sobre a estrutura conformacional da enzima onde a tampa que cobre o sítio catalítico permanece fechada em meios aquo-restritos ou, então, pelo teor de água presente na reação, visto que é fundamental o controle de água em uma reação hidrolítica. Entretanto, apesar da lipase apresentar uma atividade funcional menor em meio orgânico, a medição se faz necessária em processos laboratoriais ou industriais que tem por finalidade a imobilização da enzima. A dosagem hidrolítica em meio orgânico previne ou evita a dessorção da enzima em meio reacional e confirma a atividade da enzima imobilizada em solventes orgânicos (VERGER, 1997; BARON *et al.*, 2005; MADALLOZO, 2011).

Durante a realização dos testes, foi possível verificar alguns dos compostos que influenciam na atividade funcional da enzima *PALB*. A presença de  $\beta$ -

mercaptoetanol ou DTT, SDS e EDTA diminui a atividade da enzima. Marques *et al* (2011), relatam a redução da atividade enzimática na presença de concentrações acima de 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol. Borkar *et al.* (2009) verificaram uma redução considerável na atividade da enzima na presença de 5 mM de EDTA e 2 mM do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol. Além disso, uma perda notável na atividade enzimática na presença de 1% (w/v) SDS é relatada. Esse composto desnaturante atua sobre as ligações di-sulfureto provocando a inativação da enzima. A redução da atividade da enzima por EDTA também é relatada por BROD (2010).

### 5.3. LIGAÇÃO E RETENÇÃO DE ÍONS METÁLICOS E PROTEÍNA INESPECÍFICA AO SUPORTE AMBERLITE:

#### 5.3.1. Ligação e retenção de íons de Níquel e Cobalto às resinas Amberlite:

Os experimentos foram realizados com o objetivo de estabelecer o melhor suporte para o processo de purificação e imobilização da enzima Lipase B de *Pseudozyma antarctica*. Para isso, foram preparadas colunas verticais utilizando três tipos de resinas de troca iônica da série Amberlite pré-carregadas com íons de níquel ou cobalto.

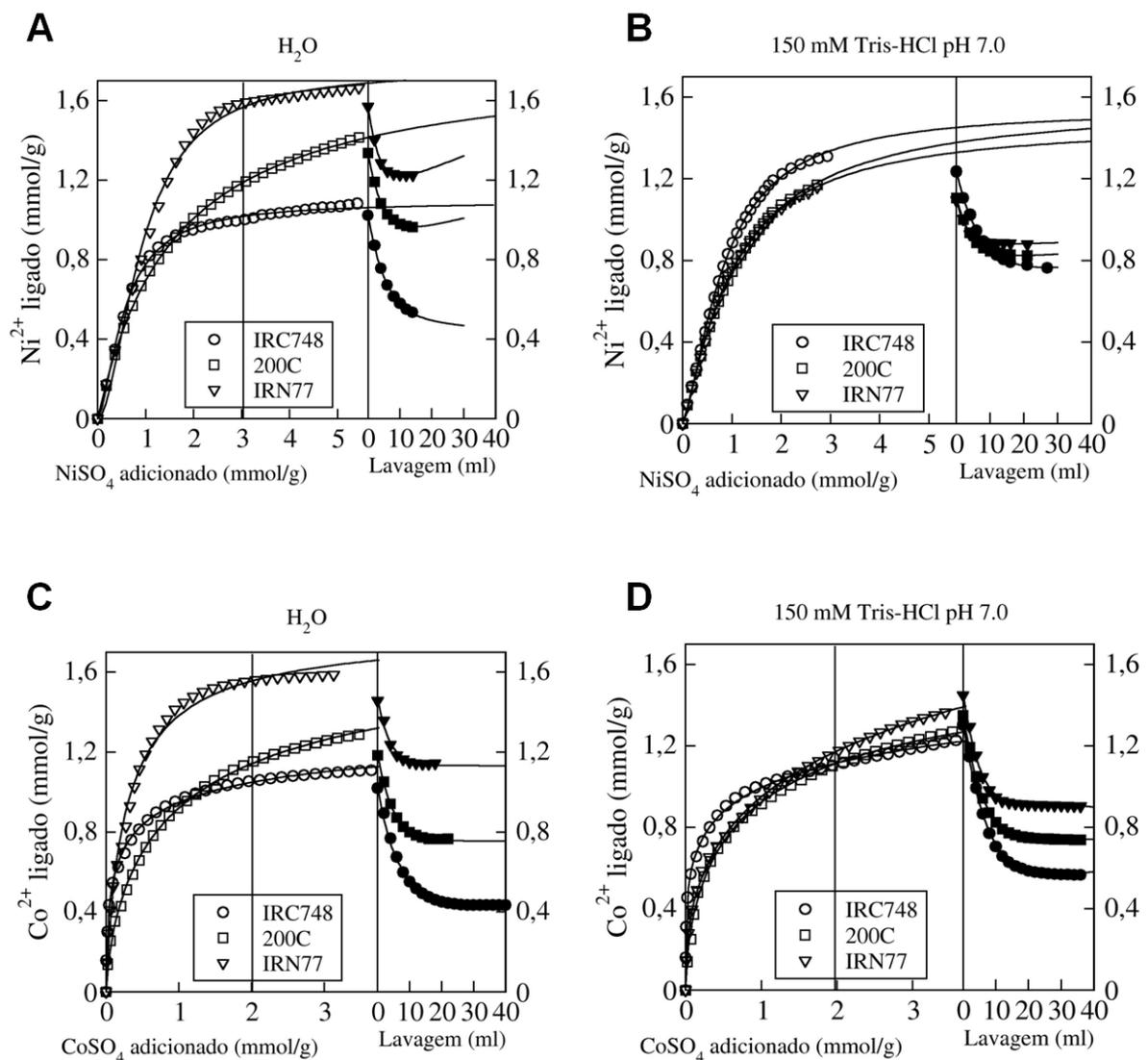
A escolha dos íons metálicos de Níquel e Cobalto está diretamente relacionada à sua aplicação. Os íons divalentes  $Ni^{2+}$  e  $Co^{2+}$  são utilizados para a purificação de proteínas *His-tag* (BLOCK *et al.*, 2009) e para imobilização em suportes sólidos (PEREIRA, 2009). Livres ou imobilizados, estes íons mostram afinidade para a histidina presente em proteínas, e esta, a histidina, é mencionada como a principal contribuinte para a adsorção. Dois ou mais resíduos de histidina internos, localizados na superfície molecular em uma  $\alpha$ -hélice, podem cooperar para formar complexos de íons de metais muito fortes. Dentre esses íons, o  $Ni^{2+}$  é frequentemente usado para a purificação de etapa única de proteínas recombinantes contendo caudas com resíduos de histidina (HEMDAN *et al.*, 1989; FORD, SUOMINEN e GLATZ, 1991; PORATH, 1992; PEREIRA, 2009).

Os experimentos utilizando as Amberlites selecionadas passaram por dois tipos de pré-tratamento:  $H_2O$  deionizada e Tampão Tris-Cl (pH 7.0), que serviram no controle do pH da resina, soluções utilizadas e lavagem dos íons não foram

adsorvidos. Os diferentes tratamentos tem o intuito de verificar o comportamento dos íons metálicos nos diferentes pH das soluções e das resinas.

De acordo com as simulações computacionais realizadas no programa GRACE em uma estação de trabalho Linux (Figura 21), os testes de adsorção realizados nas colunas de fluxo gravitacional para análise da ligação e retenção de íons de Níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) e Cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ) nos três tipos de resinas do grupo Amberlite, mostram uma maior afinidade da resina Amberlite IRN77 com as soluções iônicas de níquel e cobalto, com exceção do gráfico B que apresenta uma maior afinidade do íon níquel com a resina Amberlite IRC748 quando pré-tratada e lavada com tampão Tris-Cl (pH=7).

**Figura 21** – Quantidade de íons  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  (mmol/g) ligados às resinas Amberlites IRC748, 200C e IRN77.

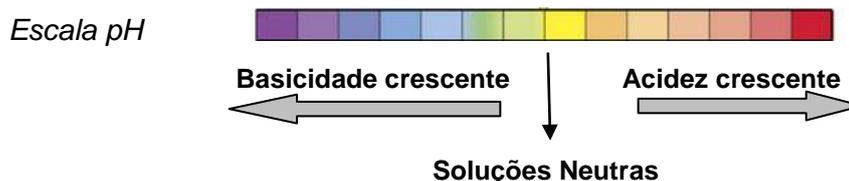


A quantidade de íons  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  carregado e ligado nas diferentes resinas Amberlite mostrou diferença quando pré-tratadas em água (Figura 21A e 21C). No entanto, ao verificar-se o gráfico B e D da Figura 21, é observado um comportamento gráfico mais similar do carregamento e ligação dos íons nos três tipos de resinas quando tratadas com tampão Tris-Cl ( $\text{pH} = 7$ ). Esse comportamento está diretamente relacionado à variação dos valores de pH das soluções e resinas. As resinas apresentaram diferentes valores de pH conforme Tabela 4. O pH da amostra eluída tende a permanecer o mesmo, ou muito próximo, quando utilizado solução tampão. No entanto, ao tratar a resina com água, o pH pode variar no decorrer do experimento, de acordo com o pH da solução que está sendo adicionada.

Analisando a Tabela 4 é notório que os três tipos de resinas Amberlite utilizadas apresentam diferentes escalas de pH. Um dos tipos de resina apresenta pH ácido (IRN77), outro alcalino (IRC748) e outro apresenta um pH neutro (200C). Essa condição foi verificada durante a preparação das resinas para o carregamento das soluções de  $\text{NiSO}_4$  e  $\text{CoSO}_4$ , e indica ser um fator importante na ligação dos íons à resina.

**Tabela 4** – Variação de pH das resinas nos diferentes tratamentos.

	<b>IRC748</b>	<b>200C</b>	<b>IRN77</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	09-11	7	4-6
<b>Tris-HCl</b>	9	7	0-1



Na Tabela 5, verifica-se que a porcentagem de ligação de íons  $\text{Ni}^{2+}$ , neste experimento, variou entre 54% a 90%, dados esses maiores do que apresentado pelos íons  $\text{Co}^{2+}$  que variou entre 41% a 76%. O comportamento desses íons foi contrário nos dois diferentes tratamentos ( $\text{H}_2\text{O}$  e Tris-Cl). O íon  $\text{Ni}^{2+}$  apresentou melhores resultados de ligação quando tratado em tampão Tris-Cl ( $\text{pH} = 7$ ) enquanto que o íon  $\text{Co}^{2+}$  apresentou melhores resultados com água. Apesar de apresentarem

características tão similares, esses íons apresentam diferentes seletividades de acordo com as condições de pH.

**Tabela 5** – Carregamento de íons divalentes de níquel e cobalto (mmol/g) nas resinas Amberlite.

	IRC748			200C			IRN77		
	Carregado	Ligado	%	Carregado	Ligado	%	Carregado	Ligado	%
<b>Ni<sup>2+</sup>. H<sub>2</sub>O</b>	1,10	0,60	<b>54,6</b>	1,40	1,05	<b>75,0</b>	1,70	1,35	<b>79,4</b>
<b>Ni<sup>2+</sup>. TRIS-Cl</b>	1,30	0,80	<b>61,5</b>	1,10	0,90	<b>81,8</b>	1,10	1,00	<b>90,9</b>
<b>Co<sup>2+</sup>. H<sub>2</sub>O</b>	1,00	0,45	<b>45,0</b>	1,20	0,80	<b>66,7</b>	1,60	1,22	<b>76,3</b>
<b>Co<sup>2+</sup>. TRIS-Cl</b>	1,20	0,50	<b>41,7</b>	1,30	0,70	<b>53,9</b>	1,40	0,90	<b>64,3</b>

A análise da Tabela 5 também permite confirmar uma maior afinidade dos três tipos de resinas pelo íon Ni<sup>2+</sup> em relação ao íon Co<sup>2+</sup>, sob as condições propostas nos ensaios realizados. Dentre os três tipos de resinas, a resina IRN77 foi a que apresentou a maior porcentagem de ligação de íons Ni<sup>2+</sup> e Co<sup>2+</sup>. A taxa observada foi superior a 79% para íons Ni<sup>2+</sup>, podendo ligar mais do que 90% desses íons quando o tratamento foi realizado com tampão Tris-Cl (pH = 7). Para os íons de Co<sup>2+</sup> a porcentagem de ligação da resina IRN77 variou entre 64-76%. Em seguida, a resina 200C teve uma porcentagem de ligação entre 75% e 81% para íons Ni<sup>2+</sup> e 53% a 66% para os íons Co<sup>2+</sup>. Por último, a resina IRC748 ligou entre 54-61% de íons Ni<sup>2+</sup> e 41-45% de íons Co<sup>2+</sup>, apresentando a menor taxa de ligação de íons.

O grupamento sulfônico como grupo funcional das resinas Amberlite IRN77 e 200C é um dos fatores que pode contribuir para uma maior quantidade de íons de níquel e cobalto ligados nessas resinas. Estas são quelantes de cátions divalentes e, esta ligação, se dá pelo grupamento sulfonato presente nas mesmas.

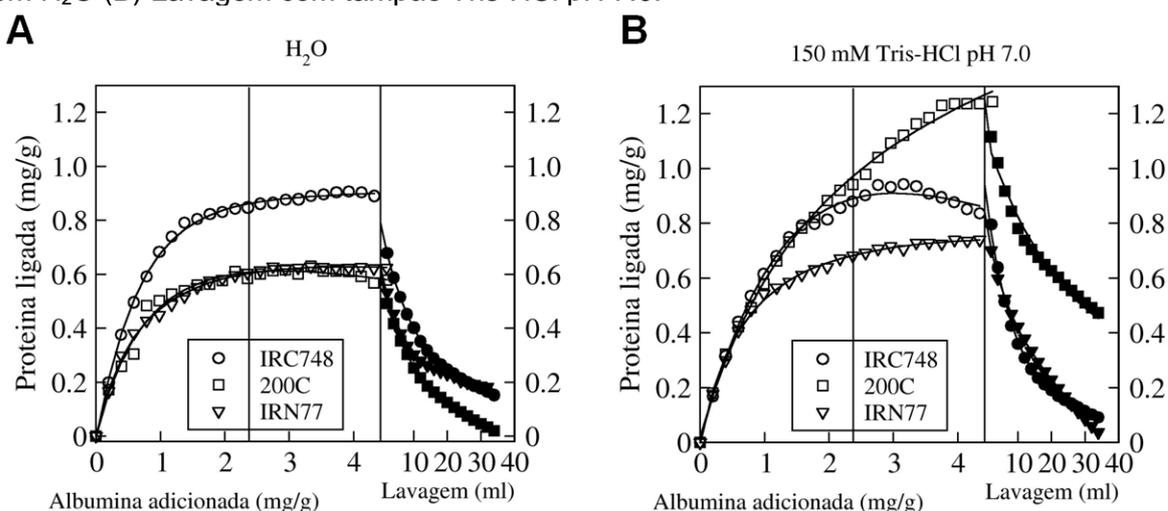
Por fim, os dados analisados nessa seção sugerem que a resina Amberlite IRN77 é potencial ligadora de íons de níquel e cobalto, podendo ser utilizadas em processos industriais que necessitem de adsorção metálica. Para esse estudo, o preparo dessa resina com tampão Tris-Cl (pH = 7) é o mais indicado.

### 5.3.2. Ligação e retenção de proteína inespecífica às resinas Amberlite:

Além da ligação de íons de interesse nas colunas contendo as resinas do grupo Amberlite, a avaliação da taxa de ligação e retenção de proteínas inespecíficas nas resinas, com e/ou sem a adição dos íons metálicos, torna-se necessária para o processo de purificação previsto nesta pesquisa. Quanto menor a concentração de proteínas não específicas retidas na resina, mais indicada é a resina para a etapa de purificação da Lipase *PALB*. Isso porque, em processos industriais a lipase de interesse estará em um meio reacional que contém proteínas consideradas “contaminantes” (ou inespecíficas), que trazem desvantagens como a redução da capacidade de ligação da enzima de interesse, além de dificultar o processo final de purificação.

O carregamento das resinas com a proteína inespecífica foi realizado nos mesmos parâmetros do carregamento dos íons de  $Ni^{2+}$  e  $Co^{2+}$ . Na análise dos gráficos (Programa GRACE), a resina Amberlite IRC748 foi a que mais carregou proteína inespecífica quando pré-tratada com água. Essa resina, juntamente com a resina IRN77, apresentou um maior valor na ligação de proteína inespecífica (Figura 22A).

**Figura 22** – Ligação e retenção de proteína inespecífica nas resinas Amberlite (A) Lavagem com  $H_2O$  (B) Lavagem com tampão Tris-HCl pH 7.0.



O oposto é apresentado no pré-tratamento das resinas com tampão Tris-Cl (pH=7), onde a resina 200C foi a que mais carregou e ligou proteína inespecífica. A análise da curva exponencial apresentada no gráfico indica que o carregamento da

proteína da resina 200C quando pré-tratada em tampão Tris-Cl, não chegou a saturar, podendo ligar quantidades maiores do que a apresentada. Neste caso, o uso da resina 200C (Figura 22B) não é indicado para finalidades que necessitem de um alto índice de pureza, já que a mesma mostrou reter uma quantidade maior de proteínas inespecíficas, podendo tornar o processo de purificação da proteína de interesse mais difícil e custoso.

Observando ambos os gráficos (Figura 22), as resinas que apresentam um resultado mais satisfatório para a etapa de purificação e imobilização de *PALB*, são as resinas Amberlite 200C, quando pré-tratada em água, e a resina IRN77, quando pré-tratada com tampão Tris-HCl (pH=7), por apresentarem taxas mais baixas na capacidade de carregar e ligar a proteína inespecífica. Esses dados são confirmados na Tabela 6 através das percentagens apresentadas da ligação de proteína.

**Tabela 6** – Carregamento inespecífico de proteína (mmol/g) nas resinas Amberlite

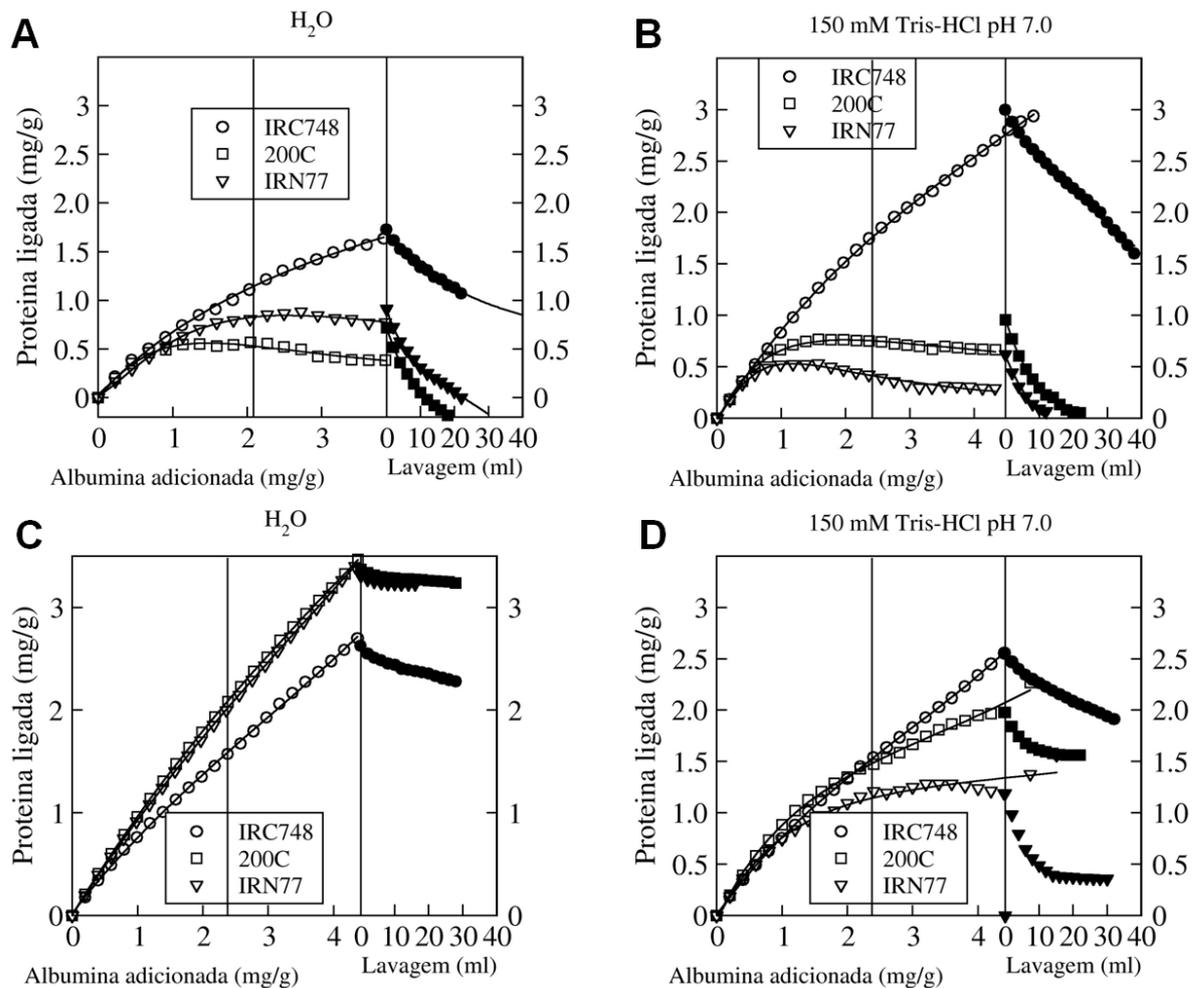
	IRC748			200C			IRN77		
	Carregado	Ligado	%	Carregado	Ligado	%	Carregado	Ligado	%
<b>BSA. H<sub>2</sub>O</b>	0,90	0,19	<b>21,1</b>	0,55	0,02	<b>3,6</b>	0,60	0,20	<b>33,3</b>
<b>BSA. TRIS-Cl</b>	0,85	0,10	<b>11,8</b>	1,26	0,45	<b>35,7</b>	0,70	0,01	<b>1,4</b>

As resinas pré-tratadas com tampão Tris-Cl (pH=7) apresentam uma menor porcentagem de ligação das proteínas inespecíficas, tendo como exceção, a resina 200C que apresentou melhores resultados quando tratada em água. A porcentagem de ligação da proteína na resina Amberlite IRC748 foi alta em ambos os tratamentos, variando entre 11 e 21%. A resina 200C ligou apenas 3% da proteína (H<sub>2</sub>O) e IRN77 1% (Tris-Cl). Assim, a utilização das resinas 200C e IRN77 são mais indicadas para o procedimento de purificação da enzima de interesse por apresentarem uma baixa capacidade de ligação de proteína inespecífica durante o processo. No entanto, o comportamento dessas resinas com os íons selecionados em um meio que possua proteínas inespecíficas ainda se faz desconhecido. Devido a isso, foi necessário reunir os dados encontrados no carregamento dos íons e da proteína padrão para uma avaliação paralela da taxa de adsorção das soluções iônicas divalentes de níquel e cobalto com a proteína inespecífica nas resinas Amberlites.

### 5.3.3. Cruzamento das taxas de carregamento e ligação dos íons divalentes e proteína inespecífica nas resinas Amberlite:

Para essa avaliação, foram utilizadas resinas previamente carregadas com os íons  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ , onde foi adicionada a solução da proteína padrão. Os dados apresentados na Figura 23 nos mostram que em ambos os tratamentos ( $\text{H}_2\text{O}$  e Tris) a resina IRC 748 apresentou elevada capacidade de carregamento e ligação das proteínas inespecíficas quando carregada com íons de níquel. Esses dados também foram observados no carregamento da proteína inespecífica com a resina pura (Item 5.3.2). Ainda nesses gráficos, verifica-se que as resinas 200C e IRN77 apresentaram os melhores resultados com a menor taxa de retenção de proteína inespecífica (Figura 23 - A e B).

**Figura 23** – Carregamento e ligação de proteína inespecífica com íons  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  nas resinas Amberlite.



Quando examinada a ligação de proteínas em resinas carregadas com íons  $\text{Co}^{2+}$ , a taxa de ligação da proteína foi menor quando tratada com tampão Tris-HCl (Figura 23 – C e D). Dentre essas resinas, a Amberlite IRN77 foi a que menos ligou a proteína inespecífica.

A taxa de ligação de proteína inespecífica na resina IRN77 e 200C foram nulas quando essas resinas foram pré-carregadas com íons  $\text{Ni}^{2+}$  (Tabela 7). No entanto, ao verificarmos a quantidade de proteínas carregadas em ambas as resinas, verifica-se que a resina IRN77 apresentou uma concentração menor quando tratada com tampão Tris-HCl (pH=7). Corroborando com os gráficos apresentados na Figura 23, a resina IRC748 apresentou elevadas taxas de ligação das proteínas inespecíficas variando entre 46 e 53% quando carregadas com íons  $\text{Ni}^{2+}$  e, 73 a 84% quando carregadas com íons  $\text{Co}^{2+}$ .

A ligação da proteína nas resinas Amberlite carregadas com  $\text{Co}^{2+}$  foi alta, o que descarta a utilização do cobalto como íon em processos que requerem uma elevada taxa de seletividade da proteína de interesse.

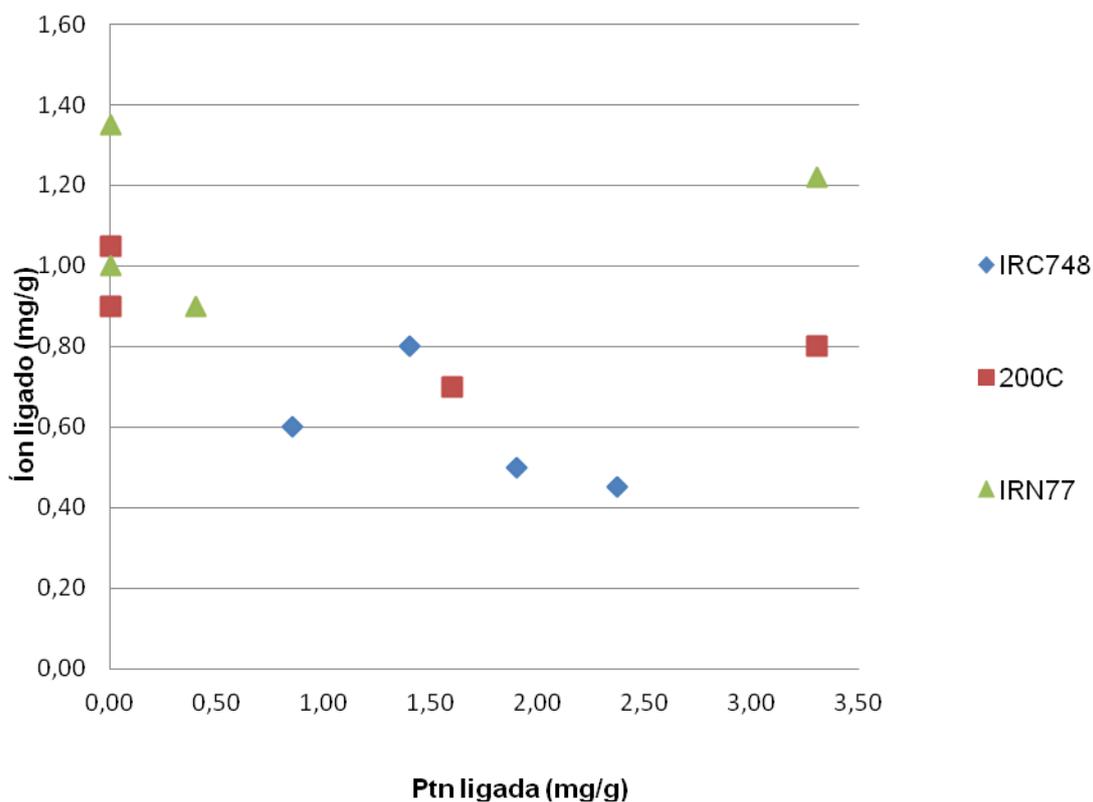
**Tabela 7** – Carregamento inespecífico de proteína padrão (mmol/g) em resinas Amberlite pré-carregadas com íons de níquel e cobalto.

	IRC748			200C			IRN77		
	Carregado	Ligado	%	Carregado	Ligado	%	Carregado	Ligado	%
$\text{Ni}^{2+}$ . $\text{H}_2\text{O}$	0,60	0,85	<b>53,1</b>	0,37	0,00	<b>0,0</b>	0,80	0,00	<b>0,0</b>
$\text{Ni}^{2+}$ . TRIS-Cl	0,80	1,40	<b>46,7</b>	0,70	0,00	<b>0,0</b>	0,25	0,00	<b>0,0</b>
$\text{Co}^{2+}$ . $\text{H}_2\text{O}$	0,45	2,37	<b>84,6</b>	3,50	3,30	<b>94,3</b>	3,45	3,30	<b>95,7</b>
$\text{Co}^{2+}$ . TRIS-Cl	0,50	1,90	<b>73,1</b>	2,00	1,60	<b>80,0</b>	1,10	0,40	<b>36,4</b>

Pela Figura 24 são observadas todas as combinações de resinas utilizadas nesta etapa dos experimentos. Verificando a menor ligação de proteína inespecífica nas resinas ionicamente carregadas, quatro das 12 combinações são mais indicadas para os processos de purificação e imobilização da lipase *PALB*: 200C ( $\text{Ni.H}_2\text{O}$  e  $\text{Ni.Tris-Cl}$ ) e IRN77 ( $\text{Ni.H}_2\text{O}$  e  $\text{Ni.Tris-Cl}$ ). Tendo quatro candidatos para o processo de purificação e imobilização, foi priorizado as opções com o tampão Tris-HCl (pH=7) por ser encontrado na solução da amostra, após etapa de lise celular (Item 4.2). Apesar da resina 200C ser um alvo possível para novos testes, a coluna selecionada para a etapa de purificação e imobilização simultânea da enzima

recombinante de *Pseudozyma antarctica* foi a resina Amberlite IRN77 (Ni.Tris-Cl). O principal fator da escolha foi a quantidade de proteína específica carregada pelas duas resinas. A resina IRN77 carrega uma quantidade menor de proteína inespecífica apresentando uma fraca ligação da resina com as proteínas que não apresentam a cauda de histidina, o que é de grande importância para o processo de purificação, já que, não é de interesse a presença de contaminantes no processo. Essa característica permite um processo de purificação mais rápido e menos custoso.

**Figura 21** – Comportamento das Amberlites com íons metálicos na ligação de proteínas inespecíficas. As combinações de resinas mais próximas ao eixo de íons ligados e com menor concentração de proteína inespecífica ligada são as recomendadas para o processo de imobilização enzimática.



#### 5.4. PURIFICAÇÃO DE PALB NA RESINA AMBERLITE IRN77:

A purificação e imobilização da enzima em passo único é um método fácil e rápido. Este processo permite uma redução do número de etapas para a produção de biocatalisadores enzimáticos, reduzindo o tempo e o custo da produção. Com o

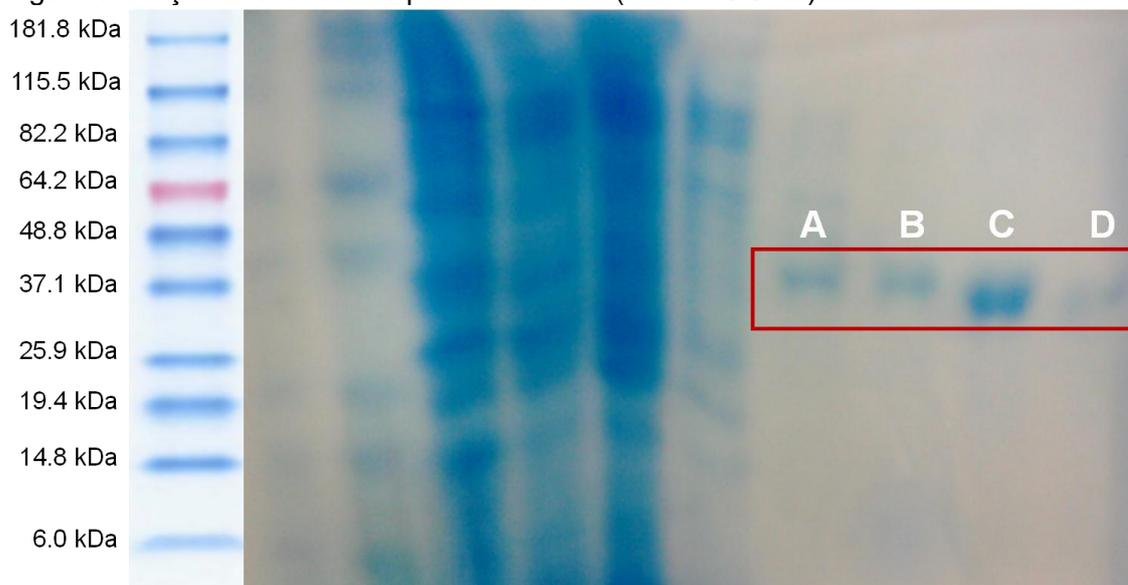
intuito de fornecer as características e propriedades necessárias, a resina Amberlite IRN77 (Ni.Tris-Cl) foi selecionada como suporte para o processo de purificação e imobilização simultâneas da enzima *PALB*.

A primeira etapa consistiu em verificar a presença da His-tag na enzima *PALB*. Para isso, foi utilizada a resina comercial pré-empacotada His GraviTrap TALON, comercializada pela GE (General Electric Company). Essa coluna é destinada para a purificação de pequena quantidade de proteínas recombinantes marcadas com histidina por cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC). A coluna TALON é um suporte pré-carregado com íons de cobalto, que permite a purificação e triagem da amostra de modo simples, rápido, preservando a estrutura nativa da proteína e ainda, permitindo uma elevada seletividade. Além disso, essa coluna de fluxo gravitacional é apropriada para a purificação de proteínas em condições nativas ou desnaturantes, sendo compatível com a maioria dos tampões aquosos utilizados, mesmo na presença de agentes desnaturantes como 6M de Guanidina e 8M de Uréia (GE, 2013).

Constatando a presença da His-tag (Figura 25), os experimentos de purificação foram reproduzidos na coluna com a resina IRN77. Utilizando o protocolo de Akbari *et al.* (2010), uma amostra de lipase purificada na resina IRN77 foi obtida após a etapa de eluição com 250 mM de Imidazol. A purificação da amostra da lipase *PALB* na coluna IRN77 não foi observada por SDS-PAGE, mas foi confirmada pelos resultados dos testes de degradação do substrato pNP realizados nas amostras eluídas durante todas as etapas deste processo (Figura 26).

Apesar de conter agente desnaturante, a amostra de *PALB* apresentou uma atividade de 522U/g em meio aquoso, representando um aumento de mais de 100% da atividade hidrolítica quando comparada com as amostras eluídas na coluna comercial GraviTrap (250U/g). Os dados confirmam que a resina Amberlite IRN77 carregada com Ni.Tris-Cl (pH=7) é um ótimo suporte para purificação de enzimas com His-tag.

**Figura 25** – Eletroforese em gel de poliacrilamida com amostras eluídas na coluna His-GraviTrap TALON. (A) 35mM, (B) 50mM e (C e D) 250mM de Imidazol nas etapas de Lavagem e Eluição. Marcador de peso molecular (INVITROGEN)

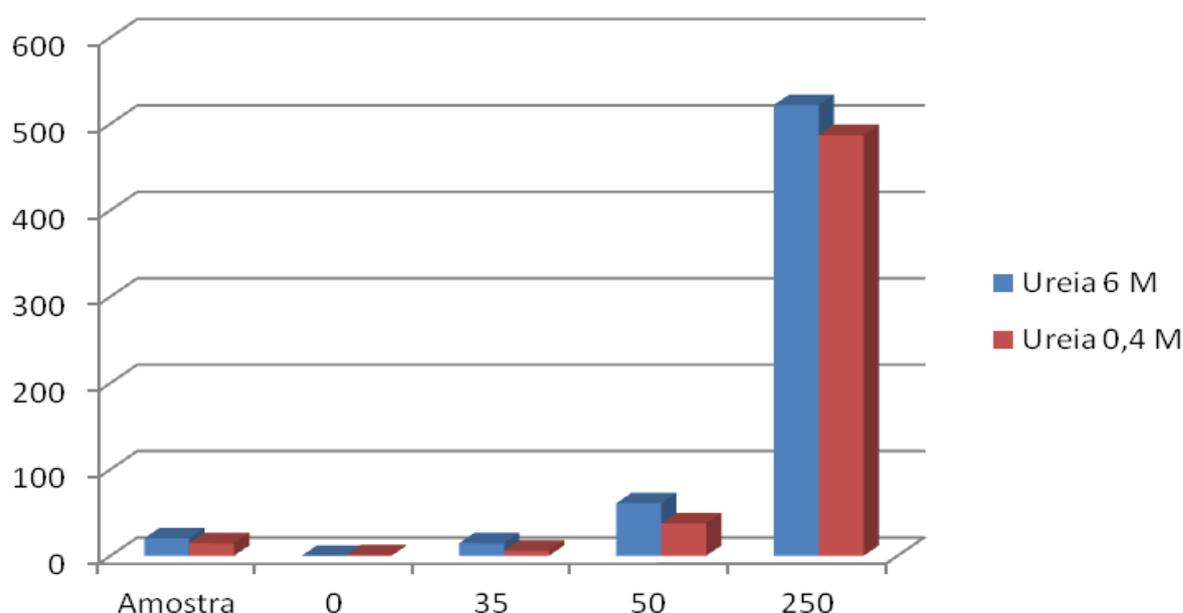


A amostra restante com 6M de uréia - que não foi passada pelas colunas - foi dialisada pela segunda vez para retirada da uréia à 0.4M e *refolding* da proteína. Em seguida, a amostra foi adicionada na coluna IRN77 para um novo processo de purificação onde os resultados da atividade hidrolítica do eluído purificado indicaram resultados semelhantes, 487U/g de proteína (Figura 26). De tal modo, a segunda diálise para retirada do composto desnaturante (uréia) de 6M para 0.4M não é necessária no processo de purificação da enzima na resina Amberlite IRN77. O processo de *refolding* da proteína ocorre na presença do substrato através da diluição da amostra durante a realização do experimento. Esse é um ponto positivo para este trabalho já que Akbari *et al.* (2010) utiliza foldase específica para o processo de refolding da enzima.

Outro ponto positivo verificado é a simplificação do processo de modo a torná-lo mais rápido, fácil e menos custoso. Além de excluir a etapa de diálise do composto desnaturante, foi verificado que não é necessária a lavagem da coluna com 50mM de Imidazol. Ao utilizar uma solução com 50mM de Imidazol, verificou-se que uma determinada quantidade da lipase é liberada durante a lavagem da resina (Figura 26). Os cálculos da atividade hidrolítica apresentaram uma concentração de 61U/g (6M) e 38U/g (0.4M) de proteína com um percentual de 11,7% e 7,8% de

lipase liberada nessa etapa, respectivamente. A quantidade de lipase liberada com 35mM de Imidazol é inferior à 3%.

**Figura 26** – Atividade funcional de *PALB* após carregamento e eluição da resina IRN77. Análise realizada em 5 etapas, antes e depois da diálise de 6M para 0.4M de uréia.



Adicionalmente, foi verificado que a uréia auxilia na retirada da lipase da Amberlite durante as etapas de lavagem com Imidazol. Apesar de a quantidade eluída ser mínima, a utilização do composto desnaturante durante a lavagem da resina IRN77 para o processo de purificação e imobilização simultâneas se faz desnecessária já que a intenção é a retenção total da enzima na resina.

Os experimentos realizados em bancada apontaram para a interferência de compostos no processo de purificação e imobilização da lipase no suporte. A GE Healthcare (2013), fabricante da coluna His GraviTrap TALON, informa que o DTT pode reduzir a capacidade de ligação da proteína na coluna e o EDTA deve ser removido da amostra (por diálise) antes da aplicação na coluna devido a esse composto, remover os íons metálicos do meio provocando uma eluição da proteína. Estudando a interferência de alguns aditivos no refolding da lipase, Akbari *et al* (2010), ressaltou que 10% SDS e 10 mM EDTA reduz na capacidade de *refolding* da proteína. Dentre todos os aditivos estudados pelos autores, apenas o SDS e EDTA tiveram efeito significativo sobre a atividade da Lipase.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo adequado de purificação e imobilização em passo único de enzimas recombinantes, aplicáveis à produção industrial. Os resultados obtidos foram satisfatórios, destacando-se os seguintes dados:

- I. O processo de purificação e imobilização enzimática em passo único ainda não é muito estudado no meio acadêmico, principalmente no Brasil que não detêm nenhuma patente relacionada ao assunto. Foi verificado por prospecção tecnológica que as empresas detêm o maior conhecimento relacionado ao assunto, concentradas principalmente no Japão. Em relação às pesquisas acadêmicas, a China se destaca com a quantidade de patentes depositadas.
- II. Um suporte de baixo custo foi empregado para o processo de purificação e imobilização enzimática. A resina Amberlite IRN77 foi selecionada por apresentar melhores resultados quanto à ligação e retenção de íons de níquel quando pré-equilibrada com tampão Tris-HCl (pH 7.0) e quantidades nulas, ou muito baixas, da ligação de proteína inespecífica.
- III. As amostras purificadas de *PALB* apresentaram uma estimável atividade catalítica em meio aquoso e em meio orgânico em ambas as colunas testadas. Na coluna Amberlite IRN77 a atividade hidrolítica da lipase foi consideravelmente maior do que na coluna comercial.
- IV. O presente trabalho compõe um novo passo para esclarecimento dos mecanismos de purificação e imobilização enzimática em passo único. Através da técnica proposta é possível obter um biocatalisador imobilizado sem necessitar de etapas adicionais, o que permite uma produção menos custosa e mais rápida para uso industrial. Com os dados obtidos a respeito dessa técnica, uma patente está em redação e será depositada junto ao INPI.

## 7. REFERÊNCIAS

ADDGENE: **A better way to share plasmids**. Versão em inglês. 2013. Disponível em: <<https://www.addgene.org/vector-database/2566/>>. Acesso em: 11 out. 2013.

AKBARI, N.; KHAJEH, K.; REZAI, S.; MIRDAMADI, S.; SHAVANDI, M.; GHAEMI, N. High-level expression of lipase in *Escherichia coli* and recovery of active recombinant enzyme through *in vitro* refolding. **Protein Expression and Purification**.v. 70, n. 1, p. 75-80, mar. 2010.

ALMEIDA R. et al. Recuperação de níquel e cobalto presentes em efluentes de mineração. In: 59º CONGRESSO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE MINERAÇÃO, 2004, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Campus, 2004, p. 101-110.

ALMEIDA, V. M. de. **Acilação enzimática de naringina com o ácido 12-hidróxi-9-Z-octadecenóico, catalisada por Lipase B de *Candida antarctica***. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

BARON, A. M.; SARQUIS, M. I. M.; BAIGORI, M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. A comparative study of the synthesis of *n*-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 34, n. 1-6, p. 25-32, jul. 2005.

BLOCK, H.; MAERTENS, B.; SPRIESTERSBACH, A.; BRINKER, N.; KUBICEK, J.; FABIS, R.; LABAHN, J.; SCHÄFER, F. Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. **Methods in Enzymology**, v. 463, p 439-473, 2009.

BORGES, J.G. **Obtenção de Nanofibras via Hidrólise Enzimática de Polpa de Eucalipto por Celulases de *Aspergillus niger* e Produção de Biomassa Extracelular por Fungo Isolado do Cacau**. 2012. 157 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

BORKAR, P.S.; BODADE, R.G.; RAO, S.R.; KHOBRADE, C.N. (2009). Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain - *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 40, n. 2, p. 358-366, mar. 2009.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e Seleção de Fungos Celulolíticos para Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for a quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**. v. 72, n. 1-2, p. 248-254, mai. 1976.

BRENA, B. M.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes: A literature survey. Cap 2. In: **Immobilization of enzymes and cells**. 2. ed. New Jersey: Springer Science & Business Media, 2006. 15-30 p.

- BROD, F. C. A. Expressão, Purificação e Caracterização bioquímica de lipase recombinante de *Staphylococcus xylosus* e esterase recombinante de *Lactobacillus plantarum*. 2010. 111 f. Tese (Doutorado) – Instituto em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- BRUNO, L. M.; LIMA FILHO, J. L.; MELO, E. H. M.; De CASTRO, H. F.; Ester synthesis catalyzed by *Mucor miehei* immobilized onto polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 113, n. 1-3, p. 189-199, mar. 2004.
- CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.A.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMUZU, 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, jan. 2003.
- CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases, **Química Nova**. v. 18, n. 6, p. 544-554, abr. 1995.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, fev. 2004.
- CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. M. F. Síntese de ésteres terpenóides por via enzimática: influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. **Ciência Tecnol. Aliment.** v. 17, n.3, dez. 1997.
- CASTRO, H.F.; ZANIN, G. M.; DE MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA P. Enzimas em Biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado - **Imobilização e Estabilização de Enzimas**, Cap. 6. In: BON, P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.; VERMELHO, A.L.; PAIVA, C.L.A.; ALENCASTRO, R.B.; COELHO, R.R.R. (Org.). 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. v. 1. 506 p.
- CHEPCANOFF, V. **Separação e Recuperação de cromo e outros elementos de valor em soluções de trabalho e resíduos industriais de galvanoplastia por troca iônica**. 2001. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 20, n. 2, p. 193–197, mar. 2004.
- COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- COUTO, G. H. **Caracterização de uma nova lipase isolada de uma biblioteca metagenômica do solo de mangue do Pontal do Sul**. 2009. 113 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, vol.27, n.4, p. 623-630, ago. 2004.

DINIZ, C. V. **Remoção de metais pesados de solução de cloreto de manganês através de resina de troca iônica**. 2000. 140 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

DOW WATER AND PROCESS SOLUTIONS. **Ion Exchange Resins**. Dow. 2013. Disponível em: <[http://www.dowwaterandprocess.com/en/products/ion\\_exchange\\_resins](http://www.dowwaterandprocess.com/en/products/ion_exchange_resins)>. Acesso em: 29 dez. 2013.

ELLIAH, P., PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; TALEB, A.T.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry** v. 39, n. 5, p. 525-528, jan. 2004.

EUROPEAN PATENT OFFICE – EPO. **banco de dados de patentes**. Espacenet. 2003. Disponível em: <[http://worldwide.espacenet.com/advancedSearch?locale=en\\_EP](http://worldwide.espacenet.com/advancedSearch?locale=en_EP)>. Acesso em: jan. 2014.

FARIA, L.A. de. **Hidrólise do Óleo da Amêndoa da Macaúba com Lipase Extracelular de *Colletotrichum gloesporioides* Produzida por Fermentação em Substrato Líquido**. 2010. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

FERNANDES, A. N. **Determinação da acidez de substâncias húmicas de diferentes ambientes**: Avaliação da metodologia empregada. 2003. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

FIAMETTI, K.G. **Desenvolvimento de Técnicas Alternativas de Fluidos Pressurizados e Ultrassom para Produção de Monoglicerídeos e Diglicerídeos a partir da Reação de Glicerólise Enzimática de Óleo de Oliva**. 2012. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.

FORD, C. F., SUOMINEN, I.; GLATZ, C. E. Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**. v. 2, n. 2-3, p. 95-107, abr.-jun. 1991.

FRANCO, P. E. **Remoção de metais pesados utilizando resina Amberlite IR-120 em sistema batelada**. 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2011.

FREITAS, P. A. M. **Estudos de adsorção de di-2-piridil cetona saliciloilhidrazona (DPKSH) em resinas Amberlite XAD-2 e XAD-7**: Extração de íons cobre em fase sólida envolvendo a XAD-7 modificada com DPKSH. 2007. 172 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GE Healthcare Life Sciences. **Affinity chromatography**. GE. 2013. Disponível em: <[https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1334667780708/litdoc29004212\\_20120420102708.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1334667780708/litdoc29004212_20120420102708.pdf)>. Acesso em: 30 dez. 2013.

GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

GRAMACHO, D. R. Enzimas. **Cadernos de Prospeção**. v. 1, n. 1, p. 34-35, 2008.

GRIS, D. **Preparação de ésteres de aroma catalisada por lipases imobilizadas em filmes de amido/PVA**. 2010. 47 f. (Projeto de Estágio Supervisionado pelo Centro de Ciências Físicas e Matemáticas) – Faculdade de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

GUIDINI, C. Z. **Imobilização de  $\beta$ -Galactosidade de *Aspergillus oryzae* em Resinas de Troca Iônica**. 2009. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

GUIDINI, C. Z.; FISHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**. v. 52, n. 2-3, p. 137-143, Nov. 2010.

HARLAND, C. E. **Ion Exchange: Theory and Practice**. 2 ed. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 1994. 285 pp.

HASAN, F.; SHAH A. A.; HAMEED A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HEMDMAN, E.S.; ZHAO, Y.; SULKOWSKI, E. & PORATH, J. Surface topography of histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 86, n.1, p. 1811-1815, 1989.

HIOL, A.; JONZO, M. D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 5-6, p. 421-430, 2000.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their Industrial Applications: An Overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 118, n. 1-3, p. 155-170. 2004.

HUBBARD, K. L.; FINCH, J. A.; DARLING, G. D. Review: Polymers with pendant vinyl groups, including poly(divinylbenzene-co-ethylvinylbenzene). **Reactive & Functional Polymers**. v. 36, n. 1, p. 1-16, 1998.

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

KAO CORPORATION. **Company**. Versão em Inglês. 2014. Disponível em: <<http://www.kao.com/jp/en/corp/>>. Acesso em: 02 jan. 2014.

KIELING, D.D. **Enzimas: Aspectos Gerais**. 2002. 15 f. Produção Técnica (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

KORDEL M.; HOFMANN B.; SCHOMBURG D.; SCHIMID R.D. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. **Journal of Bacteriology**; v. 173, n. 15, p.4836-41, 1991.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2 ed. São Paulo: SARVIER, 1995. 839 p.

LENNTECH WATER TREATMENT AND AIR PURIFICATION. **Rohm and Haas ion exchange resins**. Water Treatment Solutions Lenntech. 2013. Disponível em: <<http://www.lenntech.com/products/resins/rohms-haas/rohms-haas-ion-exchange-resins.htm>>. Acesso em: 30 dez. 2013.

LEUNG, D.Y.C.; WU, X.; LEUNG, M.K.H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083-1095, abr. 2010.

LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 229-245, abr. 1999.

LIN, L.; JUANG, R. Ion-exchange equilibria of Cu(II) and Zn(II) from aqueous solutions with Chelex 100 and Amberlite IRC 748 resins, **Chemical Engineering Journal**, v. 112, n. 1-3, p. 211-218, set. 2005.

LIN, L.; JUANG, R. Ion-exchange kinetics of Cu(II) and Zn(II) from aqueous solutions with two chelating resins, **Chemical Engineering Journal**, v. 132, n. 1-3, p. 205-213, ago. 2007.

LOTTI, M.; ALBERGHINA, L. Lipases: molecular structure and function. Cap. 16. In: POLAINA, J.; MACCABE, A.P. **Industrial Enzymes: structure, function and application**. Valencia: Springer, 2007. 263-281 p.

MADALOZZO, A. D. **Síntese de ésteres etílicos utilizando uma lipase recombinante de *Rhizopus oryzae***. 2011. 149 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MAIOLINI, R. S. S. **Aplicações das enzimas em diagnóstico molecular: Desenvolvimento de um reagente enzimático para determinação de lactato em fluidos biológicos**. 2009. 36 f. Monografia (Especialização) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MALVESSI, E. **Produção de Sorbitol e Ácidos Orgânicos por *Zymomonas mobilis***. 2008. 235 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Ciências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MANOEL, E. A. **Resolução de derivados racêmicos do *mio*-inositol catalisada por lipases**. 2011. 133 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

MAYERHOFF, Z. D. V. L. Uma análise sobre os estudos de prospecção tecnológica. **Cadernos de Prospecção**. v. 1, n. 1, p 7-9, 2008.

MARQUES, A.E.; SILVA, F.; BARBOSA, J.G.; FINGER, F.L. Ação de inibidores de enzimas oxidativas e crescimento bacteriano sobre a longevidade das flores de ave-do-paráíso (*Strelitzia reginae* Aiton). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. v. 17, n. 1, p. 75-86, mai. 2011.

MELO, F. S. D. de. **Recuperação de Metais e Reutilização da água do efluente industrial do processamento de zinco por coluna de troca iônica e adsorção**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais, Centro de Desenvolvimento da tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2006.

MENDES, F. D. **Recuperação de Níquel e Cobalto a partir de Polpas de Lixiviação Ácida de Minério Laterítico pelo emprego de Resinas Poliméricas de Troca Iônica**. 2005. 182 f. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

MENDES, F.D.; MARTINS, A.H. Recovery of nickel and cobalt from acid leach pulp by ion exchange using chelating resin. **Mineral Engineering**. v. 18, n. 9, p. 945-954, ago. 2005.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. de; CASTRO, H. F. de.; GIORDANO, R. de L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**. v. 34, n. 5, p. 831-840, jul. 2011.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MORAIS, L. S. M. M. **Reação de Oligomerização de Eteno com o complexo Ni(MeCN)<sub>6</sub>(BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub> em fase homogênea e imobilizado em resina trocadora de íons, Amberlyst-15**. 1993. 151 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

MOURA, L.F.W.G.; OLIVEIRA, M.V. de; LÔ, M.M.; MOTA, J.G.S.M.; MAGALHÃES, E.A.; LIMA, M da C.L.; MAGALHÃES, F.E.A. Bioprospecção de Atividade Lipolítica de Fungos Anemófilos Isolados do Centro Vocacional Tecnológico (CVT) de Tauá-CE. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.15, n.2, p. 157-165, 2013.

MOURE, V.R. **Estudo da Enantiosseletividade da Lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 na Resolução de Álcoois Alílicos Secundários**. 2009. 126 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MÜLLER, R.L. **Obtenção de Mono e Diacilgliceróis Via Glicerólise Enzimática como Alternativa para Aproveitamento da Glicerina Obtida na Produção de Biodiesel**. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Faculdade

de Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2013.

NOVO NORDISK. **A new company**. Novo Nordisk. 2014. Disponível em: <[http://novonordisk-us.com/documents/article\\_page/document/h\\_newcompany.asp](http://novonordisk-us.com/documents/article_page/document/h_newcompany.asp)> Acesso em: 02 jan. 2014.

OLIVEIRA, S. L. R. de. **Aproveitamento da Casca do Coco Verde (*Cocos nucifera L.*) para Produção de Celulases**. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 742-756, mar. 2009.

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

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de Látex Vegetais: Propriedades e Aplicações Industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006

PAULA, A. V. de; BARBOZA, J. C. S. de; CASTRO, H. F. de. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. **Química Nova**. v. 28, n. 5, p. 792-796, 2005.

PENCREAC'H, G., BARATTI, J. C. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase - A simple test for the determination of lipase activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 18, n. 6, p. 417–422, mai. 1996.

PENCREAC'H G.; BARATTI J.C. Comparison of hydrolytic activity in water and heptane for thirty-two commercial lipase preparations. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 28, n. 4-5, p. 473-479, mar. 2001.

PEREIRA, L. M. Clonagem, Expressão, Purificação e Caracterização estrutural da proteína ribossomal L10 Humana recombinante. 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**. v. 38, n. 7, p. 1077-1082, fev. 2003.

POLITZER, K.; BON, E. P. da S. **Enzimas Industriais e Especiais**. 2006. 580 f. Relatório Técnico – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos Ciência, Tecnologia e Inovação. Rio de Janeiro, 2006.

PORATH, J. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography: Review. **Protein Expression and Purification**. v.3, n. 4, p. 263-281, ago. 1992.

QUINTELLA, C. M.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A.; COSTA NETO, P. R.; TORRES, E. A.; CASTRO, M. P.; JESUS, C. A. C. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. **Química Nova**, v.32, n. 3, p. 793-808. Mar. 2009.

QUINTELLA, C. M.; MEIRA, M.; GUIMARÃES, A. K.; TANAJURA, A. S.; DA SILVA, H. R. G. Prospecção Tecnológica como uma Ferramenta Aplicada em Ciência e Tecnologia para se Chegar à Inovação. **Revista Virtual de Química**. v.3, n. 5, p. 406-415, dez. 2011.

RAHMAN, M.B.A.; TAJUDIN, S.M.; HUSSEIN, M.Z.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; SALLEH, A.B.M.B. Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification. **Applied Clay Science**. v.29, n.2, p.111-116, jan. 2005.

RIANI, J. C. **Utilização de resinas de troca-iônica em efluentes de Galvanoplastia**. 2008. 117 f. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SALUM, T. F. C. **Produção e Imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 para síntese de ésteres etílicos**. 2010. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, M. M. dos. **Utilização de mutagênese aleatória para obtenção da lipase de *Burkholderia cepacia* com variação nas propriedades catalíticas**. 2005. 136 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SANTOS, K.C.R. **Aplicação de resinas comerciais na remoção de cobre presente em lodos galvânicos**. 2006. 128 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R.M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 9, n. 3, p. 199-210, mai. 1998.

SHEK, T.; MA, A.; LEE, V.K.C.; MCKAY, G. Kinetics of zinc ions removal from effluents using ion Exchange resin. **Chemical Engineering Journal**. v. 146, n. 1, p. 63-70, jan. 2009.

SILVA, M. L. **Obtenção de Derivados Químicos de Produtos Naturais Empregando Catálise Convencional e Enzimática**. 2012. 202 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

SIVASHANMUGAM, A.; MURRAY, V.; CUI, C.; ZHANG, Y.; WANG, J.; LI, Q. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Protein Science: a publication of the Protein Society**. v. 18, n. 5, p. 936–948, mai. 2009.

- SOUZA, L. T. A. **Síntese enzimática do biodiesel de *Jatropha curcas* pela rota etílica**. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- STOYTICHEVA, M.; MONTERO, G.; TOSCANO L.; GOCHEV, V.; VALDEZ, B. 2011. The Immobilized Lipases in Biodiesel Production. Cap. 19. In: **Biodiesel – Feedstocks and Processing Technologies**, 2011. 397-410 p.
- STRYER, L. **Bioquímica**, 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. 1000 p.
- SUN, J.; JIANG, Y.; ZHOU, L.; GAO, J. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic médium. **New Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 53–58, fev. 2010.
- TISCHER, W.; WEDEKIND, F. **Immobilized Enzymes: Methods and Applications**. Topics in Current Chemistry, v. 200: Springer, 1999. p. 95-126.
- TISCHER, W. e KASCHE, V. **Reviews Immobilized Enzymes: crystals or carriers?**. v. 17: Elsevier Science, 1999. p. 326-35.
- UPPENBERG, J., HANSEN, M.T., PATKAR, S., JONES, T.A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**. v. 2, n. 4, p. 293-308, abr. 1994.
- URSOIU, A.; PAUL, C.; KURTÁN, T.; PÉTER, F. Sol-gel Entrapped *Candida antarctica* Lipase B – A Biocatalyst with Excellent Stability for Kinetic Resolution of Secondary Alcohols. **Molecules**. v. 17, n. 11, p. 13045-13061, nov. 2012.
- VÉRAS, I. C. **Expressão heteróloga de lipases modificadas para melhoramento do processo de produção enzimática de biodiesel**. 2012. 139 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.
- VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**. v.15, n. 1, p. 32–38, jan. 1997.
- XU, Y.; LEWIS, D.; CHOU, P. Effect of folding factors in rescuing unstable heterologous lipase B to enhance its overexpression in the periplasm of *Escherichia coli*. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 79, n. 6, p. 1035-1044, jul. 2008.
- ZAINOL, Z.; NICOL, M.J. *Ion-exchange equilibria of Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> with iminodiacetic acid chelating resin Amberlite IRC 748*. **Hydrometallurgy**, v. 99, n. 3-4, p. 175-180, nov. 2009.
- ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas imobilizadas. Cap. 4. In: Saiad, S.; Pietro, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004. 35-85 p.
- ZHEJIANG UNIVERSITY OF TECHNOLOGY. **Key Laboratories**. ZJUT. 2014. Disponível em: <[http://www2.zjut.edu.cn/zjut/xyw/ENNEW/web8\\_2.html](http://www2.zjut.edu.cn/zjut/xyw/ENNEW/web8_2.html)> Acesso em: 02 jan. 2014.