UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ARIANA FARIAS MELO

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE NO DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO

Agosto de 2012

Ariana Farias Melo

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE NO DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO

Tese submetida ao corpo docente do curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Fernando Luiz Pellegrini Pessoa
Andréa Medeiros Salgado
Tito Lívio Moitinho Alves

Rio de Janeiro
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

M528p Melo, Ariana farias.

Ariana Farias Melo – 2012.
xxxi, 118f: il.

Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2012.

Orientadores: Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, Andrea Medeiros Salgado e Tito Lívio Moitinho Alves

1. Lipase 2. Biossensor Potenciométrico 3. Biodiesel – Tese I. Pessoa, Fernando Luiz Pellegrini (Oriente). II. Salgado, Andrea Medeiros. III. Alves, Tito Lívio Moitinho. IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processo Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. V. Título.

CDD:572.3

Produção e Aplicação de Lipase no Desenvolvimento de um Biossensor Potenciométrico

ARIANA FARIAS MELO

Proposta de pesquisa de doutorado apresentada ao corpo docente do curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada por:

Orientador (es):

_____

Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, D. Sc

_____

Andréa Medeiros Salgado, D. Sc

_____

Tito Lívio Moitinho Alves, D. Sc

Banca Examinadora

_____

Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, D.Sc

_____

Luiza Cristina de Moura, D.Sc

_____

Mônica Caramez Triches Damaso, D.Sc

_____

Selma Gomes Ferreira Leite , D.Sc

_____

Suely Pereira Freitas D.Sc

Agosto de 2012

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Adriano e Gláucia.

E as minhas alunas de Iniciação, Erica, Laís, Rita e Gabriela.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a elaboração e conclusão dessa tese.

- Primeiramente agradeço aos meus pais Adriano e Glaucia, pelo seu apoio e ajuda em todas as horas, pois sem eles, nada disso seria possível.
- Aos meus irmãos Argos, Arine e Adriana, por me fazer lembrar que é sempre bom voltar pra casa.
- Aos meus orientadores
  - Andrea e Fernando pela orientação e amizade
  - Tito pela orientação
- As minhas alunas de iniciação cientifica Erica Felipe, Laís Oliveira, Rita e Gabriela, como também a todas as meninas do Lab 122, Gabrielle, Rafaela, Laís, Gisele, Paula, Josi, Andrea, Marina e a Lívia que apesar de não estar fisicamente no Lab. sempre está pronta a ajudar quando pedimos e ao Rafael, o sobrevivente no meio de tantas mulheres.
- A minha amiga Fernanda Sales que sempre que pode vem ao Rio me fazer companhia
- Ao CNPq e Faperj pelo suporte financeiro

RESUMO

MELO, Ariana Farias. Produção e Aplicação de Lipase no Desenvolvimento de um Biossensor Potenciométrico. Rio de Janeiro, 2012. Tese (Doutorado em ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O uso de enzimas para fins analíticos vem aumentando, principalmente no ramo da biotecnologia associado à criação de novos instrumentos de análises cada vez mais específicos. Como consequência, o desenvolvimento de biossensores vem crescendo, já que estes permitem que a medida do analito de interesse seja realizada pela transdução seletiva de um parâmetro da reação biocomponente-analito em um sinal elétrico passível de ser monitorado. Enquanto os métodos clássicos são geralmente laboriosos ou exigem um pré-tratamento da amostra, os biossensores oferecem o recurso de detecção em linha de um analito com mínimo tratamento da amostra. Além disso, por haver a presença de um biocomponente, os biossensores são específicos para um dado analito, proporcionando respostas rápidas e gerando menos resíduos para o meio ambiente, ao contrário do métodos tradicionais. Nesta tese, a enzima lipase foi escolhida como biocomponente para a construção de um biossensor. Essa escolha foi realizada em função da característica que essa enzima possui, como fornecer respostas rápidas, sua especificidade e a possibilidade de ser imobilizada em um suporte vítreo atendendo as exigências para composição de um biossensor. O transdutor que compõe os biossensores pode ser amperométrico, potenciométrico, óptico ou calorimétrico. No presente trabalho, foi utilizado um transdutor potenciométrico, com o objetivo de quantificar o produto gerado da reação da lipase em amostras de biodiesel. A enzima lipase foi selecionada para ser aplicada no biossensor desenvolvido, pois é capaz de hidrolisar triglicerídeos (ésteres) liberando ácidos graxos livres e íons H^+, como produto da reação, que podem ser quantificados e a qualidade do biodiesel pode ser certificada. No trabalho foram utilizados dois extratos enzimáticos, sendo um de *Aspegillus niger* e o outro de *Yarrowia lipolítica*, e lipase comercial tipo VII obtida a partir de *Candida rugosa* da marca Sigma.

Para avaliar a eficiência das lipase selecionadas foram realizados ensaios de determinação da atividade hidrolítica em amostras de biodiesel, bem como em óleos vegetais usados na sua produção, em conjunto com o eletrodo de pH, utilizado como transdutor. A lipase comercial foi testada na forma livre e imobilizada em pérolas de vidro. Os resultados obtidos com a lipase comercial apresentaram um melhor desempenho para a construção do biossensor. O sistema (lipase comercial / eletrodo) apresentou respostas com 15 min a pH 8,75 e 37 ºC. A corrente (mV) produzida foi proporção à concentração de amostra (350-17.500 mM de ácido graxo livre). Uma boa correlação (R^2 = 0,9285) foi encontrada mostrando um bom desempenho para a detecção potenciométrica de ésteres/triglicerídeos em óleos e biodiesel. Portanto, um novo método potenciométrico foi desenvolvido e validado para a determinação da degradação de amostras de biodiesel empregando biossensor enzimático potenciométrico, para ser aplicado no Monitoramento da Qualidade de Biodiesel.

Palavras-chave: lipase, biossensor, biodiesel

ABSTRACT

MELO, Ariana Farias. Produção e Aplicação de Lipase no Desenvolvimento de um Biossensor Potenciométrico para Triglicerídeos. Rio de Janeiro, 2012. Tese (Doutorado em ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

The use of enzymes for analytical purposes is increasing, mainly in the field of biotechnology associated with the design of new analytical tools even more specific. Thus, the development of biosensors has increased, since they allow the measurement of the desired analyte to be carried by the selective transduction of a biocomponent-analyte reaction parameter to an electrical signal that can be monitored. While the traditional methods are usually time consuming and require a pretreatment of the sample, the use of biosensors provides on-line detection of an analyte with minimal sample treatment. Furthermore, due to the presence of a biocomponent, biosensors are specific to a given analyte, allowing quick responses and generating less waste to the environment, unlike the traditional methods. In this work, the enzyme lipase was chosen as the biocomponent for the design of a new biosensor due to its attractive features such as specificity, to provide rapid responses, and to the possibility of being immobilized on a support glass that meets the requirements for the composition of a biosensor. The biosensor transducer can be amperometric, potentiometric, optical or calorimetric. In this study, we used a potentiometric transducer, in order to quantify the product generated from the reaction of lipase in biodiesel samples. The lipase enzyme was selected for the biosensor because it can hydrolyze triglycerides (esters) releasing free fatty acids and H^+ ions, as the reaction products, which can be quantified and the quality of biodiesel can be certified. Two enzymatic extracts were utilized, *Aspergillus niger* and *Yarrowia lipolytica* , and also free and immobilized lipase type VII derived from *Candida rugosa* by Sigma. The efficiency of the lipase selected was assessed by performed experimental essays to determine the hydrolytic activity in samples of biodiesel, as well as in the vegetable oils used in its production, using pH electrode as a transducer. The commercial lipase

was tested in the free and immobilized form onto glass beads. The results obtained with the commercial lipase performed better for the design of the biosensor. The system (commercial lipase / electrode) showed responses to 15 min at pH 8.75 and 37 °C. The current (mV) generated was proportional to the concentration of the sample (350-17500 mM free fatty acid). A good correlation (R^2 = 0,9285) was found showing a good performance for the potentiometric detection of esters / triglycerides in oils and biodiesel. A new potentiometric method was developed for determining the degradation of samples of biodiesel employing an enzymatic potentiometric biosensor for Monitoring the Quality of Biodiesel.

Keywords: lipase, Biosensor, biodiesel

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1: Esquema geral de funcionamento de um biossensor (adaptado de Arya, *et al*., 2008). 20

Figura 2.2: Esquema geral de um biossensor potenciométrico. (A) biocatalizador, (B) membrana semi-permeável, (C) interface do potencial elétrico gerado (D) eletrodo externo. (Hossain *et al* 2010) 27

Figura 3. 1 - Curva de peso seco para *Yarrowia lipolítica* 40

Figura 3. 2 - Curva de peso seco para *Candida rugosa* 41

Figura 3.3: Descrição química da reação no processo de imobilização (Melo *et al* 2006) 42

Figura 3.4 – Esquema da reação que ocorre pela ação da lipase em um éster 46

Figura 3.5 – Esquema geral da montagem para determinação potenciométrica usando enzima lipase livre ou imobilizada. 47

Figura 4. 1 - Esquema da ação da lipase em um éster. 48

Figura 4. 2 - Sistema de análise proposto (1- Bomba peristáltica, 2- câmara reacional, 3- Transdutor de pH) 49

Figura 4. 3 – Atividade residual do sobrenadante durante o processo de imobilização, (♦) tampão, (■) tampão + PEG 50

Figura 4. 4 - Atividade do sobrenadante durante o processo de imobilização com extrato concentrado (60 % de $(NH_4)_2SO_4$) 54

Figura 4. 5 - Variação da diferença de potencial em diferentes concentrações de p-NPL (Curva de linearidade dos extratos enzimáticos) (a) *Yarrowia lipolytica* (b) *Aspergillus niger*. 57

Figura 4. 6 - Atividade dos extratos de lipase, (■) *Aspergillus niger* (▲) *Yarrowia lipolytica*, em função da concentração de ácidos graxos presentes nas emulsões óleo soja:água. Ensaios realizados em pH 7,0 (*Yarrowia lipolytica*) e pH 4,0 (*Aspergillus niger*) a 37ºC 59

Figura 4. 7 - Valores de variação de potencial em amostra de óleo soja com extrato enzimático de *Yarrowia lipolytica* (a) 20% v/v e (b) 50%v/v de óleo de soja (c) extrato de *Aspergillus niger* com 50% v/vde óleo de soja. 62

Figura 4. 8 - Superfície de resposta para (a) atividade (U/ml) e (b) variação de potencial 67

Figura 4. 9 - Decaimento da atividade enzimática do sobrenadante durante o processo de imobilização enzimática 68

Figura 4. 10 - Efeitos das variáveis independentes estudadas para enzima 71

Figura 4. 11 - (a) Variação de potencial em resposta a ação da atividade da lipase na forma livre em amostras de azeite de oliva em diferentes concentrações (b) parte linear. 73

Figura 4. 12 - Variação de potencial em resposta a ação da atividade da lipase na forma livre em amostras de biodiesel em diferentes concentrações 74

Figura 4. 13 - Avaliação da estabilidade de resposta do sistema transdutor com o tempo de reação (▲) 5 min (▲) 10 min (▲) 15 min, (a) Azeite de oliva (744 mM), (b) Biodiesel (1413,56 mM). 75

Figura 4. 14 - Curva de calibração para o biossensor enzimático 77

Figura 5. 1 - Curva de crescimento *Yarrowia lipolítica.* 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. 1- Produção de lipase por leveduras variando as condições de processos. 10

Tabela 2. 2 – Efeito da fonte de carbono para produção de lipase 13

Tabela 2. 3 – Proporção de isoenzimas (adaptada de Domínguez de María *et al* 2006) 14

Tabela 2. 4 – Comparação entre os processos enzimático e alcalino para produção de biodiesel (Robles-Medina et al. 2009) 17

Tabela 2. 5 – Biossensores aplicando lipase como biocomponente 23

Tabela 2. 6 – Exemplos de biossensores potenciométricos (Cabral *et al* 2003) 27

Tabela 2. 7 – Divisão dos métodos analíticos por grupos segundo Lôbo *et al* 2009 32

Tabela 4. 1 – Dados do processo de imobilização da Lipase de *Aspergillus niger*. 52

Tabela 4. 2 – Atividade dos extratos com processo de concentração. 54

Tabela 4. 3 – Atividade da lipase de *Aspergillus niger* imobilizada (extrato concentrado) 55

Tabela 4. 4 – Atividade hidrolítica utilizando azeite de oliva como substrato 56

Tabela 4. 5 – Variação de potencial (Mv) obtidos pela ação dos extratos enzimáticos no substrato (p-NPL). 57

Tabela 4. 6 – Atividade dos extratos em diferentes substratos. 60

Tabela 4. 7 – Equações do coeficiente de correlação do modelo linear invertido e das constantes cinéticas para os extratos de lipase. 61

Tabela 4. 8 – Variação de potencial em amostras de óleo de soja com diferentes concentrações. 64

Tabela 4. 9 – Atividade dos extratos enzimáticos usando biodiesel com substrato 64

Tabela 4. 10 – Variação de potencial em amostras de biodiesel com diferentes concentrações 65

Tabela 4. 11 – Faixa de valores estudados para o estudo da influencia do Ph e força iônica 66

Tabela 4. 12 – Resultados obtidos no DCCR 22 para influência do Ph e força iônica 67

Tabela 4. 13 – Estimativa dos efeitos para atividade (U/Ml) 68

Tabela 4. 14 – Faixa de valores estudados para o estudo da influencia do Ph temperatura para lipase imobilizada 70

Tabela 4. 15 – DCCR 2^2 para influência da temperatura e do Ph 71

Tabela 4. 16 – Respostas do biossensor enzimático para amostras de Biodiesel antes e após o processo de oxidação 79

Tabela 5. 1 – Níveis das variáveis independentes estudadas no delineamento fatorial 2^{5-1}. 82

Tabela 5. 2 – Matriz do planejamento com os valores codificados e com os resultados experimentais. 83

Tabela 5. 3 – Efeitos estimados, desvio padrão e teste-t, calculados para o delineamento fatorial 2^{5-1} tento como resposta a atividade hidrolítica do p-nitrofenil laurato 85

Tabela 5. 4- Atividade lipásica (U/Ml) nos meios de composição 1 e 2 em diferentes valores de Ph 87

Tabela 5. 5 – Níveis das variáveis independentes estudadas no delineamento fatorial 2^{4-1} 88

Tabela 5. 6 – Matriz do planejamento com os valores codificados e com os resultados experimentais. 89

Tabela 5. 7 – Cálculo dos desvios dos pontos centrais 70

Tabela 5. 8 – Resultados do teste da cinética de produção de lipase – Atividade lipolítica (U/Ml) 92

Tabela 5. 9 – Atividade lipolítica (U/Ml) com meio modificado 93

SUMÁRIO

CAPITULO 1 INTRODUÇÃO . 1

CAPITULO 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5

2.1 - Lipase 6

2.2 – Produção de lipase 8

2.3 - Aplicação industrial das lipases e reações catalisadas pela lipase 14

2.4 - Biossensor 18

a)Funcionamento de um biossensor 19

b)Componentes de um biossensor 20

Componente biológico 20

Transdutor 24

c) Principais características de um biossensor 25

2.5 – Biossensor potenciométrico 25

2.5.1 – Principio de funcionamento de um eletrodo de pH 28

2.6 - Aplicação de Biossensores na área de Biocombustíveis 29

2.7- Considerações Finais 32

CAPITULO 3 MATERIAIS E MÉTODOS 33

3.1 - Materiais 33

a) Reagentes 33

b) Suporte para Imobilização das Lipases 34

c) Equipamentos 34

d) Microrganismo 34

3.2. – Método de preservação das células de leveduras 34

3.3 – Determinações Analíticas 35

a)Determinação da Atividade Lipásica 35

i. Método Espectrofotométrico para determinação da atividade hidrolitica da lipase em p-nitrofenil laurato 35
ii. Método Titulométrico 37

b)Método de determinação do Teor de Proteína 37

3.4 - Cultivo das levedura *Candida rugosa* e *Yarrowia lipolítica* 38

a) Preparo do Inóculo 38

i. *Candida rugosa* 38

ii. *Yarrowia lipolítica* 38

3.5 – Quantificação da Concentração Celular 39

3.6 – Experimentos para Produção de Lipase 40

3.7 – Procedimento de Imobilização das Lipases no Suporte 40

a) Cálculo de Rendimento de Imobilização e Atividade Recuperada 42

3.8 – Avaliação dos parâmetros cinéticos 43

a) Determinação da taxa de reação (v_o) 43

b) Determinação dos parâmetros cinéticos V_{MAX} e K_m 43

3.9 – Pré-purificação do extrato enzimático de lipase 44

3.10 – Determinação da variação de potencial usando o transdutor (eletrodo de pH) pela ação da enzima lipase livre e imobilizada. 45

3.11 – Ensaios de estabilidade à oxidação 46

CAPÍTULO 4 – BIOSSENSOR ENZIMÁTICO 47

4.1 – Construção do Biossensor Enzimático 47

4.2 – Extrato Enzimático de *Aspergillus niger* 48

4.2.1 – Processo de Imobilização do extrato enzimático 49

4.2.2 – Concentração do Extrato Enzimático 51

4.3. – Extrato Enzimático de *Yarrowia lipolítica* 54

4.4 – Comparação entre os Extratos Enzimáticos de *Aspergillus niger* e *Yarrowia lipolítica* usando como substrato *p*-nitrofenil laurato 55

4.5 – Comparação entre os Extratos Enzimáticos de *Aspergillus niger* e *Yarrowia lipolítica* usando como substrato amostras reais (azeite de oliva e óleo de soja) 57

4.6 – Lipase comercial (Lipase de Candida rugosa tipo VII Sigma-Aldrich). 63
4.6.1 – Influência do pH e da força iônica na atividade 63

4.6.2 – Processo de Imobilização 66

4.6.3 – Testes usando o sistema de análise biossensor potenciométrico 71

a) Testes com enzima lipase comercial de *Candida rugosa* livre 71

b) Testes com enzima lipase comercial de *Candida rugosa* Imobilizada 74

4.6.4 – Estimativa da Qualidade das amostras de biodiesel de soja aplicando o sistema biossensor desenvolvido 76
CAPÍTULO 5 – PRODUÇÃO DE LIPASE 78

5.1 – Produção de lipase de *Candida rugosa* 78

5.2 – Produção de lipase de *Yarrowia lipolítica* 82

5.2.1 – Seleção do meio de cultivo 82

5.2.2 – Avaliação da influencia dos componentes dos meio de cultivo 84

5.2.3 – Padronização do inóculo 86

5.2.4 – Cinética da produção de lipase 87

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES 90

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 91

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO

As enzimas lipolíticas constituem um importante grupo de enzimas com grande potencial para aplicação biotecnológica. As lipases (EC 3.1.1.3) fazem parte de um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e à hidrolise dos lipídios amplamente distribuídos na natureza. Trata-se de uma classe de enzimas que apresenta a capacidade de catalisar a hidrólise total ou parcial de triglicerídeos de cadeias longas. Estas enzimas apresentam uma característica de atuarem na interface água/óleo catalisando, preferencialmente, a hidrólise de ésteres de ácidos graxos insolúveis em água, o que as diferencia de outras esterases que agem sobre ésteres solúveis (Dalla-Vecchia *et al.*2004). O reconhecimento dessa característica tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial (Castro *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de tecnologias utilizando lipase para a síntese de novos compostos está expandindo rapidamente. No entanto, o campo mais importante de aplicação de lipase ainda é a sua adição em detergentes. Porém outros campos de aplicação de crescente importância são o uso de lipase nas indústrias de óleos e gorduras, laticínios, papel e celulose, alimentos, cosméticos e farmacêuticos. Na indústria de papel, a lipase é utilizada para remover os componentes hidrofóbicos da madeira, como triacilgliceróis e ceras, que causam alguns problemas durante a fabricação do papel (Reis *et al* 2009) .

Estudos sobre a aplicação de lipases para obtenção de biodiesel, principalmente o uso em conjunto com etanol é uma relação atrativa ambientalmente, pois, utiliza um reagente e um catalisador renováveis, diminuindo assim os resíduos de todo o processo. Deste modo, as lipases vêm conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais para esta finalidade. O uso de lipases para produção de biodiesel é importante, considerando-se o crescimento da utilização desse biocombustível em âmbito

mundial, não somente pelo aspecto de meio ambiente, mas, principalmente, por se tratar de uma fonte de energia renovável.

Outro aspecto atual e importante na área de biodiesel relaciona-se à garantia da sua qualidade, sendo necessário estabelecer padrões de qualidade, objetivando fixar teores limites dos contaminantes que não venham prejudicar a qualidade das emissões da queima, bem como o desempenho, a integridade dos motores e a segurança no transporte e manuseio. Devem ser monitoradas também degradações do produto durante o processo de estocagem. Para tanto testes físico-químicos e de caracterização química de alto custo são necessários, o que nem sempre é possível realizar (Lobo e Ferreira, 2009). Tal fato vem impulsionando estudos que visem desenvolver métodos ou instrumentos de análises mais rápidos, precisos e viáveis. Permitindo assim que mesmo instalações simples e/ou postos de abastecimento, possam realizar determinações, a fim de verificar a qualidade do combustível produzido, na identificar se este atende aos padrões de especificação.

O desenvolvimento de biossensores enzimáticos usando lipase pode ser uma alternativa para minimizar partes dos problemas relacionados às dificuldades na hora de realizações das análises necessárias para controle da qualidade do biodiesel, pois os biossensores pertencem a uma classe de instrumentos que tem como principal vantagem a sua alta especificidade. Estes instrumentos apresentam a capacidade de combinar a especificidade de um componente biológico ativo para o analito de interesse, com a sensibilidade de um transdutor capaz de converter o sinal biológico em um sinal elétrico proporcional à concentração do analito. Outras vantagens apresentadas pelos biossensores são sua ampla aplicação seja esta laboratorial ou industrial, o fornecimento de resultados rápidos, facilidade no processamento dos dados, baixo custo por análise e fácil utilização.

Na área de combustíveis e biocombustíveis outros biossensores e métodos aplicando sistemas de análise como FIA (Sistema de Análise por Injeção em fluxo), foram desenvolvidos á nível de pesquisa, pelo grupo de pesquisa em Sensores Biológicos (Biossensores) da Escola de Química da

UFRJ. Dentre estes, destacam-se os testados e aplicados na quantificação de etanol (Salgado et al, 2000; Salgado et al, 2004), etanol em gasolina (Alhadeff *et al,* 2004; Alhadeff *et al,* 2005; Alhadeff *et al*, 2007; Alhadeff *et al*, 2008) e metanol adicionado em gasolina como forma de adulteração (Rodrigues, 2006; Rodrigues *et al*, 2007). No entanto, pouco é encontrado na literatura sobre a aplicação destes instrumentos na área de biodiesel, indicando, portanto este trabalho como uma inovação nesta área.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo a construção de um biossensor potenciométricos, para monitoramento de um dos índices da qualidade do biodiesel.

Com o intuito de se alcançar o objetivo principal do presente projeto de pesquisa, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Avaliar três lipases de diferentes fontes, com o objetivo de selecionar aquela que seja a mais eficiente para a aplicação da proposta no presente trabalho. Neste caso foram comparadas lipases de *Candida rugosa, Aspergillus niger, Yarrowia lipolytica* e Lipase comercial tipo IV da Sigma em amostras de óleo vegetal e biodiesel, quanto a sua atividade catalítica.
- Avaliar um processo de obtenção de lipase microbiana para aplicação em um biossensor potenciométrico.
- Estabelecer método de análise, que possa ser aplicado no desenvolvimento do biossensor, e que seja capaz de avaliar a qualidade do biodiesel quanto ao grau de degradação presente no mesmo. Neste caso testes preliminares visando a escolha do componente biológico, transdutor e suas condições ótimas de atuação foram efetuados.

Este trabalho encontra-se estruturado em seis capítulos da seguinte forma:

- Capítulo I – trata da introdução do trabalho onde é apresentado um panorama geral do assunto.

- Capítulo II – traz os embasamentos teóricos pertinentes à análise dos resultados, através de uma revisão bibliografia referentes ao tema desta tese.
- Capítulo III – descreve as metodologias e materiais utilizados no desenvolvimento do presente trabalho.
- Capítulos IV e V – apresenta os resultados obtidos bem como as discussões comparando com os resultados encontrados na literatura.
- Capítulo VI – relata as conclusões obtidas ao longo do estudo, as considerações finais sobre o tema desta tese e as sugestões para continuidades da linha de pesquisa.
- Capítulo VII – apresenta as referências bibliográficas.

CAPÍTULO 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A produção e o uso de enzimas em processos industriais é uma área em expansão movida pela diversidade natural das enzimas e também devido à disponibilidade de técnicas modernas para o melhoramento e otimização na seleção, produção, estabilização e modificação das enzimas industriais. Estas técnicas possibilitam a inserção de biocatalisadores nos processos industriais por contribuírem também na viabilidade econômica (Rozzell,1999).

Entre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases . As razões do potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com: (Villeneuve *et al* 2000, Hasan *et al* 2006, Dalla-Vecchia *et al* 2004; Alvarez-Macarie *et al* 1999).

i) sua alta estabilidade em solventes orgânicos;
ii) não requerem a presença de co-fatores;
iii) possuem especificidade pelo substrato e,
iv) exibem uma alta enantiosseletividade.

O reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização da enzima lipase, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial. Atualmente, o maior consumidor da enzima lipase é a indústria de detergentes, na qual é usada geralmente em combinação com outras enzimas (proteases e celulases), sendo responsável pela remoção de manchas de gordura, tais como fritura, manteiga, azeite, molhos entre outros.

Segundo Castro *et al* (2004), a enzima lipase que já está estabelecida no mercado de produção de detergentes é a *Lipolase* (lipase produzida por *Humicola lanuginosa* lipase-Novozymes), que é empregada na formulação de um grande número de marcas importantes de detergentes em todo mundo, desde 1988.

Embora, atualmente, as aplicações industriais das lipases estejam concentradas nas indústrias de detergentes, novas aplicações vêm se estabelecendo nos mais diversos campos, tais como indústria de química fina, biocombustíveis, cosméticos, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel, no tratamento de resíduos industriais e no desenvolvimento de biossensores (Hasan *et al* 2006). As enzimas lipases vêm deste modo, conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais.

2.1-Lipases

Enzima lipases ou triglicerol acil-hidrolases (EC 3.1.1.3) são enzimas classificadas como hidrolases que possuem a capacidade de atuar sobre ligações éster presentes em triglicerídeos (acilgliceróis), liberando como produtos ácidos graxos e glicerol (Dalla-Vecchia *et al* 2004). Também são capazes de catalisar a reação inversa (síntese) em solventes orgânicos anidros, sendo possível controlar o tipo de catálise (hidrólise ou síntese) pelo equilíbrio da atividade da água presente na mistura da reação (Villeneuve *et al* 2000).

Ao se utilizar lipases como biocatalisadores é preciso levar em considerações algumas peculiaridades de seu mecanismo de ação. Vários estudos têm revelado duas diferentes conformações das enzimas lipases (Sandstrom *et al* 2012, Ericsson *et al* 2008) Uma onde o acesso ao sítio ativo da enzima esta fechado através de um oligo-peptídeo hidrofóbico, chamado de tampa ou "*lid*", que cobre a entrada do sítio ativo deixando-o completamente isolado do meio de reação (nesta conformação a lipase é considerada inativa) e a segunda conformação ocorre quando há ligação do substrato na superfície da enzima; esta tampa desloca-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, deixando o sítio ativo acessível ao substrato. Ao mesmo tempo, a enzima expõe uma larga superfície de caráter hidrofóbico, o que facilita sua ligação a interface. Nesta conformação a lipase é considerada ativa. Este fenômeno é conhecido como "ativação interfacial" (Buchholz *et al*., 2005). Logo, as lipases preferencialmente atuam em interfaces água-óleo, ou água-solvente orgânico, e a "ativação interfacial", relaciona o aumento da atividade da lipase

em função de substratos insolúveis, ou seja, as lipases atuam preferencialmente em substratos emulsionados (Sharma *et al*., 2001).

Esta superfície hidrofóbica apresentada pelas lipases quando estão em sua forma “aberta” / ativa, faz com estas enzimas tenham uma grande afinidade por qualquer tipo de meio apolar. Muitos trabalhos relatam a adsorção de lipases em diversas estruturas hidrofóbicas, como, gotas de óleos (Basri *et al*., 1995), suportes hidrofóbicos, tais como Amberlite, poli (ácido carboxílico), poliacrilonitrila e resinas constituídas de estireno e divinilbenzeno (Oliveira *et at,* 2000, Fernández-Lafuente *et al,* 2007), bolhas de ar, outras proteínas hidrofóbicas (Saxena *et al*, 2003), etc.

Outra caracteriza da lipase é a existência de iso-enzimas. López *et al*., (2004) relataram a presença de três tipos de isoenzimas conhecidas (Lip1, Lip2 e Lip3), e que exibem diferenças distintas na sua especificidade pela substrato (Mancheño *et al* 2004). *Lip*1 mostra um comportamento de afinidade por ésteres de cadeia longa, enquanto *Lip*2-*Lip*3 apresenta afinidade por ésteres de cadeia curta solúveis em água (Domínguez de María *et al,* 2006). A concentração de cada isoenzima determina as características das lipases (Mancheño *et al,* 2004)

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 e 75 kDa, são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40ºC (Hasan *et al,* 2006; Castro *et al*, 2004). Lipase de *Candida rugosa* apresentam isoenzimas com massa molecular de 60,8; 61 e 57,6 para *Lip* 1, *Lip* 2 e *Lip* 3 (Mancheño *et al,* 2004), respectivamente com faixa de atuação em torno de 28 a 45ºC e pH entre 5-9 (Ting *et al*, 2006).

Lipase de *Yarrowia lipolítica* apresenta atividade em uma faixa de temperatura de 30 a 45ºC com uma temperatura ótima de atuação a 37ºC. Com relação ao pH a faixa de atuação encontra-se entre pH 6 a 8, em pH acima de 8 apresenta uma redução significativa. de sua atividade (Mingrui *et al*, 2007; Fickers *et al,* 2006; Corzo e Revah 1999; Destain *et al,* 1997).

Lipase de *Aspegillus niger* produzida por fermentação semi-solida apresentou atividade ótima em pH 7,0 a 37ºC, com uma ampla faixa de estabilidade térmica entre 4ºC e 50ºC e ao pH entre 4,0 e 10 (Ellaiah *et al,* 2004; Kamini, *et al,* 1998). Já lipase de *Aspergillus niger* NCIM 1207 (Mahadik *et al,* 2008) apresentou algumas propriedades em comum com outras lipases de *Aspergillus niger*, como estabilidade em uma ampla faixa de pH, em pH 2,5 apresentou 70% de atividade residual e para pH 9,0 apresentou 50% de atividade residual após 24 h de incubação à temperatura ambiente, exceto o pH óptimo de 2,5.

2.2-Produção de Lipase

Lipases podem ser obtidas por fonte de origem vegetal, animal ou microbiana. A preferência para a utilização industrial recai sobre as lipases de origem microbiana, sendo, frequentemente, mais úteis que as de origem vegetal e animal. Tal fato pode ser justificado, entre outras razões, pela variedade de microrganismos que as produzem, pela possibilidade de manipulação genética, e pelo rápido crescimento dos microrganismos em meios de baixo custo (Hasan *et al*., 2006)

Assim muitos estudos têm sido realizados para definir condições ótimas de cultivo de microrganismos com a finalidade de atender as necessidade nutricionais para produção de lipase por culturas submersas. A produção de lipase é influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, pH do meio de cultivo, temperatura de crescimento e pela concentração de oxigênio dissolvido (Gupta *et al*., 2004).

Na Tabela 2.1 estão apresentados alguns trabalhos encontrados na literatura que relatam a produção de lipase utilizando leveduras.

Comparando os dados relatados na Tabela 2.1 nota-se valores diferentes de atividade para o mesmo microrganismo. Casa *et al,* (2002) utilizando *Candida rugosa* ATCC 14830 em biorreator de 50L conseguiu um valor máximo de atividade de 7,0 U/mL, Gordillo *et al* (1998) utilizando a mesma levedura e um meio similar ao utilizado por Casa *et al (*2002) em um

biorreator de 6L apresentou 117U/mL de atividade. Essa diferença, contudo pode ser explicada pelo método dosagem de atividade escolhido por cada um.

Tabela 2. 1 – Produção de lipase por leveduras variando as condições de processos.

Microrganismos	Fonte de Carbono	Composição do Meio	Condições de cultivo	Tipo de processo	Método de atividade	Atividade obtida	Referência
Trichosporon fermentans WU – C12	Azeite de oliva	Meio de Sais	30ºC; pH 5,5; 120rpm; 96hs	"Shaker"	Método Titulométrico Substrato - Azeite de oliva	128 U/mL	Chen *et al,* 1992
Rhodotorula mucilagenosa P11I89	Óleo de palma	Meio de Sais	30ºC; 200 rpm; 48hs	"Shaker"	Método espectrofotométrico *p*-nitrofenil palmitato	1,29 U/g substrato	Srimhan *et al,* 2011
Cryptococcus sp. S-2	trioleína	Extrato de lêvedo; KH_2PO_4; $MgSO_4$ ·7H2O	25ºC; 100rpm; pH 5,6	"Shaker"	Método espectrofotométrico *p* - nitrofenil laurate	64 U/mL	Kamini *et al,* 200
Candida rugosa (ATCC 14830)	Ácido oleico	Meio de sais com; Vitaminas B1, B7, B8; Anti-espumante	30ºC, pH 6,3, 500 rpm	Biorreator	Método titulométrico Substrato –Tributirina	7,0 U/mL	Casa *et al,* 2002
Candida rugosa (ATCC 14830)	Ácido oleico	Meio de sais com Vitaminas B1, B7, B8	30ºC, pH 6,3, 500 rpm; 20hs	Biorreator	Método Titulométrico Substrato - Azeite de oliva	8,54 U/mL	Wei *et al*, 2004
Candida rugosa (DSM 2031)	Azeite de oliva e maltose	Peptona, extrato de lêvedo e malte, ureia, sais	72hs, pH 7 30ºC 180rpm	"Shaker"	Espectrofotométrico (Azeite método modificado Satarik 1991	12,55 U/mL	Benjamin e Pandey 1996
Candida rugosa (ATCC 14830)	Ácido palmítico	Meio de sais com; Vitaminas B7, B8, B1, B2, B6, B5, B3; Ácido fólico	30ºC pH 6,2 150 rpm	"Shaker"	Método Turbidimetria Substrato Trioleina	5,3 U/mL	Dalmau *et al,* 2000

Tabela 2.1 – Produção de lipase por leveduras variando as condições de processos (cont.)

Microrganismos	Fonte de Carbono	Composição do Meio	Condições de cultivo	Tipo de processo	Método de atividade	Atividade obtida	Referência
Candida rugosa (ATCC 14830)	Ácido oleico	Meio de sais com; Vitaminas B1, B7, B8	30ºC; 500 rpm; pH 6,3; 40hs	Biorreator	Método espectrofotométrico *p* - nitrofenil laurate	117 U/mL	Gordillo *et al,* 1998
Candida rugosa (ATCC 14830)	Ácido oleico	Meio de sais com; Vitaminas B1, B7, B8	30ºC; pH 6,3 400 rpm; (20% de O2 saturado)	Biorreator	Método espectrofotométrico Substrato - Tributirina	Lip 1 = 240 U/mg Lip 3 = 250 U/mg	Sánchez *et al,* 1999
Candida rugosa (DSMZ 2031)	Trioleina	Meio de sais com Ureia;Vitaminas B1, B7, B8	30ºC; 500 rpm pH 6,2 inicial,	Biorreator	Método Titulométrico Substrato - Azeite de oliva	23,30U/mL	Takaç *et al.*, 2010
Yarrowia lipolytica (CBS6303)	Ácido oleico	NH_4Cl; Extrato de lêvedo; Peptona	29ºC, pH 6,8, 150 rpm; 40hs	"Shaker"	Método espectrofotométrico Substrato – p-nitrofenil butirato	0,65 UmL^{-1} mg cel^{-1}	P.Fickers *et al,* 2005
Yarrowia lipolytica (DSM 3286)	Azeite de oliva	KH_2PO_4; K_2HPO_4; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; $CaCl_2$; NaCl; extrato de lêvedo	30ºC, pH 7,0, 280 rpm; 48hs	Biorreator	Método Titulométrico Substrato - Azeite de oliva	34,6 U/mL	Darvishi *et al.*, 2011
Yarrowia lipolytica 681	Azeite de oliva	Meio de sais com glicose; uréia; inositol; d-biotina; Tiamina;	30ºC, pH 4,5, 200 rpm, 60hs	"Shaker"	Método espectrofotométrico Substrato - Tributirina	32 U/mL	Corzo e Revah 1998
Yarrowia lipolytica (CBS6303)	Azeite de oliva	$(NH4)_2SO_4$; Glicose; licor de milho; soro pó	29ºC; pH 7,0; 27hs	Biorreator	Método Titulométrico Substrato - Azeite de oliva	28 U/mL	J. Destain *et a,l* 1997
Yarrowia lipolytica w29	azeite de oliva	$(NH4)_2SO_4$; Glicose; licor de milho; soro pó;	29ºC; pH 6,5 120rpm, 53hs	Biorreator	Método Turbidimetria Substrato Azeite de oliva	1118 U/mL	Fickers *et al,* 2006

O fator nutricional de maior importância na produção de lipase é a fonte de carbono, pois são enzimas induzíveis sendo geralmente produzidas na presença de fontes lipídicas, como óleos, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, sais biliares e glicerol (Sharma *et al.,* 2001, Gupta *et al*., 2007). O óleo de oliva é uma fonte lipídica amplamente utilizada devido à alta quantidade de ácido oléico presente nesta matéria-prima, sendo este considerado em alguns estudos o melhor indutor para a produção de lipases (Gordilho *et al*., 1998).

As condições nutricionais e físico-químicas têm sido amplamente estudadas na produção de lipases por microrganismos em cultivos submersos. Lin *et al*. (2006) testaram diversas fontes de carbono, nitrogênio, minerais e vitaminas na produção de lipases por *Antrodia cinnamomea* e obtiveram a maior atividade lipolítica (54 U/mL) utilizando 50 g/L de glicerol, 5 g/L de $NaNO_3$ e 1 g/L de tiamina, pH inicial de 5,5 e temperatura de 25ºC.

Burket *et al*. (2004) otimizaram as condições de cultivo para produção de lipase por *Geotrichum sp.* e obtiveram 20 U/mL de atividade lipolítica utilizando óleo de soja e água de maceração de milho (130 – 150 g/L) como fontes de carbono, NH_4NO_3 (21 – 25 g/L) como fonte de nitrogênio, sendo os cultivos realizados a 30ºC.

Utilizando um meio com sais, 5 g/L de óleo de gergelim e 0,1 g/L de traços de elementos (vitaminas), Maia *et al*. (2001) obtiveram atividade lipolítica máxima de 0,89 U/mL utilizando *Fusarium solani* em 100 horas de cultivo, com pH inicial e temperatura de 5,5 e 28ºC, respectivamente.

Já para produção de lipase a parti de *Aspergillus terreus* em meio com sais, com 2 g/L de glicose, 1 g/L de caseína e 20 g/L de óleo de milho emulsificado (100 g/L de goma acácia) conseguiram um atividade lipolítica de 14,2 U/mL (Gulati *et al*., 2000).

Dalmau *et al,* (2000) avaliaram a influência da fonte de carbono na produção de lipase extracelular utilizando *Candida rugosa* como também no crescimento do microrganismo. A maior produção de lipase foi obtida quando o ácido palmítico (fonte lipídica) foi utilizado como fonte de carbono, sendo maior do que a atividade obtida quando se utilizou ácido oleico, indutor comumente

utilizado. Nos ensaios que foram utilizados fontes de carbono não lipídicas houve um aumento de biomassa, porém para glicose, glicerol e lactado de sódio não foi possível detectar a produção da lipase apenas aumento de biomassa (Tabela 2.2).

Tabela 2. 2 – Efeito da fonte de carbono para produção de lipase (Dalmau *et al.,* 2000)

Fonte de Carbono	Biomassa (g/L)	Atividade de Lipase Extracelular (U/mL)	$Y_{Lipase/Biomassa}$ (U/mg_{cel})
Glicose	0,97	0	0,00
Galactose	0,85	0,1	0,12
Manitol	1,10	0,1	0,09
Glicerol	1,25	0	0,00
Lactado de sódio	0,44	0	0,00
Acido Palmítico	1,23	5,3	4,31
Ácido oleico	1,55	0,4	0,26
Trioleína	1,61	0,3	0,19
Tween 80	0,75	0,4	0,53

Após tal verificação Dalmau *et al* 2000 continuaram seus estudos fazendo um "mix" de substratos de forma que a levedura possa utilizar como de fonte de carbono, uma fonte lipídica e outra não, porem não obtiveram um aumento no valor de atividade quando comparados aos encontrados utilizando apenas o ácido palmítico ou acido oléico, ocorrendo uma diminuição no valor de atividade no extrato enzimático obtido com ácido palmítico com glicose (0,4 U/mL), ou galactose (0,4 U/mL) ou manitol (0,4 U/mL) ou lactado de sódio (0,5 U/mL). Com o ácido oleico esse valor de atividade se manteve, ocorrendo apenas uma diminuição quando o "mix" foi com glicose (0,1 U/mL).

Além da fonte de carbono, especialmente óleos vegetais (Sharma *et al.*, 2002; Hemachander *et al.*, 2001), a concentração de oxigênio disponível para os microrganismos também é um parâmetro importante para a produção de lipases. Muitos trabalhos têm demonstrado o aumento da produtividade das lipases em sistemas com alta transferência de oxigênio (María *et al.,* 2006; Hasan *et al.,* 2006, Amaral *et al.*, 2007).

Ferrer *et al., (2001)* comparou produção de lipase entre diferentes processos de produção (batelada, batelada alimentada e batelada alimentada constante) utilização ácido oleico como indutor. Os melhores resultados de produção de lipase foram obtidos em processos de batelada alimentada com taxa específica de crescimento constante (117 U/mL).

Domínguez de María *et al.,* (2005, 2006) realizaram um estudo com *Candida rugosa* comparando qual seria a relação entre a fonte de carbono (como indutor) utilizada e o perfil isoenzimatico (Lip1, Lip2, Lip3) dos extratos obtidos. Com os dados listados na Tabela 2.3 é possível verificar que a proporção entre Lip1, Lip2 e Lip3 variaram com as condição de produção.

Assim podemos verificar que a característica do extrato de enzimático de lipase de *Candia rugosa* obtido pode ser controlada através do controle das condições de processo.

Tabela 2. 3 - Proporção de isoenzimas (adaptada de Domínguez de María *et al* 2006)

Fonte de Carbono	Tipo de Processo	Condições de operação	Isoenzimas			Referências
			Lip1	Lip2	Lip3	
Ácido oleico	Batelada	30ºC; pH 6,3; 400rpm	0	50	50	Sánchez *et al.*, 1999 Ferrer *et al.*, 2001
		28ºC; pH 6,3; 280-480rpm; 72hs	0	60	40	Dominguez de María *et al.*, 2005
	Batelada alimentada (alta taxa de alimentação)		15	38	47	López et al 2004
	Batelada alimentada (baixa taxa de alimentação)	30ºC; pH 6,3; 400rpm	0	50	50	Sánchez *et al.*, 1999
Azeite de oliva	Batelada	28ºC; pH 6,3; 280-480rpm; 72hs	0	73	27	Dominguez de María *et al.*, 2005
Óleo de Girassol	Batelada	28ºC; pH 6,3; 280-480rpm; 72hs	0	73	27	Dominguez de María *et al.*, 2005

2.3- Aplicação Industrial das Lipases e Reação Catalisadas pela Lipase

As lipases dominam cerca de 5% do mercado mundial de enzimas. Entretanto nota-se uma inclinação ao crescimento deste mercado, devido ao crescente número de aplicações ainda em desenvolvimento (Hasan *et al.,* 2006).

As propriedades peculiares das lipases têm propiciado um vasto crescimento nas aplicações dentro da indústria de óleos e gorduras. Dentre as características interessantes que as lipases apresentam para está indústria, pode ser citada, a sua capacidade hidrolítica, e a de síntese de ésteres em baixas concentrações de água. Assim, a utilização de lipases em processamentos oleoquímicos tem resultado na redução dos gastos de energia e na minimização de problemas relacionados à degradação térmica durante os processos de alcoólise, acidólise e hidrólises de triglicerídeos (Sharma *et al*., 2001).

A tecnologia da aplicação de lipases pela indústria alimentícia tem utilizado as reações de hidrólise e síntese com o objetivo de reduzir algumas gorduras presentes na manteiga de cacau, que dificultam a sua utilização na fabricação de chocolates. Estas enzimas também são amplamente utilizadas no melhoramento de textura de massas, pela indústria de panificação; na redução do período de maturação de alimentos cárneos e queijo; no desenvolvimento de aromas e sabores; na hidrólise de gorduras do leite; na modificação de gorduras presentes em manteigas, na produção de condimentos e essências, dentre outras aplicações (Freire e Castillho, 2000; Sharma *et al*., 2001).

Os ácidos graxos poli-insaturados livres e seus mono e diglicerideos são subsequentemente usados para produzir uma variedade de produtos farmacêuticos, como anti-inflamatórios, dentre outros. As lipases também estão sendo utilizadas no processo de produção de outros medicamentos como antidepressivo, anti-hipertensivos e vasodilatadores (Hasan *et al.,* 2006).

A indústria de cosméticos e perfumaria tem desenvolvido processos, que empregam lipases na produção de emulsificantes, aromas, surfactantes e

emolientes que fazem parte da composição de cremes (Leal, 2000, Sharma *et al.*, 2001).

A utilização das lipases no tratamento da polpa de papel tem contribuído consideravelmente para a decomposição de resinas nos cilindros de secagem, tornando desnecessárias as limpezas freqüentes destes cilindros, fato este que afetava a produtividade e a qualidade do papel (Freire e Castilho, 2000; Sharma *et al.,* 2001).

Segundo Oliveira *et al.,* (2006) as lipases também podem ser utilizadas para acelerar os processos de degradação de gorduras em detritos industriais e no tratamento de efluentes. Atualmente, aplicação de lipases tem sido também sugerida na degradação biológica e remoção de cargas lipolíticas de efluentes industriais gerados em frigoríficos, abatedouros e indústria de alimentos que contém elevados teores de gorduras apresentam elevada Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). A degradação biológica desses rejeitos é um processo lento, tendo como etapa limitante a liberação de ácidos graxos pelos microrganismos com atividade lipolítica. Assim a adição pode auxiliar na redução do tempo de retenção hidráulica e aumentar significantemente a eficiência do processo.

Algumas lipases produzidas através de fermentações em estado sólido já estão sendo utilizadas na realização de hidrólise enzimática de efluentes de laticínios, como etapa que antecede ao tratamento biológico em reator de lodo ativado de batelada sequencial. Os resultados obtidos com os efluentes previamente hidrolisados mostram que é possível se obter remoção de Demanda Química de Oxigênio (DQO) acima de 90%, independentemente do teor de gordura no meio (Cammarota *et al.*, 2001).

No campo dos bicombustíveis a transesterificação enzimática utilizando lipases para produção de biodiesel apresenta alguns pontos positivos que podem minimizar alguns problemas relatados pelo o uso da catálise alcalina (Tabela 2. 4). Entre eles cita-SE, as enzimas não formam sabões e podem esterificar os ácidos graxos livres, o glicerol pode ser facilmente recuperado sem tratamento complexo, o consumo de energia no processo é mais baixo, há uma drástica redução na quantidade de efluentes e as enzimas podem ser

reutilizadas, quando usadas no processo na forma imobilizada (Harding *et al.*, 2008; Fjerbaek;*et al* , 2009; Halim *et al*. 2009). Além disso, a presença de água nas matérias-primas não é deletéria para as lipases, enquanto em um processo alcalino, a água pode hidrolisar o óleo, formando sabão (Robles-Medina *et al.*, 2009).

A produção do biodiesel em escala industrial utilizando lipases, no entanto, não tem sido adotada principalmente devido ao alto custo do biocatalisador, e o tempo de reação ser lento quando comparados aos outros processos (Li *et al*, 2007; Ranganathan *et al*, 2008). Por este motivo, encontrar processos que reduzam o custo de aplicação do processo enzimático torna-se importante.

Tabela 2. 4 - Comparação entre os processos enzimático e alcalino para produção de biodiesel (Robles-Medina et al. 2009)

Problemas	Processo	
	Enzimático	**Alcalino**
Presença de ácidos graxos livres no óleo	ácidos graxos livres são transformados em biodiesel	ácidos graxos livres são transformados em sabão
Presença de água no óleo	não é deletério para a lipase	pode hidrolisar o óleo, formando mais sabão
Conversão em biodiesel	alto, geralmente em torno de 90%	alto, geralmente >96%
Recuperação do glicerol	fácil, glicerol de alta qualidade	complexa, glicerol de baixa qualidade
Recuperação e reutilização do catalisador	fácil	difícil ou inviável
Custo energético	baixo, faixa de temperatura entre 20-50℃	médio, faixa de temperatura entre 60-80℃
Custo da catálise	alto	baixo
Impacto ambiental	baixo	médio, efluentes alcalinos e salinos são gerados
Produtividade do processo	baixo	alto

Uma área importante de aplicação das lipases é no desenvolvimento de biossensores, As lipases podem ser imobilizadas em eletrodos de pH ou de oxigênio (este caso utiliza-se a enzimas glicerol quinase e glicerol 3-fosfato), que em conjunto funcionam como biossensor de lipídeos, que estão sendo desenvolvidos para determinação de triglicerídeos em amostras de sangue (Pudir *et al* 2010 Setzu *et al* 2007; Minakshi e Pundir 2008; Hasan *et al* 2006).

2.4-Biossensores

O uso de enzimas para fins analíticos vem crescendo a cada dia, desde a década de 60, quando Clark e Lyons (1962) tiveram a idéia de usar uma enzima aliada a um eletrodo para determinação de glicose para controle de diabetes. Neste caso um sensor foi desenvolvido baseado na oxidação de glicose a ácido glicônico, envolvendo consumo de oxigênio e formação de peróxido de hidrogênio por ação da enzima glicose oxidase, de forma que o oxigênio ou peróxido consumido poderiam ser detectados (Mirón *et al.,* 2002; Fang *et al.,* 2003).

Posteriormente os dispositivos criados a partir da junção de uma enzima com um eletrodo receberam o nome de “Eletrodos Enzimáticos”. Contudo, com o desenvolvimento intensivo na busca de novos sensores físico-químicos, em especial, utilizando-se reações enzimáticas variadas, foi introduzido um termo mais genérico e abrangente, “Biossensor” (Alfaya *et.al*, 2002; Rosatto, 2000).

A ciência dos biossensores é uma área multidisciplinar para a qual não existe forma delineada. A rápida proliferação dos biossensores e sua diversidade podem justificar as várias formas de definição de um biossensor que se encontram na literatura. De forma geral trata-se de uma ferramenta analítica que combinam biomoléculas imobilizadas com transdutores químicos ou físicos (Riccardi *et al.,* 2002) para criar uma superfície que permita a medição direta, possivelmente contínua, de um analito específico (Hossain *et al.,* 2010).

Assim, um biossensor combina a especificidade de um componente biológico ativo para o analito de interesse com a sensibilidade de um transdutor para converter o sinal biológico em um sinal elétrico proporcional à concentração do analito (Salgado, 2001). Um biossensor deve ser claramente diferenciado de um sistema bioanalitico que requer etapas adicionais de processamento, tal como, a adição de reagentes e o componente biológico não está necessariamente ligado diretamente ao detector.

Os biossensores fornecem informações analíticas quantitativas usando um elemento biológico reconhecedor incorporado a um transdutor que deve ser capaz de converter a resposta química em um sinal apropriado. O elemento chave do biossensor é a camada sensora, constituída por biomoléculas, que permite avaliar a concentração de componente desejado contido na amostra. A escolha do material biológico e do transdutor adequado depende de cada amostra e do tipo de medida em que se tem interesse. O biocomponente determina o grau de seletividade ou especificidade do biossensor. O reconhecimento seletivo é a principal característica da tecnologia dos biossensores. Diferentes materiais para transdutores tem sido empregados na construção dos biossensores sendo os eletroquímicos os mais populares, pois apresentam resposta rápida, possuem a vantagem de serem econômicos e a possibilidade de automação, permitindo sua aplicação em um grande número de amostras (Mello *et al.*, 2007; Perez, 2000).

O desenvolvimento dos biossensores, em particular, é definido pelas exigências regulatórias e natureza da aplicação destes. Alguns fatores desempenham um papel decisivo na arquitetura do sensor como sensibilidade, meio ambiente de amostra, custo, tempo de vida útil e uso especifico. Além disso, para ser usado como instrumento de análise, o biossensor deve apresentar as seguintes características: seletividade, exemplificada pela especificidade das enzimas; faixa de sensibilidade; acurácia e precisão; tempo de resposta e de recuperação; freqüência de amostragem; estabilidade operacional e reprodutibilidade dos resultados, entre outros. (Arya *et al.*, 2008, Rosatto, 2000).

a) Funcionamento de um biossensor

Uma característica dos biossensores que os diferencia dos sensores químicos é a especificidade da análise. As divisões da química analítica e físico-química da IUPAC propuseram uma definição para biossensores: “um biossensor é um dispositivo que é capaz de fornecer informação analítica ”especifica”, quantitativa ou semi-quantitativa usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) o qual está em contato espacial direto com um elemento de transdução”. Então, de um modo geral, um biossensor é formado de duas partes: o componente biológico e o transdutor (Cabral *et al.,* 2003)

O funcionamento de um biossensor, de uma forma geral, envolve a especificidade e alta sensibilidade do componente biológico que faz o reconhecimento da substância de interesse por meio de uma reação química (Figura 2.1). Em seguida como produto desta interação entre a molécula biológica e o substrato, variações de um ou mais parâmetros físico-químicos (concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança de estado de oxidação), são convertidos em um sinal elétrico quantificável e processável pelo uso de um transdutor adequado (Salgado, 2001; Perez, 2000, Arya *et al.*, 2008).

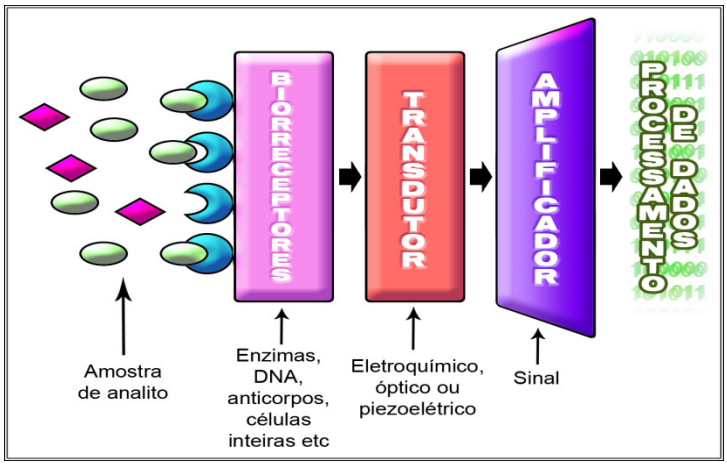


Figura 2.1: Esquema geral de funcionamento de um biossensor (adaptado de Arya *et al.*, 2008).

b) Componentes de um biossensor

Componente Biológico

Para o componente biológico a seletividade, habilidade para discriminar um entre diferentes substratos, é uma das características mais importantes de um biossensor, é uma função principal, embora algumas vezes o transdutor também contribua para a seletividade.

Alguns requisitos básicos são exigidos na escolha de um biocomposto para atuar como elemento de reconhecimento biológico, como disponibilidade de um sítio reativo que posso reagir/ interagir com o analito, estabilidade face ao meio e as condições de medição e possibilidade de modificação/ imobilização sobre suporte por método químico sem afetar o seu desempenho (Salgado, 2001). Baseado nestas exigências alguns biocompostos se adéquam para o uso na composição dos sensores, sendo que as enzimas foram e continuam sendo o elemento biológico mais usado na construção de biossensores (Du, *et al.*, 2008; Alfaya *et.al*, 2002). Comparados com os catalisadores químicos, as enzimas apresentam um alto nível de especificidade com o substrato, devido principalmente a ligação forte na molécula de substrato pelo seu sitio ativo envolvendo fatores do meio ambiente reacional tais como, tamanho da molécula do substrato, polaridade, grupos funcionais ligados e relativa energia de ligação.

Em relação à biossensores que utilizam lipases como componentes biológicos, poucos trabalhos são encontrados na literatura, sendo que a maioria apresenta um desenvolvimento preliminar voltado para área clinica objetivando a quantificação de triglicerídeos em amostras de sangue. Reddy *et al.,* (2001) descrevem os primeiros testes realizados com um biossensor potenciométrico que utiliza a enzima lipase para quantificação de triglicerídeos em amostras de sangue. Os resultados demonstram que após a adição da enzima é possível observar uma variação de tensão (mV), podendo ser esta explicada pela produção de ácidos graxos livres durante a hidrólise do

triglicerídeo, mostrando que tal sensor biológico apresenta um potencial para estimar triglicerídeos em amostras de sangue.

Na Tabela 2.6 estão listados os trabalhos mais relevantes na área de biossensores enzimáticos que utilizam lipase como seu componente biológico. Observando os trabalhos podemos verificar que o analíto utilizado para determinar as características do sistema é a trioleína ou tributirina, analitos “puros” que não apresentam as condições de uma amostra real.

Tabela 2. 5 - Biossensores aplicando lipase como biocomponente.

Enzima	Imobilização	Sistema de transdução	Substrato (analíto)	Linearidade	Tempo de resposta	Condições operação	Referência
Lipase pancreática	Sílica porosa cristalina (*p*-type 100)	Potenciométrica	Tributirina	5 a 40 mM	15mim	Tampão fosfato pH 7,0/ 0,1M	Reddy *et al.*, 2001 Reddy *et al.*, 2003
Lipase de *Candida rugosa*	Sílica porosa cristalina (n^+-type 100)	Potenciométrica	Tributirina	0 a 0,027 mol/dm^3	-	Tampão fosfato de sódio Faixa de pH 3 a 8 20mM	Setzu *et al.*, 2007
Lipase, Glicerol quinase, glicerol 3-fosfato oxidase	Membrana de álcool polivinílico (PVA)	Amperométrico	Trioleína	0,56 a 2,25 mM	15 mim	Tampão fosfato de sódio pH 7,0 0,1M 25ºC	Pudir *et al.*, 2010
Lipase *Pseudomonas capacia*	Sílica porosa cristalina (*p*-type 100)	Potenciométrica	Tributirina	1 a 10mM	20 mim	Tampão fosfato pH 7 1mM	Fernandez *et al.*, 2009
Lipase	Sílica gel	Potenciométrica	Tributirina	5 a 15 mM	30 min	Tampão fosfato pH 7	Baus *et al.*, 2005

Tabela 2. 5 - Biossensores aplicando lipase como biocomponente (continuação).

Enzima	Imobilização	Sistema de transdução	Substrato (análito)	Linearidade	Tempo de resposta	Condições operação	Referência
Lipase pancreática, Glicerol quinase (*Cellulomanas sp*), glicerol 3-fosfato oxidase (*Aerococcus viridans*)	Membrana de Acetato celulose	Amperométrico	Trioleína	0,2 a 3,5 mM	15 min	Tampão fosfato pH 6,5 0,1M 37ºC	Minakshi e Pundir 2008
Lipase *Candida rugosa*	Filme sol-gel nano-estruturado CeO_2	Eletroquímico	Tributirina	50 a 500 mg/dl	-	-	Solanki *et al.*, 2009
Lipase	Nano-tubos de polianilina	Eletroquímico	Tributirina	25 a 300 mg/d	20 seg.	Tampão fosfato pH 7,4 50 mM	Dhand *et al.*, 2009
Lipase, Glicerol desidrogenase,β-NAD	Nano-partícula de carbono modificada	Eletroquímica	-	0 a 10 mM	-	-	Liao *et al.*, 2008
Lipase	Nano-particulas magnética	Potenciométrica	Trioleína	3 a 30 mM	5 mim	Tampão fosfato pH 7,0 10mM	Vijayalakshmi 2008

Transdutor

Para um biossensor, a escolha do transdutor é realizada mediante três requisitos básicos: que ele seja adequado para adaptação ao material biológico imobilizado, que seja altamente especifico para o analito de interesse, sendo capaz de detectar alguma variação específica que ocorra durante a reação biológica e que esta variação ocorra na faixa de concentração apropriada (Mello e Kubota, 2002). Dos vários transdutores empregados na construção dos biossensores, os mais utilizados são os eletroquímicos. Esta classe de biossensores se caracteriza por ser simples, sensível, confiável, de resposta rápida, necessita de instrumentação de baixo custo, opera em condições em que não é necessário um pré-tratamento da amostra e permite efetuar determinações em uma ampla faixa de concentração.

As técnicas eletrostáticas são capazes de fornecer limites de detecção excepcionalmente baixos e uma abundância de informações que caracterizam e descrevem eletroquimicamente determinados sistemas, sempre baseado nas propriedades elétricas de uma solução de analito quando ele está em contato com uma célula eletroquímica. Tais informações incluem a estequiometria e a velocidade de transferência de carga interfacial, a velocidade de transferência de massa, a extensão de adsorção e de quimissorção e as velocidades e constantes de equilíbrio de reações químicas. Uma vantagem deste método é que células eletroquímicas são freqüentemente específicas para um estado de oxidação particular e sua instrumentação é relativamente barata. Todas estas vantagens fazem com que os biossensores eletroquímicos constituam a grande maioria dos biossensores desenvolvidos (Castilho, 2003).

Dependendo do princípio de medição os biossensores podem ser divididos em amperométricos, potenciométricos e condutimétricos. Os biossensores potenciométricos, em geral, utilizam um eletrodo de referência (inerte) e um eletrodo operante, preferencialmente eletrodos gases ou íons seletivos, ambos em contato com a amostra, e se baseiam no desenvolvimento de um potencial significativo no eletrodo operante por acumulação da carga e portanto, densidade de carga aumentada na superfície do eletrólito. Desta forma, enzimas consomem ou produzem espécies químicas fortemente polares ou íons, produzidos ou consumidos, em decorrência da catálise, e estas

espécies são detectadas pelo eletrodo de íons seletivos e são transformadas em um sinal possível de ser lido e determinado (Cabral *et al*, 2003; Arya *et al.*, 2006).

c) Principais características de um biossensor

Um biossensor ideal pode ser definido com base nas seguintes propriedades (Cabral *et al* 2003; Pundir *et al* 2010):

Seletividade – é um ponto fundamental porque o biossensor deve ter uma elevada afinidade para um único componente de interesse analítico, para que seja possível relacionar o sinal com a concentração do componente analisado com total confiança.

Sensibilidade (linearidade) – manifesta-se na variação do sinal por unidade de concentração do composto a ser analisado e a razão do sinal produzido, e determina o *Limite de detecção* do biossensor.

Estabilidade – os biossensores devem ter uma elevada estabilidade, tanto de armazenagem como operacional, pois são fatores importantes para o custo efetivo de fabricação desses instrumentos.

Reutilização – deve poder ser reutilizado inúmeras vezes, para minimizar os custos de fabricação. Além do que a utilização do mesmo agente biológico geralmente assegura que amostras semelhantes dão respostas similares.

Exatidão – o resultado obtido em cada media devem ser próximo ao valor real esperado.

Precisão – está relacionado a reprodutibilidade do resultado obtido em cada media, ou seja devem ser próximos entre si.

2.5- Biossensores Potenciométricos

Este tipo de biossensor está relacionado com a detecção de um gradiente de concentração de um íon com auxilio de um eletrodo. Reações biocatalíticas que liberam íons como produtos de sua reação permitem o monitoramento da concentração de um substrato e/ou produto da reação. Na Tabela 2.6 estão apresentadas algumas reações que tem sido utilizadas em biossensores potenciométricos.

Tabela 2. 6 - Exemplos de biossensores pontenciométrico (Cabral *et al* 2003)

Eletrodo	Reação
Hidrogênio	
Penicilina	Penicilina $\xrightarrow{\text{penicilinas}}$ ácido peniciloico + H^+
Lipídio	Triacilglicerol $\longrightarrow$ glicerol + ácido graxo + H^+
Ureia	$H_2NCONH_2 + H_2O + 2H^+ \xrightarrow{\text{Urease}} 2NH_4^+ + CO_2$
Amônia	
L-fenilalanina	L-fenilalanina $\xrightarrow{\text{Fenilalanina amónia-liase}}$ NH_4^+ + trans-cinamate
L-asparaginina	L-asparagina + H_2O $\xrightarrow{\text{Asparagina}}$ NH_4^+ + L-aspartato
Adenosina	Adenosina + $H_2O + H^+ \xrightarrow{\text{Adenosina deaminase}}$ NH_4^+ + inosina
Iodeto	
Peróxido	$H_2O_2 + 2I^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{Peroxidase}} 2H_2O + I_2$

Biossensores potenciométricos utilizam eletrodos íon-seletivos como meio de transdução da reação biológica em um sinal elétrico. Esse sistema consiste de uma membrana com enzima imobilizada em torno de uma sonda ligada a um medidor de pH, onde a reação catalisada gera íons de hidrogênio. A reação que ocorre ao lado da fina membrana de vidro sensor provoca uma mudança no pH, que podem ser lidos diretamente no visor medidor de pH.

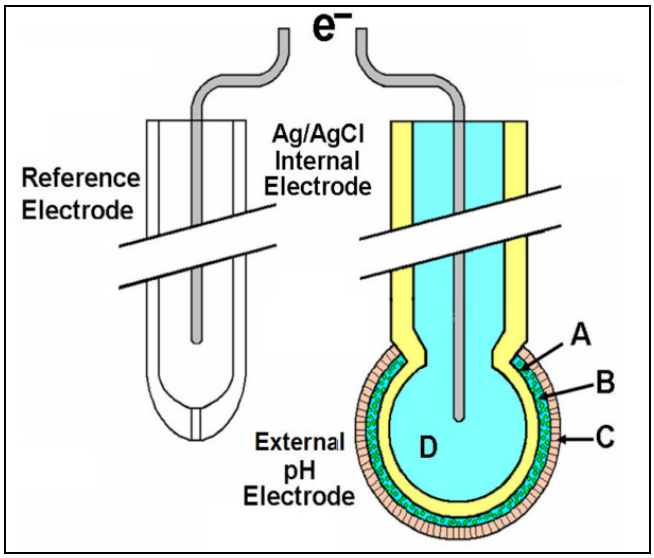


Figura 2.2: Esquema geral de um biossensor potenciométrico. (A) biocatalizador, (B) membrana semi-permeável, (C) interface do potencial elétrico gerado (D) eletrodo externo. (Hossain *et al* 2010)

Existem três tipos de eletrodos íon-seletivos, que são usados em biossensores são:

- Eletrodos de vidro para cátions (por exemplo, eletrodos de pH normal) em que o elemento sensor é uma membrana fina de vidro hidratado que gera um potencial elétrico transversal devido à concentração entre os cátions de sítios específicos de ligação. A seletividade desta membrana é determinada pela composição do vidro.
- Eletrodos de pH de vidro revestido com uma membrana de gás permeáveis seletivo para CO_2, NH_3 e H_2S. A difusão do gás através desta membrana provoca uma mudança no pH em uma solução de detecção entre a membrana e o eletrodo que é então determinada.
- Eletrodos de estado sólido, onde a membrana de vidro é substituída por uma fina membrana de um condutor de íons específicos feitos a partir de uma mistura de sulfeto de prata e um de haleto de prata. O eletrodo de iodeto é útil para a determinação de I^- na reação da peroxidase e também responde a íons cianeto.

Os biossensores, que envolvem a liberação de H^+ devem ser utilizadas soluções com baixo efeito tampão para que as determinações de mudanças significativas no potencial não sofram interferências, e para que os resultados não sejam "mascarados". A relação entre a mudança de pH e concentração do substrato apresenta alguns pontos que devem ser levados em consideração, entre eles: a não linearidade entre a variação de pH, a concentração de substrato e a resposta da atividade enzimática. No entanto, as condições de análise podem ser determinadas na faixa onde exista uma relação linear aparente entre variação pH e a concentração de substrato.

Estudos realizados por alguns grupos de pesquisa (Fernandez *et al* 2009; Vijayalakshmi *et al.,* 2008; Basu *et al*., 2005; Reddy *et al.,* 2001) revelam que o desenvolvimento de eletrodos transistores de efeito de campo de íon-seletivo (ENFET – sensores enzimáticos transistores de efeito de campo) permitem que os sensores potenciométricos possam ser utilizados na medida de substâncias biológicas não iônicas, já que estes íons são gerados durante a reação (Fernandes e Kubota 2011).

2.5.1 – Princípio de funcionamento de um Eletrodo de pH

A equação de Nernst possibilita a determinação de concentrações iônicas mediante a utilização nesta de medidas realizadas com células galvânicas (eletrodo), ou seja, desde que seja utilizada a célula adequada, chega-se à base da determinação experimental do pH de uma solução.

A determinação do pH é realizada empregando um eletrodo de hidrogênio. No ensaio o eletrodo de hidrogênio deve ser imerso na solução cujo pH deve ser determinado e, por meio de uma ponte salina, sendo estes ligado a um outro eletrodo de referência (eletrodo saturado de calomelano), de potencial conhecido, possibilitando a medida de tensão entre eles.

Sendo assim a equação de Nernst para o eletrodo de hidrogênio pode ser definida da seguinte forma:

$$\varepsilon_{célula} = \varepsilon_{H_2} + \varepsilon_{referência}$$

$$\varepsilon_{célula} = \left[\varepsilon^{o}_{H_2} - \frac{0{,}0257}{2}\ln\frac{[H^+]^2}{P_{H_2}}\right] + \varepsilon_{referêcia}$$

$$\varepsilon_{célula} = \left[\frac{0{,}0257}{2}\ln\frac{[H^+]^2}{P_{H_2}}\right] + \varepsilon_{referência}$$

$$\ln[H^+] = \frac{\varepsilon_{referência} - \varepsilon_{célula}}{0{,}0257} + \ln P_{H_2} \qquad \log x = \frac{\ln x}{2{,}303}$$

$$-\log[H^+] = \frac{\varepsilon_{célula} - \varepsilon_{referência}}{0{,}0592} - \frac{1}{2}\, logP_{H_2}$$

$$\mathrm{pH} = \frac{\varepsilon_{célula} - \varepsilon_{referência}}{0{,}0592} - \frac{1}{2}\, logP_{H_2}$$

Usando um eletrodo de referência junto com um eletrodo de hidrogênio (no qual a pressão parcial do gás hidrogênio é conhecida), o pH de uma amostra pode ser calculada mediante a medida da tensão (potencial em mV) da célula.

Fazendo um rearranjo da equação para um eletrodo de vidro temos:

$$pH = \frac{\varepsilon_{célula}}{0{,}0592} - \left(\frac{\varepsilon_{referência}}{0{,}0592} + \frac{1}{2}\, logP_{H_2}\right)$$

Observe que o termo entre parênteses a direita é constante, pois a tensão do eletrodo de referencia não pode variar porque a ponte salina o isola da solução de pH desconhecido, então temos

$$pH = \frac{\varepsilon_{célula}}{0{,}0592} - constante$$

Podemos concluir que a P_{H2} constante, o pH da solução é diretamente proporcional à tensão medida produzida pela célula, ou em outras palavras o pH é proporcional a concentração de íons H^+

$$pH = -\log[H^+]$$

2.6- Aplicação de Biossensores na área de Biocombustíveis

Biodiesel pode ser definido como ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de matéria-prima renovável, como óleos vegetais ou gordura animal. Ele é considerado um combustível de queima

limpa e o termo “Bio” representa sua fonte renovável e biológica além de ser biodegradável e não tóxico (Cdya Sagar e Naik, 2006). Comparado ao diesel de petróleo, o biodiesel tem uma emissão de gases de combustão favorável, como a baixa emissão de monóxido de carbono, material particulado e hidrocarbonetos e o dióxido de carbono emitido pode ser reciclado pela fotossíntese realizada durante o crescimento da matéria-prima (Zhang et al, 2003; Ejaz et al, 2008).

De acordo com as especificações e exigências da ANP (Agência Nacional do Petróleo - Resolução 42,) para caracterização do biodiesel é necessário cerca de 22 ensaios, alguns dos ensaios realizados incluem: determinação da densidade, índice de iodo, teor de enxofre, ponto de fulgor, teor de água e sedimentos; viscosidade, cinzas, corrosividade, número de cetano, ponto de névoa, resíduo de carbono, índice de acidez e teor de glicerol total e livre.

Segundo Lobo *et al.,* (2009) a partir dos métodos analíticos (ensaios) aplicados na avaliação da qualidade do biodiesel podem-se obter informações importantes a respeito da seleção da matéria prima, do processo fabril e do armazenamento, bem como do desempenho do biodiesel como combustível e da qualidade das suas emissões (Tabela 2.1).

Tabela 2. 7 – Divisão dos métodos analíticos por grupos segundo Lôbo *et al.,* (2009).

Grupos de avaliação	Característica
Contaminantes provenientes da matéria-prima	Teor de fósforo e enxofre Corrosividade ao cobre Cálcio e magnésio
Avaliação do processo produtivo	Aspecto Contaminação total Glicerina livre e total Resíduo de carbono Teor de éster Ponto de fulgor Metanol e etanol Cinzas sulfatadas Sódio e potássio
Propriedades inerentes as estruturas moleculares dos ésteres constituintes	Massa especifica Viscosidade cinemática a 40ºC Índice de iodo Destilação – 90% vol. Recuperado Número de cetano Ponto de nevoa Ponto de entupimento de filtro a frio Ponto de fluidez
Processo de estocagem	Estabilidade á oxidação Água e sedimentos Índice a acidez

Embora estes métodos apresentem resultados satisfatórios nas determinações necessárias, requerem o uso de equipamentos que em alguns casos podem ser caros e são métodos laboriosos, pois necessitam da aplicação de preparação e tratamento prévio das amostras, muitas vezes usando reagentes tóxicos. Isto vai de encontro à abordagem ambientalmente correta fornecida a aplicação do biodiesel.

São muito importantes para o biodiesel as realizações e o cumprimento das seguintes especificações: como os óleos e as gorduras de origem vegetal e animal não possuem enxofre, o biodiesel é completamente isento desse elemento; o biodiesel não deve conter mais que 0,02% de glicerol (o glicerol livre pode causar problemas no armazenamento do produto e depósitos de carbono no motor), e o teor de ácidos graxos livres no produto deve ser inferior a 3%, o que indica uma reação completa na produção de biodiesel.

Porém, a realização de todas as análises necessárias, visando a obtenção de todas as informações que demonstrem a qualidade do biodiesel, muitas vezes não é possível, devido a problemas como a falta de infra-estrutura nos locais de produção. Na maioria das vezes a técnica de análise utilizada para realizar tais controles é a cromatografia, que precisa de uma central analítica, maior tempo para realização, tratamento prévio da amostra entre outras exigências. Assim surge a necessidade de se obter instrumentos ou métodos de análise mais rápidos, também precisos e viáveis e que permitam que mesmo instalações mais simples e/ou postos de abastecimento, possam realizar dosagens a fim de verificar a qualidade do combustível produzido e identificar se este atende aos padrões de especificação.

Biossensores são uma alternativa para minimizar ou solucionar tais inconvenientes como também permitem que tais medidas possam ser realizadas de forma mais simples e rápidas.

2.7 - Considerações Finais

Com base na revisão da literatura apresentada no presente capitulo foram identificadas algumas lacunas que são:

- Biossensores desenvolvidos e encontrados na literatura que utilizam lipase como componente biológico foram desenvolvidos e caracterizados utilizados amostra simples (padrão) o que não representa as condições de uma amostra real.

- Biossensores na área de biocombustíveis não são encontrados, sendo que o único trabalho encontrado nessa área foi o trabalho de Hossain *et*

al 2010 que propõem o desenvolvimento de um biossensor enzimático para determinação de glicerol livre e total utilizando lipase, porém testes com amostras reais não foram realizados.

- Para aplicação em biossensor, as lipases utilizadas tem alto grau de pureza, porém para estas aplicações, não existe a necessidade de um alto grau de pureza.

CAPÍTULO 3 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente capítulo estão apresentados os principais materiais utilizados, bem como a descrição das metodologias aplicadas no estudo para o desenvolvimento de um biossensor enzimático para determinação de ácidos graxos livres.

3.1- Materiais

a) Reagentes

Os substratos para dosagem da atividade da enzima lipase, o p-nitrofenil laurato, foram adquiridos da Sigma-Aldrich e o azeite de oliva extra virgem utilizado foi da marca Borges.

Todos os demais reagentes usados no presente trabalho, em grau analítico, foram fornecidos pela Vetec Química

A lipase comercial utilizada, Lipase de *Candida rugosa* tipo VII foi adquirido da Sigma-Aldrich.

Os extratos enzimáticos usadas foram:

- Lipase de *Aspergillus niger* cedida gentilmente pela pesquisadora Mônica Caramez da Embrapa Agroindústria de Alimentos.
- Lipase de *Yarrowia lipolítica* cedida gentilmente pelas Prof.ª Maria Alice Zarur Coelho e Priscilla Filomena Amaral da Escola de Química/ UFRJ.

b) Suporte para Imobilização das Lipases

O suporte utilizado para o processo de imobilização foi pérolas de vidro aminopropil com tamanho de poro de 700 A^{o}/ 80-120 µm adquirido da Sigma.

c) Equipamentos

i. Titulador automático 848 tritino marca Methrom
ii. pHmetro marca Methrom com eletrodo para meio não aquoso
iii. pHmetro marca Quimis com eletrodo para meio aquoso
iv. Espectrofotômetro marca Femto modelo 800XI
v. Agitador magnético marca Quimis
vi. Banho-maria marca Quimis
vii. Balança analítica marca Sartorius
viii. Agitador orbital marca Thomas
ix. Capela de exaustão marca Quimis

d) Microrganismo

Foram utilizadas duas leveduras cedidas gentilmente pela Fundação Osvaldo Cruz- FIOCRUZ

- *Candida rugosa* INCQS 40285 (ATCC 10571)
- *Yarrowia lipolítica* INCQS 40149 (ATCC 18942)

3.2- Método de Preservação das Células de Leveduras.

Para preservação das células de *Candida rugosa* estas foram conservadas a 4ºC após 72 horas de crescimento em tubos de ensaios contendo meio de cultivo MYPD ("Malte Extract, Yeast Extract, Peptone, Dextrose") (em p/v): extrato de lêvedo 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona 0,5%, glicose 1% e Agar-agar 2%.

3.3-Determinações Analíticas

a) Determinação da Atividade Lipásica

A atividade da enzima lipase foi medida através dos métodos espectrofotométrico e titulométrico. O método espectrofotométrico é mais simples e rápido e, portanto, foi adotado mais freqüentemente. No entanto, pelo fato do substrato utilizado ser um éster, e por ser detectada a presença de outras esterases, além das lipases, o método titulométrico foi utilizado para

confirmação da presença de lipases, e não esterases, já que essas estavam sendo medidas pelo primeiro método.

i. ***Método Espectrofotométrico*** **para Determinação da** *Atividade Hidrolítica da Lipase em p-Nitrofenil Laurato*

No presente trabalho, a reação de hidrólise de p-nitrofenil laurato (0,18 g/L) catalisada pela enzima livre foi realizada em tampão fosfato de potássio a 50 mM e pH 7 (Amaral *et al.*, 2006). A massa de p-nitrofenil laurato foi dissolvida em dimetilsulfóxido (sempre na proporção 0,018g/mL) e então diluída em tampão. Em 1,8 mL de substrato a 37ºC, foram adicionados 0,2 mL de solução da enzima livre e, através da variação de absorvância (medida em espectrofotômetro a 410 nm contra um branco de reação), foi monitorada a quantidade de produto formado durante 100 segundos.

O cálculo da atividade da enzima lípase pelo método espectofotométrico foi realizado através da Equação 3.1.

$$A = \frac{\Delta Abs * D * f * V_R}{\Delta t * V_A} \qquad \text{Eq. 3.1}$$

sendo:

A = atividade da enzima (U/L), onde *(U) corresponde a uma unidade de atividade enzimática hidrolítica que é definida como a quantidade de enzima que libera 1* µ*mol de p-nitrofenol por minuto nas condições do ensaio*;

Δ*Abs* = variação de absorvância em 410nm no intervalo de tempo (Δt em minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear dos valores de absorvância;

D = diluição da solução enzimática;

f = fator de conversão dos valores de absorvância para a concentração de p-nitrofenol, obtido através da construção de uma curva padrão de *p*-Nitrofenil laurato em concentração variando entre 0,01 e 0,2 µmol.mL^{-1}.

Δ*t* = tempo de análise, em minutos;

V_A = volume (L) da solução enzimática utilizada no ensaio e

V_R = volume (L) do meio reacional total.

No caso da medida de atividade de lipase imobilizada, 20mL de solução de p-nitrofenil laurato (*p*-NPL), preparada conforme citado anteriormente, são colocados em contato com 0,3g de enzima imobilizada, sendo o sistema mantido sob agitação, a 37ºC, por um período de 10 minutos. A reação foi acompanhada através da leitura de absorvância realizada em intervalos de 1 minuto. Neste caso, o calculo da atividade foi realizado através da Equação 3.2

$$Ativ_{imob.} = \frac{\Delta Abs * f * V_R}{\Delta t * M_A}$$

$Ativ_{imob.}$ = atividade da enzima imobilizada (U/g), onde uma unidade (U) de atividade enzimática hidrolítica é definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de p-nitrofenol por minuto nas condições definidas;

ΔAbs = variação de absorvância no intervalo de tempo Δt (em minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear dos valores de absorvância;

f - fator de conversão dos valores de absorvância para a concentração de p-nitrofenol, obtido através da construção de uma curva padrão de *p*-Nitrofenil laurato em concentração variando entre 0,01 e 0,2 $\mu mol.mL^{-1}$;

Δt – tempo de análise, em minutos;

V_R – volume (ml) de meio reacional total

M_A – massa (g) de enzima imobilizada utilizada

ii. ***Método Titulométrico***

Segundo Dellmora-Ortiz *et al.* (1997) a determinação da atividade lipásica pelo método titulométrico pode ser realizada utilizando 5 mL de emulsão de óleo de oliva 50% (v/v) em goma arábica 7% (p/v) (substrato) e 4 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0. O ensaio é realizado sob agitação magnética, a 37ºC, sendo iniciado pela adição de 3 mL da preparação enzimática, previamente aquecida na temperatura de ensaio. Após 15 minutos

de incubação, a reação é paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura etanol, acetona e água (1:1:1 v/v/v).

Os ácidos graxos formados pela hidrólise dos triacilgliceróis presentes na emulsão foram quantificados pela titulação contra NaOH 0,02 M, utilizando fenolftaleína como indicador.

Também foi utilizado um branco, pela inativação da enzima por adição prévia da mistura etanol-acetona ao meio reacional.

Uma unidade de atividade enzimática determinada pelo método titutométrico (1U) corresponde à quantidade de enzima que produz 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições de ensaio.

b) Método de Determinação do Teor de Proteína

Para determinação do teor de proteína presente nas soluções de lipase, foi utilizado o método sugerido por Lowry (1951), uma técnica bastante conhecida e aplicada para quantificação de proteína.

Para realizar a determinação de proteína, inicialmente, foi preparada uma mistura (Reagente A) adicionando 1 mL de $CuSO_4$ 1% (v/v) a 1 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio 2% (p/v) e completando o volume reacional até 100 mL com solução de $NaCO_3$ 2% em NaOH (0,1N).

Posteriormente, em câmera escura, 0,5 mL da amostra (ou água destilada no caso do branco) foram misturados a 2 mL do reagente A. Após 10 minutos em repouso a temperatura ambiente, ainda em câmera escura, foram adicionados 0,2 mL de solução de Folin-Ciocalteau, a qual foi previamente diluída na razão de 1:2 em água destilada. Depois de 30 minutos a temperatura ambiente, foi determinada a absorvância da amostra a 660 nm em espectrofotômetro.

Para obtenção da curva de calibração de proteína, foram correlacionados os valores de absorvância obtidos a partir da leitura de soluções com concentrações conhecidas de proteína padrão (soro albumina

bovina - BSA), variando a concentração de BSA entre 0 e 0,1 mg de proteína/mL.

3.4- Cultivo das leveduras *Candida rugosa* e *Yarrowia lipolítica*

a) Preparo do Inóculo

i. *Candida rugosa*

Células de *Candida rugosa* preservadas em meio sólido MYPD (descrito no item 3.2) foram inoculadas, de forma estéril com auxílio de uma alça de platina em 100 mL de meio de cultivo YPD contidos em erlenmeyers de 250 mL. Os erlenmeyers foram colocados em um incubador rotatório a 27ºC, 150 rpm, e após cerca de 72 horas, a absorvância de 1 mL da amostra deste cultivo foi determinada a 600 nm, em espectrofotômetro. e, em seguida as células foram centrifugadas de forma estéril a 3.000 g por 10 minutos e ressuspensas em 10 mL de meio de cultivo, servindo de inoculo para os experimentos que serão descritos nos itens posteriores. O volume centrifugado foi suficiente para se obter uma concentração inicial de células de, aproximadamente, 1,0 ± 0,1 mg p.s. cel/mL nos meios de cultivo.

ii. *Yarrowia lipolítica*

Células de *Yarrowia lipolítica* preservadas em meio sólido MYPD foram inoculadas, de forma estéril, com auxílio de uma alça de platina em 100 mL de meio de cultivo YPA (0,3%$_{v/v}$ Extrato de levedura, 0,3%$_{v/v}$ peptona e 1%$_{v/v}$ ácido oleico) contidos em erlenmeyers de 250 mL. Os erlenmeyers foram colocados em um incubador rotatório a 27ºC, 150 rpm, e após cerca de 16 horas, a absorvância de 1mL da amostra deste cultivo foi determinada a 600 nm, em espectrofotômetro e, em seguida um volume de células foram transferidas de forma estéril para os experimentos descritos em cada etapa. O volume transferido foi suficiente para se obter uma concentração inicial de células de, aproximadamente, 1,0 ± 0,1 mg p.s. cel/mL de meios de cultivo.

3.5- Quantificação da Concentração Celular

A determinação da concentração celular para ambas as culturas foram acompanhadas através da medida de absorvância em espectrofotômetro a 600 nm, sendo esses valores convertidos para mg p.s. cél/mL utilizando-se o fator de conversão obtido pelas curvas de peso seco, que são apresentadas nas Figuras 3.1 e 3.2 para *Yarrowia lipolitica* e *Candida rugosa*, respectivamente. Para cada cultura a curva de peso seco foi obtida com uso de uma suspensão de células preparada em solução salina (água destilada com 0,9% (p/v) de NaCl). Desta suspensão, foi retirada uma alíquota de 10 mL de amostra, filtrada em papel de filtro Millipore (0,45 µm), secada em luz infravermelha por 30 minutos e, em seguida, pesada. Da mesma suspensão foram realizadas diferentes diluições, de modo a se obter concentrações celulares distintas, sendo então, determinada a absorvância destas amostras em espectrofotômetro a 600 nm, obtendo-se a curva de peso seco.

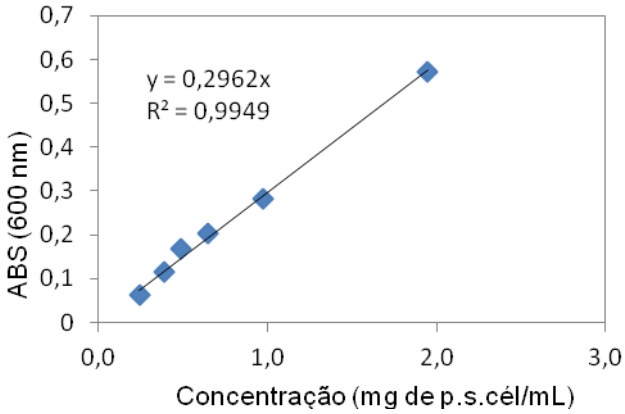


Figura 3. 1 - Curva de peso seco para *Yarrowia lipolítica*

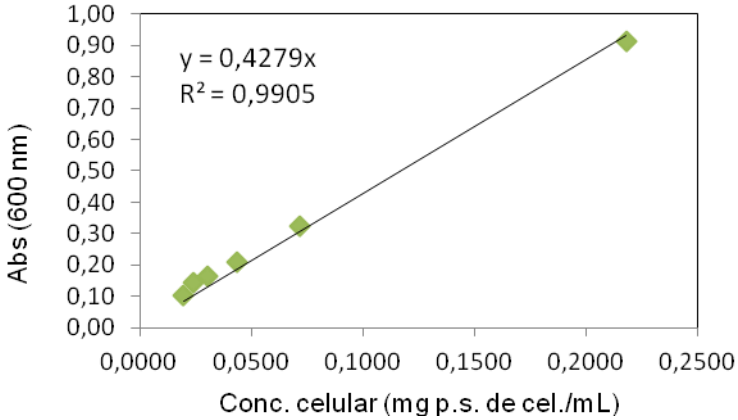


Figura 3. 2 - Curva de peso seco para *Candida rugosa*

3.6- Experimentos para Produção de Lipase.

Os parâmetros utilizados nesta primeira etapa de experimento, foram selecionados com base na bibliografia pesquisada sobre produção de lipase por leveduras por fermentação submersa (María *et al.,* 2006; Dalmau *et al.,* 2000 e Domínguez de Maria *et al.,* 2005; Ferrer *et al* 2001).

Paras os testes de produção de lipase por fermentação submersa foram realizados planejamentos experimentais visando determinar as melhores concentrações dos componentes selecionados para produção da enzima lipase. O planejamento variou de acordo a necessidade de cada etapa do trabalho. Os pontos centrais de cada planejamento foram realizados em triplicata a fim de estimar o erro experimental e variância. E os resultados foram analisados pelo software Statistica (versão 6.0).

3.7- Procedimento de Imobilização das Lipases no Suporte

O processo de imobilização utilizado no presente trabalho consistiu na ligação covalente da enzima lipase a um suporte vítreo (pérola de vidro), tendo este suporte sido submetido a uma ativação anterior. O processo de ativação do suporte com o glutaralteído ocorre formando grupamentos aldeídicos necessários à ligação da enzima (Figura 3.2).

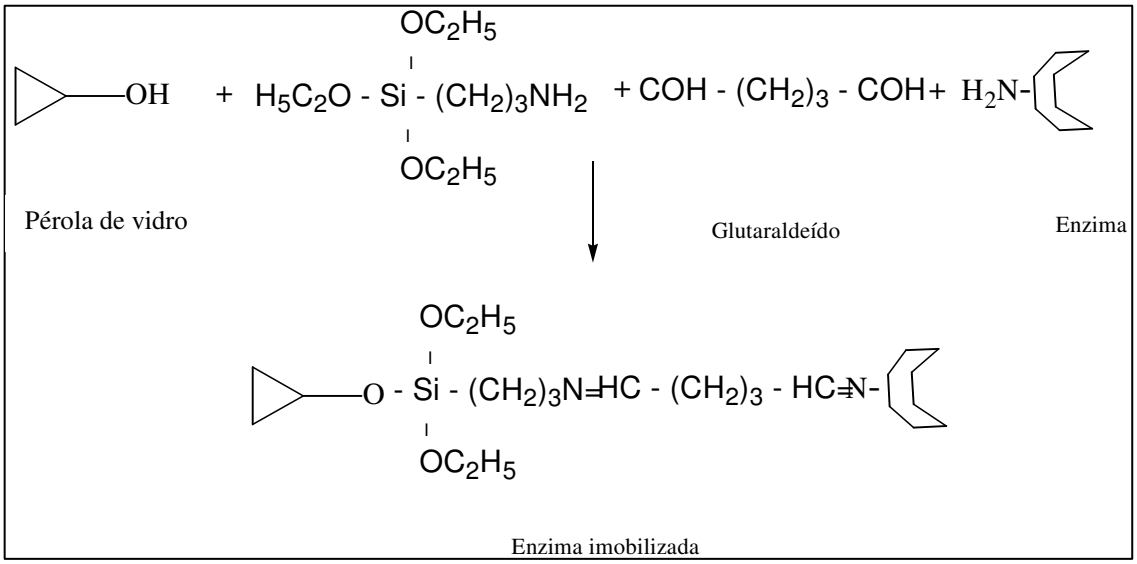


Figura 3.3: Descrição química da reação no processo de imobilização (Melo *et al.,* 2006)

A técnica de imobilização utilizada consistiu em inicialmente protonar o suporte (pérola de vidro) com solução de ácido nítrico 10% v/v durante 30 minutos a temperatura ambiente na razão de 30 mL por grama de suporte. Em seguida, os suportes foram lavados com a mesma solução de ácido, com água destilada e solução de acetona, nas proporções de 25, 50, 75 e 100%, sequencialmente em ordem crescente de concentração e então seco à 40ºC por uma hora. A silanização foi feita com solução de 3-aminopropiltrietoxisilano (ATPS) 0,5% v/v, pH 3,3 à 75ºC por 3 horas, na razão de 30mL de solução por grama de suporte. Passado esse tempo, o suporte foi lavado com água destilada e seco. A ativação com glutaraldeído foi realizada em solução a 2,5% v/v em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, por uma hora à 23ºC, na razão de 12,5 mL de solução por grama de suporte. Aos suportes pré-ativados foi adicionada uma solução de lipase (para Lipase comercial a solução enzimática foi preparada com tampão fosfato 50mM pH 7,0), e incubados a 20ºC por 24 horas. Ao longo do processo foi determinada a atividade enzimática do sobrenadante, seguindo o método. titulométrico, citado no item 3.3.b (ii) para o extrato de *Aspergillus niger* e para lipase comercial foi utilizado o método descrito no item 3.3.a (ii).

Para avaliar o processo de imobilização, quantificou-se a atividade hidrolítica da solução de enzima fornecida ao suporte e do sobrenadante ao final do processo de imobilização e da enzima imobilizada (derivado imobilizado) usando os métodos titulométrico e ou método espectrofotométrico, (item 3.3)

A partir destes resultados foi possível calcular a atividade recuperada da enzima imobilizada e o rendimento de imobilização, conforme apresentado no item a seguir.

a) Cálculo de Rendimento de Imobilização e Atividade Recuperada

Durante os estudos de imobilização, além de acompanhar a atividade aparente no derivado obtido, o cálculo de dois outros parâmetros, atividade recuperada e rendimento de imobilização, é fundamental para avaliar o desempenho do processo de imobilização. O rendimento de imobilização (Rend) pode ser definido como a quantidade de enzima teoricamente imobilizada (Equação 4.2) (Brígida 2010). Já a atividade recuperada ($Atv_{recuperada}$) é a relação de quanto, das enzimas teoricamente imobilizadas, que se encontram ativas (Equação 4.3). Uma avaliação desses parâmetros indicará quais as melhores condições de imobilização (Brígida 2010).

$$Rend\ (\%) = \left(1 - \frac{Atv_{final}}{Atv_{branco}}\right) * 100 \qquad \text{Eq. 4.2}$$

$$Atv_{recuperada} = \frac{Atv_{Derivado}}{\frac{Atv_{inicial}}{Ms}} * 100 \qquad \text{Eq. 4.3}$$

Sendo:

Rend = rendimento de imobilização (%)

Atv_{final} = atividade hidrolítica medida no sobrenadante após um determinado tempo de imobilização (U/mL);

$Atv_{recuperada}$ = atividade hidrolítica recuperada (%)

Atv_{branco} = atividade hidrolítica medida em uma solução “branco” de mesma concentração inicial que a solução destinada a imobilização após o mesmo período destinado a Atv_{final} (U/mL);

$Atv_{derivado}$ = atividade hidrolítica medida no derivado (U/g)

$Atv_{inicial}$ = atividade hidrolítica na solução inicial de enzima (U/mL);

Ms = massa do suporte (g)

3.8- AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Para caracterização dos extratos enzimáticos foi determinada a taxa de reação (v_o) em diferentes concentrações de substrato, a velocidade máxima de reação (V_{max}) e a constante de Michaelis-Menten (K_m) para o substrato.

a) Determinação da taxa de reação

Os parâmetros cinéticos enzimáticos são determinados tradicionalmente pelo uso da velocidade inicial (Vo), quando diferentes concentrações de um substrato são utilizadas. A taxa de reação foi determinada mantendo-se fixa a quantidade de extrato enzimático em 1mL e variando a concentração de substrato preparado em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0 para extrato de *Aspegillus niger* e fosfato de potássio 50mM, pH 7,0 para extrato de *Yarrowia lipolítica*. A atividade da enzima imobilizada foi determinada nas concentrações de 350 a 2450 mM de ácido graxo. Os dados obtidos para cada concentração foram representados graficamente, a partir destes, calculada a velocidade da reação (Vo). Assim foi possível determinar o efeito do substrato na velocidade inicial da reação, podendo-se, então, calcular a velocidade máxima (V_{max}) da reação e a constante de Michaelis-Menten (K_m).

b) Determinação de V_{MAX} E K_m

A partir dos valores de velocidade da reação e concentração de substrato (S), os coeficientes cinéticos, velocidade máxima (V_{max}) e constante de Michaelis-Menten (K_m) foram calculados utilizando o método Lineweaver-Burk. A equação da reta foi determinada,

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \qquad \text{Equação 3.5}$$

Sendo;

$$y = \frac{1}{v_0}$$

$$x = \frac{1}{S}$$

$a = \frac{K_m}{V_{max}}$ - coeficiente angular

$b = \frac{1}{V_{max}}$ - coeficiente linear

3.9- CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE LIPASE

O extrato enzimático bruto de *Aspergillus niger* foi submetido a um processo de concentração seguindo as seguintes etapas:

- A 20mL do extrato bruto, mantido em banho de gel, foi adicionada lentamente uma massa de sulfato de amônio para atingir a concentração desejada (faixa testada: 20-80%). Esta solução foi mantida em repouso á 10ºC por aproximadamente 12 horas.
- Em seguida os extratos foram centrifugados a 10ºC por 15 minutos a 3000 rpm.
- Após a centrifugação o precipitado foi ressuspendido em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,0 e submetido ao processo de diálise
- A diálise foi realizada contra 2L de solução tampão de citrato de sódio 50mM pH 4,0.

3.10- Determinação da Variação de Potencial Usando o Transdutor (Eletrodo de pH) pela Ação da Enzima Lipase Livre e Imobilizada.

O desenvolvimento de um biossensor está baseado na ação de um componente biológico. No caso do presente trabalho relaciona-se a ação da enzima lipase e a capacidade de um transdutor (eletrodo de pH) de captar uma mudança, em função do produto da reação da lipase sobre o substrato. A reação química esquematizada na Figura 3.3, descreve a ação da lipase, onde

os ésteres na presença de água e da lipase geram como produto final glicerol e ácido graxos livres

.

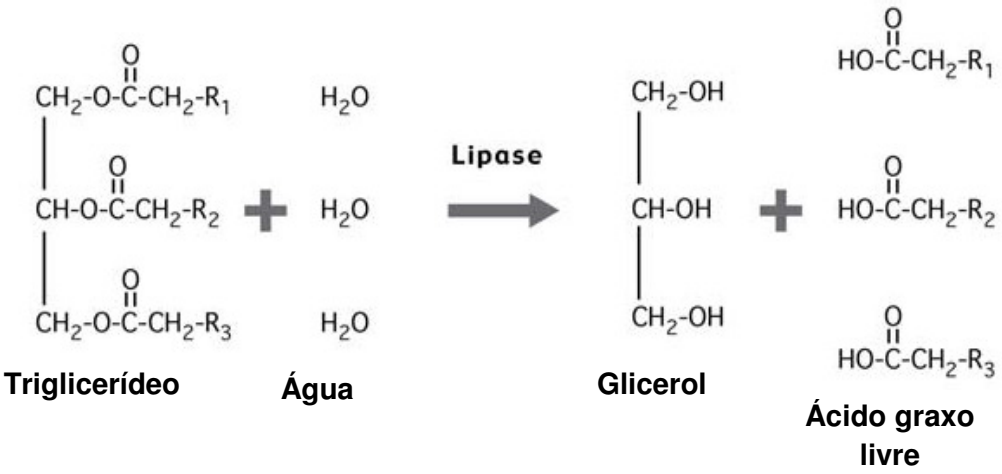


Figura 3.4 – Esquema da reação que ocorre pela ação da lipase em um éster (Setzu *et al* 2007)

Os ácido graxos liberados após a reação tem a capacidade de mudar o pH da solução, assim o eletrodo de pH selecionado tem a sensibilidade de detectar tais mudanças que ocorrem e produzirem uma diferença de potencial (mV). Estas mudanças de pH que ocorrem devem ser logaríticamente proporcionais à concentração dos ésteres presente na solução.

Para verificar a variação da diferença potencial nas amostras de óleos ou de biodiesel pela ação da enzima lipase livre, foram realizados testes estáticos com a enzima livre em contato com as amostras de óleo ou biodiesel preparadas nas concentrações de 20 e 50% v/v, na temperatura de 25ºC colocadas em contato com o eletrodo de pH por 15 minutos.

As medidas potenciométricas (variações de potencial) foram realizadas com auxilio de um pHmetro e um eletrodo de vidro que atuaram como transdutores na construção do biossensor (Figura 3.4). As condições de operação utilizadas foram 37ºC por 15minutos com agitação controlada.

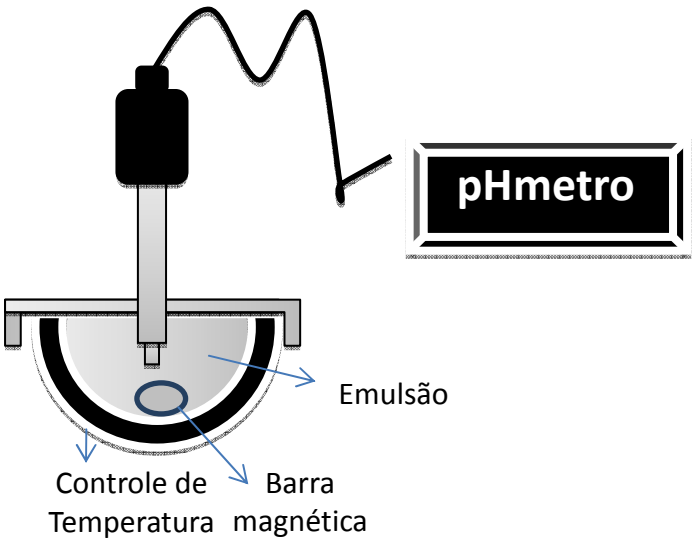


Figura 3.5 – Esquema geral da montagem para determinação potenciométrica usando enzima lipase livre ou imobilizada.

3.11 – Ensaios de estabilidade à oxidação

Os ensaios de estabilidade oxidativa foram realizados utilizando o equipamento Rancimat modelo 743, da Mettler em modo automático. Com uso do equipamento foi possível expor as amostras a condições oxidantes como presença de oxigênio. Para a execução dos ensaios foram realizadas análises em triplicatas, com as seguintes condições de análise; tipo de atmosfera – ar; vazão de borbulhamento do ar: 10L/h; temperatura – 110ºC; massa de amostra – 3g ± 0,013.

CAPÍTULO 4 BIOSSENSOR ENZIMÁTICO

Neste capitulo serão apresentados, como foi realizado o desenvolvimento do biossensor, e os resultados da comparação entres os dois extratos enzimáticos de lipase obtidos a partir de *Yarrowia lipolytica*. e *Aspergilus niger* , em relação a uma lipase comercial, quando imobilizados e quando usados na reação biológica do biossensor.

4.1 – Construção do Biossensor Enzimático

Com base nos dados obtidos na revisão bibliográfica o Biossensor Enzimático para detecção de ácidos graxos foi construído aplicando como componente biológico a enzima lipase e em função do produto reacional desta sobre o biodiesel, ou amostras de óleo usadas na sua fabricação, um eletrodo e transmissor de pH foi selecionado como transdutor.

A enzima Lipase possuí a capacidade de hidrolisar ésteres(figura 4.1) e os íons H^+ formados serão detectados pelo eletrodo de pH, usado como transdutor na construção do Biossensor proposto.

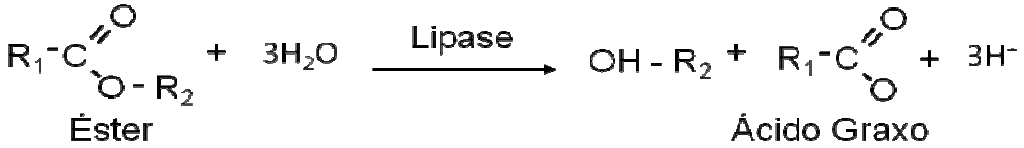


Figura 4. 1 - Esquema da ação da lipase em um éster.

Para a IUPAC (Union of Pure Apllied Chemistry, 2001) só é considerado um biossensor aquele instrumento que apresenta na sua construção o componente biológico em contato direto com elemento transdutor, e para atender tal característica é necessário que este componente biológico esteja imobilizado na sua superfície ou próximo ao mesmo (Thevenot *et al*, 2001).

Assim para adaptar a enzima lipase imobilizada ao sistema de transdução, usado no biossensor proposto, foi desenvolvido um sistema de análise mostrado na Figura 4.2.

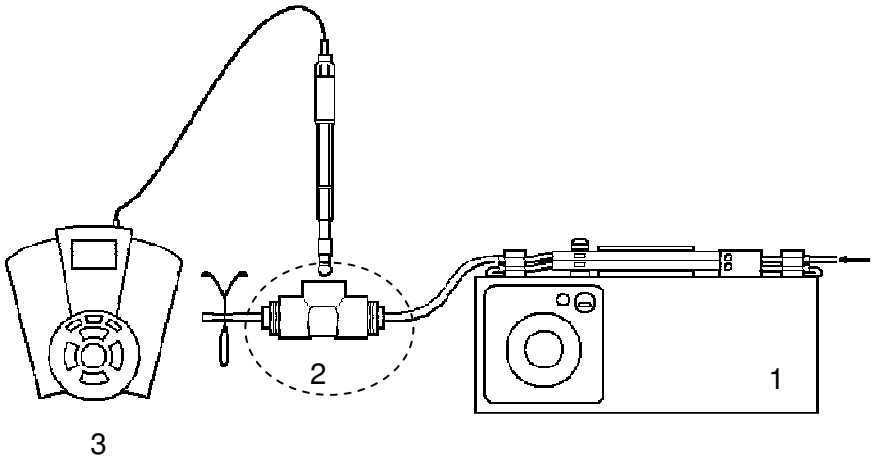


Figura 4. 2 - Sistema de analise de analise proposto (1- Bomba peristáltica, 2- câmara reacional, 3- Transdutor de pH).

O sistema foi composto de um elemento propulsor (1), uma bomba que proporciona o transporte das amostras e solução de "limpeza" através do sistema de análise, (2) uma câmera reacional de capacidade de 10mL onde a lipase imobilizada foi acondicionada e diretamente ligada ao eletrodo íon-seletivo de hidrogênio, imerso na câmara por um orifício de diâmetro de 1,7cm ; e (3) o sistema de transdução, ligado ao eletrodo íon seletivo, que informa o valor do sinal em mV referente as variações detectadas pelo eletrodo. O volume total do sistema foi de 15 mL e foram usadas mangueiras de silicone para conexão com diâmetro interno de 0,3mm e com 105cm de comprimento.

4.2 – Extrato Enzimático de *Aspergillus niger*

Os extratos de lipase de *Aspergillus niger* utilizados nesta etapa foram:

- Extrato de lipase extraído com tampão fosfato pH 7,0
- Extrato de lipase extraído com tampão fosfato pH 7,0 e com 1% de polietilenoglicol (PEG), usado como agente estabilizante

Para determinação da atividade dos extratos de *Aspergillus niger* foi utilizado a método titulométrico, descrito no item 3.33.b.ii.

4.2.1 – Processo de Imobilização do extrato enzimático

O método de imobilização da enzima lipase selecionado foi a imobilização por ligação covalente A imobilização por ligação covalente é o resultado da reação de um grupamento funcional do suporte com um grupamento presente na enzima. Dependendo do grupamento disponível no suporte, a ligação pode ocorrer com os grupos aminas, hidroxilas e/ou tióis da enzima que irão influenciar na sua atividade quando imobilizada. A avaliação do desempenho do método de imobilização do componente biológico selecionado foi realizada conforme descrito no item 3.7 e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.2 e na Tabela 4.1 bem como os valores da atividade da enzima lipase imobilizada (atividade do derivado), seu percentual de atividade recuperada, e o rendimento da imobilização.

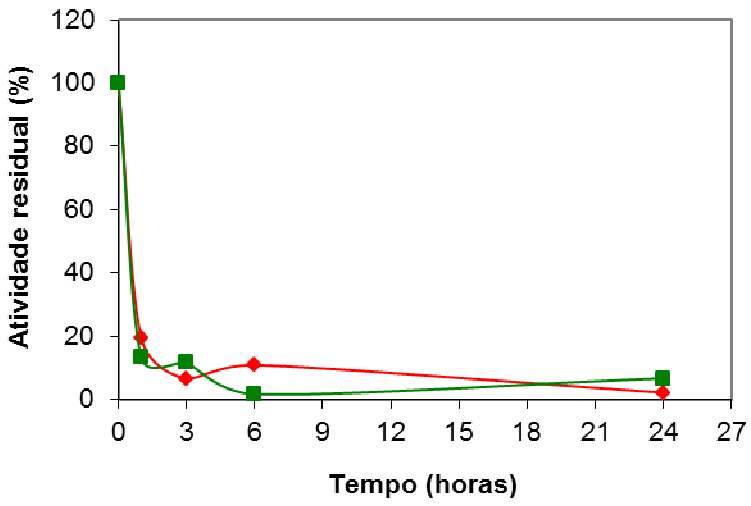


Figura 4. 3 – Atividade residual do sobrenadante durante o processo de imobilização, (♦) tampão, (■) tampão + PEG

Para ambos os extratos enzimáticos de *Aspergillus niger* utilizados, com e sem PEG, ocorreu uma redução na atividade enzimática do sobrenadante, como pode ser visto na Figura 4.3 apresentando um rendimento de imobilização em torno de 90%, sugerindo que boa parte da enzima que encontrava-se livre na solução foi ligada ao suporte. Quando comparando as atividades das lipases imobilizadas com e sem PEG, foi possível constatar que não houveram diferenças significativas entre os valores da atividade. Desta forma em ensaios posteriores o PEG não foi mais utilizado para extração da enzima, visando tornar mais econômica a obtenção do extrato enzimático.

Tabela 4. 1 – Dados do processo de imobilização da Lipase de *Aspergillus niger*.

	Atividade	
	Enzima + Tampão	**Enzima + PEG**
Atividade teórica imobilizada (U/mL)	31,10	29,8
Atividade da lipase imobilizada (U/g)	15,47	15,9
Rendimento de imobilização (%)	91,5	93,3
Atividade Recuperada (%)	49	53

As diferenças entre os valores de atividade teórica imobilizada e atividade da lipase imobilizada podem ser atribuídas a modificações na estrutura da lipase após a imobilização, a problemas de limitações difusionais, como dificuldades do substrato difundir até a matriz imobilizada, ou a resistência em liberar o produto para fora da matriz (Cabral *et al*, 2003). Gomes *et al* 2006 ao imobilizar lipase de *Candida rugosa* em celulignina também observou tal diferença no valor de atividade da lipase imobilizada, obtendo 193 U/g com 64% de atividade recuperada. Além disso, também pode ser explicado a partir do processo de produção do extrato. O extrato de *Aspergillus niger* foi obtido por fermentação semi-sólida usando como substrato sólido farelo de trigo triturado que contém grande quantidade de impurezas, que podem interferir durante o processo de ligação da enzima ao suporte. Sendo assim nos testes seguintes para imobilização da lipase de *Aspergillus niger* foi realizado primeiramente uma concentração do extrato com sulfato de amônio visando também eliminar parcialmente estas impurezas.

4.2.2 – *Concentração do Extrato Enzimático de Aspergillus niger*

Os resultados obtidos com o fracionamento com sulfato de amônio e as análises de cada fração em termos de atividade enzimática, estão apresentados na Tabela 4.2. Quando o extrato enzimático foi concentrado a 40% foi possível observar um aumento de atividade de 20,58 para 23,37U/mL e quando essa concentração foi aumentada para 60% também ocorreu um aumento para 30,28U/mL, porém quando a concentração foi aumentada para 80% ocorreu uma diminuição de atividade (28,08 U/mL) em relação ao extrato de 60%, sendo portanto, a melhor atividade obtida com a solução de 60% de concentração.

O mecanismo de precipitação de enzimas com sais decorre de um aumento da força iônica do sistema. Quando pequenas quantidades de sal são adicionadas à solução contendo enzimas, ocorre uma interação destas com as cargas provenientes da dissociação do sal e diminuição da interação inter-proteínas (neste caso enzima), aumentando a solubilidade no meio aquoso. Porém, em condições de elevada força iônica, decorrente da adição de grandes quantidades de sal, verifica-se um efeito oposto. As moléculas de

água, interagem mais fortemente com os íons provenientes da dissociação do sal, promovendo desta forma, a desidratação das enzimas. Durante esse processo, a interação inter-enzimas se torna mais forte, diminuindo a solubilidade das mesmas em meio aquoso e, consequentemente, a ocorrência de precipitação das enzimas (proteínas) (Hofland *et al.*, 2000 e Tomasula *et al.*, 1995). Como essa técnica está diretamente ligada ao ponto isoelétrico da enzima, quando a concentração de $(NH_4)_2SO_4$ foi elevada de 60% para 80% e a atividade diminuiu pode ter ocorrido precipitação de outras proteínas que podem interferiram no desempenho catalítico da lipase.

Tabela 4. 2 – Atividade dos extratos de *Aspergillus niger* com o processo de concentração

Quantidade de $(NH_4)_2SO_4$	**Atividade (U/mL)**
0 %	20,58
40%	23,37
60 %	34,28
80 %	26,08

Com base nos resultados obtidos na etapa anterior um novo teste foi realizado com o extrato de enzimático extraído sem PEG e concentrado a 60% $(NH_4)_2SO_4$.

A partir do gráfico exposto na Figura 4.3 foi possível observar que houve uma redução significativa nos valores de atividade do extrato enzimático que foi submetido ao processo de imobilização, (36,46 para 1,98 U/mL após 24 horas de reação) apresentando um rendimento de 94% (Tabela 4.4), valor semelhante ao encontrado na etapa anterior (rendimento de 91,5%). No entanto, quando comparamos as atividades das lipases imobilizadas verificamos que a lipase imobilizada a partir do processo com o extrato

concentrado foi maior do que com o extrato não concentrado, obtendo um valor de 22,96 U/mL (Tabela 4.3).

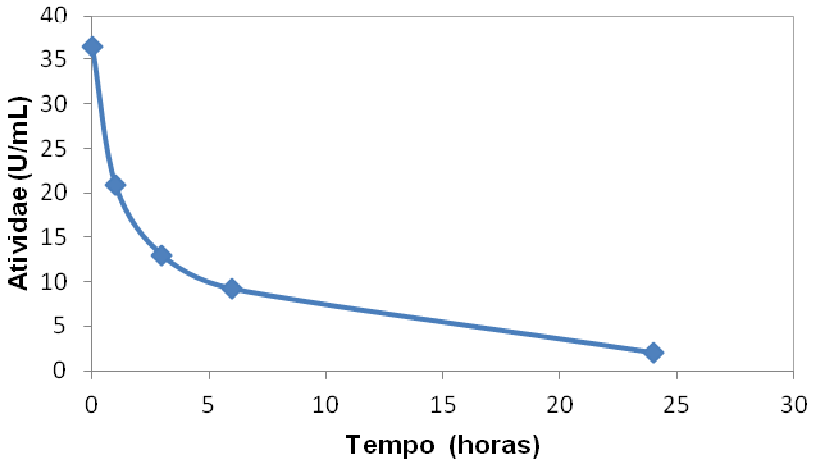


Figura 4. 4 - Atividade do sobrenadante durante o processo de imobilização com extrato concentrado (60 % de $(NH_4)_2SO_4$)

Tabela 4. 3 – Atividade da lipase de *Aspergillus niger* imobilização a partir dos extratos concentrado e não concentrado

	Atividade	
	Extrato Não – Concentrado	**Extrato Concentrado**
Atividade teórica imobilizada (U/mL)	31,10	34,48
Atividade da lipase imobilizada (U/g)	15,47	22,96
Rendimento de imobilização (%)	91,5	94
Atividade Recuperada (%)	49	62,5

A diferença encontrada entre os valores de atividades das lipases imobilizadas, pode ser explicado pelo fato de que com o extrato concentrado algumas impurezas presentes no extrato bruto, que possam ter interferidos no desempenho catalítico, foram eliminadas e assim foi observado um aumento no valor da atividade da lipase imobilizadas.

4.3 – Extrato Enzimático de *Yarrowia lipolítica*

Segundo Brígida (2010), o extrato de lipase produzido por *Yarrowia lipolítica* apresentou atividade hidrolítica em torno de 13,2 U/mL utilizando *p*-nitrofenil-laurato como substrato, porém como as amostras a serem utilizadas contém triglicerídeos e/ou ésteres obtidos a partir destes, foram realizados testes para verificar a atividade para substratos graxos do extrato de *Yarrowia lipolítica* utilizando o método descrito no item 3.3.a (ii).

Foram realizados testes de atividade lipolítica utilizando azeite de oliva como substrato para verificar o comportamento do extrato enzimático frente as diferentes concentrações do substrato testado. Na Tabela 4.4 estão apresentados os resultados das atividades obtidas em diferentes concentrações de azeite, sendo possível observar que a medida que a concentração do substrato aumenta o valor da atividade também aumenta. Quando comparamos os valores obtidos, com os valores apresentados por Brigída (2010), foi possível observar uma semelhança entres os valores obtidos demonstrando que o extrato de *Yarrowia lipolítica* também apresentou atividade para substratos graxos

Tabela 4. 4 - Atividade hidrolítica utilizando azeite de oliva como substrato.

Concentração Azeite de oliva (%)	Atividade (U/mL)
5	2,13
10	9,83
15	13,11
20	13,60
25	10,81
50	11,63
75	12,29

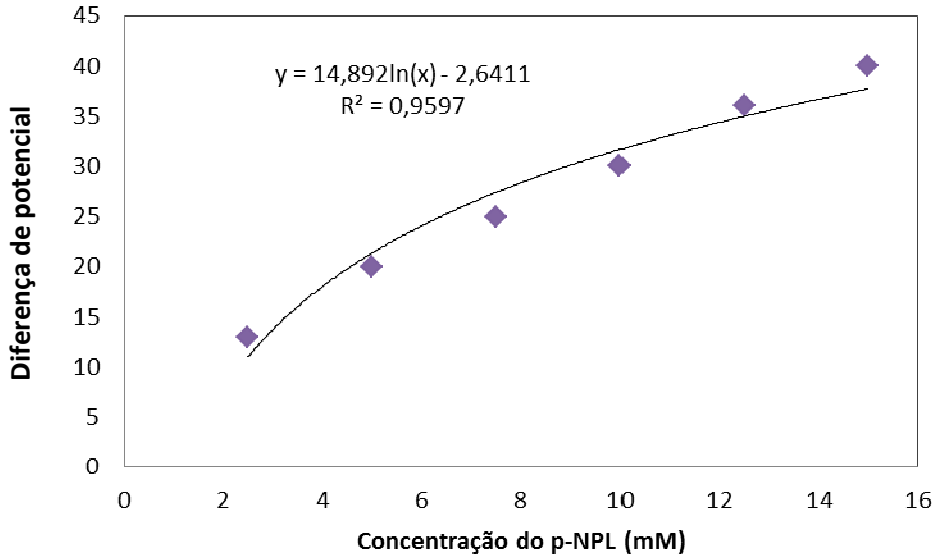
4.4 – Comparação entre os Extratos Enzimáticos de *Aspergillus niger* e *Yarrowia lipolítica* usando como substrato *p*-nitrofenil laurato

Com base na reação catalisada pela lipase, o transdutor selecionado inicialmente foi o sistema eletrodo de pH e pHmetro. Este eletrodo mede a diferença de potencial entre duas superfícies que variam de acordo com o pH da solução, na qual estão imersos. Para verificar se o eletrodo respondia as variações decorrentes nas amostras pela ação da lipase foram realizados inicialmente testes com soluções de p-nitrofenil-laurato em diferentes concentrações variando de 2,5 a 15 mM, na temperatura de 37ºC por um tempo de 15 minutos. Na Tabela 4.5 estão apresentados os valores de diferença de potencial (mV) obtidos para cada concentração de p-nitrofenil-laurato usada, para ambos os extratos utilizados.

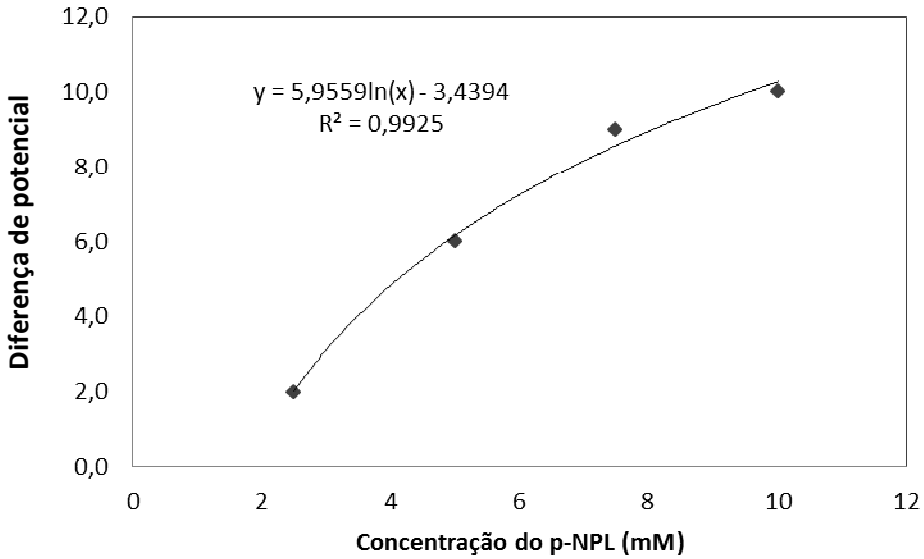
Tabela 4. 5 – Variaçã de potencial (mV) obtido pela ação dos extratos enzimáticos na presença do substrato p-nitrofenil-laurato.

Concentração de *p*-Nitrofenil-laurato (mM)	***Variação de potencial dos extratos enzimáticos (mV)***	
	Aspergillus niger	***Yarrowia lipolítica***
2,5	2,0	13
5,0	6,0	21
7,5	9,0	25
10	10	30
12	10	36
15		40

As Figuras 4.5 a e 4.5 b apresentam uma curva de resposta relacionando o valor de variação da diferença de potencial em relação a concentração de *p*-NPL.



(a) *Yarrowia lipolytica*



(b) *Aspergillus niger*

Figura 4. 5 - Variação da diferença de potencial (mV) em diferentes concentrações de p-nitrofenil-laurato (Curva de linearidade dos extratos enzimáticos) (a) *Yarrowia lipolytica* (b) *Aspergillus niger*)

A partir da Figura 4.5 é possível observar que o extrato de *Yarrowia lipolítica* apresentou uma linearidade logarítmica na resposta da diferença de potencial, gerado em função da atividade da enzima que provoca a liberação de íons H^+, em função da concentração do substrato *p*-nitrofenil-laurato variado

na faixa de 2,5 – 15mM (Figura 4.5a). Já para o extrato de *Aspergillus niger* a linearidade logarítmica foi observada até uma concentração de 10mM de *p*-nitrofenil laurato (Figura 4.5b).

Além dos extratos terem apresentados faixas de linearidade logarítmica de respostas diferentes, os coeficientes de correlação encontrados para as curvas foram superiores a 0,9, o que indica boa sensibilidade do método. Desta forma, o sistema selecionado (lipase + eletrodo de pH) se mostrou apto para medir a concentração do produto final formado a partir da reação enzimática, nas condições testadas para concentrações de substrato na faixa de 2,5 a 15 mM. A partir destes resultados, foram então realizados testes usando os extratos enzimáticos em amostras contendo ésteres de cadeias longa, como triglicerídeos e ésteres metílicos e etílicos.

4.5 – Comparação entre os Extratos Enzimáticos de *Aspergillus niger* e *Yarrowia lipolítica* usando como substrato amostras reais (azeite de oliva e óleo de soja)

Primeiramente foi determinada a atividade dos extratos enzimáticos seguindo o procedimento padrão (item 3.3 (a ii)), o método da hidrólise do azeite de oliva emulsificado. Depois o mesmo método foi aplicado para avaliar o desempenho dos extratos com relação a utilização do óleo de soja como substrato.

Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 4.6, onde verifica-se que ambos os extratos apresentaram atividade frente aos dois substratos utilizados. O extrato de lipase de *Yarrowia lipolítica* apresentou um valor de atividade maior quando comparado ao extrato de *Aspergillus niger* quando foi utilizado o azeite de oliva como substrato, porém quando utiliza-se o óleo de soja como substrato ocorreu o contrário, ou seja, o extrato de *Aspergillus niger* apresentou maior atividade. Esta diferença nos valores de atividade pode estar relacionada com a composição dos ácidos graxos presentes em cada tipo de óleo utilizado como substrato, onde para o azeite de oliva destaca-se o ácido oléico e para o óleo de soja o ácido linoléico.

Tabela 4. 6 – Atividade dos extratos em diferentes substratos.

Extrato enzimático	**Atividade U/mL**	
	Azeite de oliva	**Óleo de Soja**
Yarrowia lipolytica	23,14	10,93
Aspergillus niger	13,76	18,29

Na Figura 4.6 são apresentadas as atividades dos extratos de lipase de *Aspergillus niger* e de *Yarrowia lipolytica* em função da concentração dos ácidos dos graxos presentes na emulsão óleo e água contendo diferentes proporções de óleo de soja (10- 70% v/v). Os resultados obtidos sugerem que a atividade de ambos os extratos enzimáticos de lipase, em função da concentração de ácidos graxos, segue cinética do tipo Michaelis-Menten, indicando que a faixa de concentração estudada não detectou uma possível inibição por produtos de reação ou pela redução do teor de água no meio reacional.

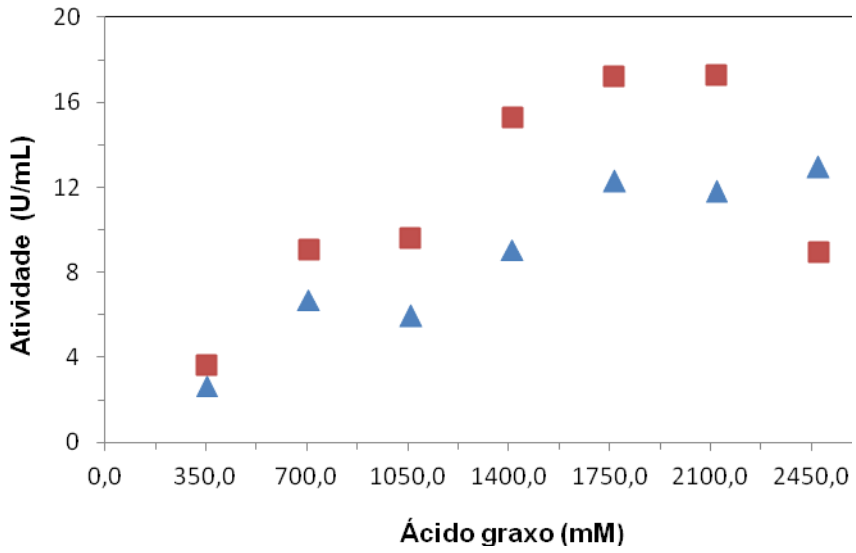


Figura 4. 6 - Atividade dos extratos de lipase, (■) *Aspergillus niger* (▲) *Yarrowia lipolytica*, em função da concentração de ácidos graxos presentes nas emulsões óleo soja:água. Ensaios realizados em pH 7,0 (*Yarrowia lipolytica*) e pH 4,0 (*Aspergillus niger*) a 37ºC.

As constantes de afinidade pelo substrato (K_M) e a velocidade máxima de reação (V_{max}) foram calculadas pelo método de Linewearver-Burk (método

de linearização) e os modelos propostos levaram aos resultados apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4. 7 – Equações, coeficiente de correlação do *modelo linear invertido* e constantes cinética para os extratos de lipase.

	Extrato enzimático	
	Aspergillus niger	***Yarrowia lipotica***
Equação	y = 95,221x + 0,0074	y = 124,59 + 0,0266
K_M (mM)	1050	800
V_{max} (U/mL)	18	12
R^2	0,994	0,987

Durante a determinação dos parâmetros cinéticos de extratos enzimáticos de lipase um cuidado rigoroso deve ser tomado, isso porque em sistemas emulsificados, devido a sua elevada viscosidade, o acesso do substrato ao sitio ativo da enzima é considerado um fator de restrição (Gomes *et al*, 2006), de forma que observações de dados descritos na literatura indicam uma redução nos valores de K_M para lipase imobilizada da ordem de 50% em relação aos valores determinados para lipases em sua forma livre. Gomes *et al* (2006) determinaram o K_M de lipase de *Candida rugosa* livre e imobilizada em celulignina (35% de lignina, 65% celulose) quimicamente modificada por carbonildimadazol e verificaram que o valor de K_M para lipase imobilizada aumentou (560,3 mM para lipase livre e 924,8 mM para lipase imobilizada) indicando que mediante imobilização a afinidade da lipase pelo substrato foi reduzida. Esse comportamento se deve à menor transferência de massa do meio reacional para o sistema imobilizado, pois o processo de imobilização reduz a difusão do substrato nos interstícios do suporte.

Assim, foi possível observar que em ambos os extratos a cinética de atuação das enzimas apresentaram um perfil semelhante, no qual a sua atividade aumentava proporcionalmente ao aumento na concentração de substrato sugerindo uma linearidade de resposta, de forma que ambos podem a principio serem utilizados para futura construção do biossensor, sendo para

isso necessário avaliar o seu desempenho juntamente com o sistema de transdução a ser utilizado, eletrodo de pH.

A Tabela 4.8 mostra a variação da diferença de potencial nas amostras de óleo de soja após a adição dos extratos enzimáticos. Para o extrato enzimático de *Yarrowia lipolítica* (Figura 4.7 (a) e (b)) o perfil apresentado mostra coerência, onde o catalisador (extrato enzimático) após a reação libera ácidos graxos ocorreu uma variação de potencial de 11,3 mV e 1,6 mV para as amostra de 20% e 50% de óleo, respectivamente. O valor de variação de potencial obtido com 50% de óleo foi menor do que o observado com 20% de óleo, essa diferença pode ter ocorrido devido a dificuldade por parte do eletrodo em reconhecer os íons H^+ formados, pois trata-se de amostras viscosas.

Para o extrato enzimático de *Aspergillus niger* tal perfil só foi observado depois de 7 min, valores de mV foram diminuindo a medida que ocorreu a formação dos ácidos graxos livres (Figura 4.7 (c)). Tal fato também foi observado por Reddy *et al*, (2001) & Reddy *et al* (2003) que em teste utilizando lipase pancreática imobilizadas em silício poroso para determinação potenciométrica de triglicerídeos, usando tributirina (um éster de cadeia curta) como substrato. Estes autores observaram um comportamento hidrolítico da enzima, em diferentes concentrações, variando de 2 a 30 mM, sendo possível observar uma linearidades de respostas entre as concentrações de 10 a 40mM, porém quando utilizaram amostras de sangue os autores observaram a necessidade da elaboração de uma nova curva de calibração para retratar melhor a matriz complexa a ser analisada.

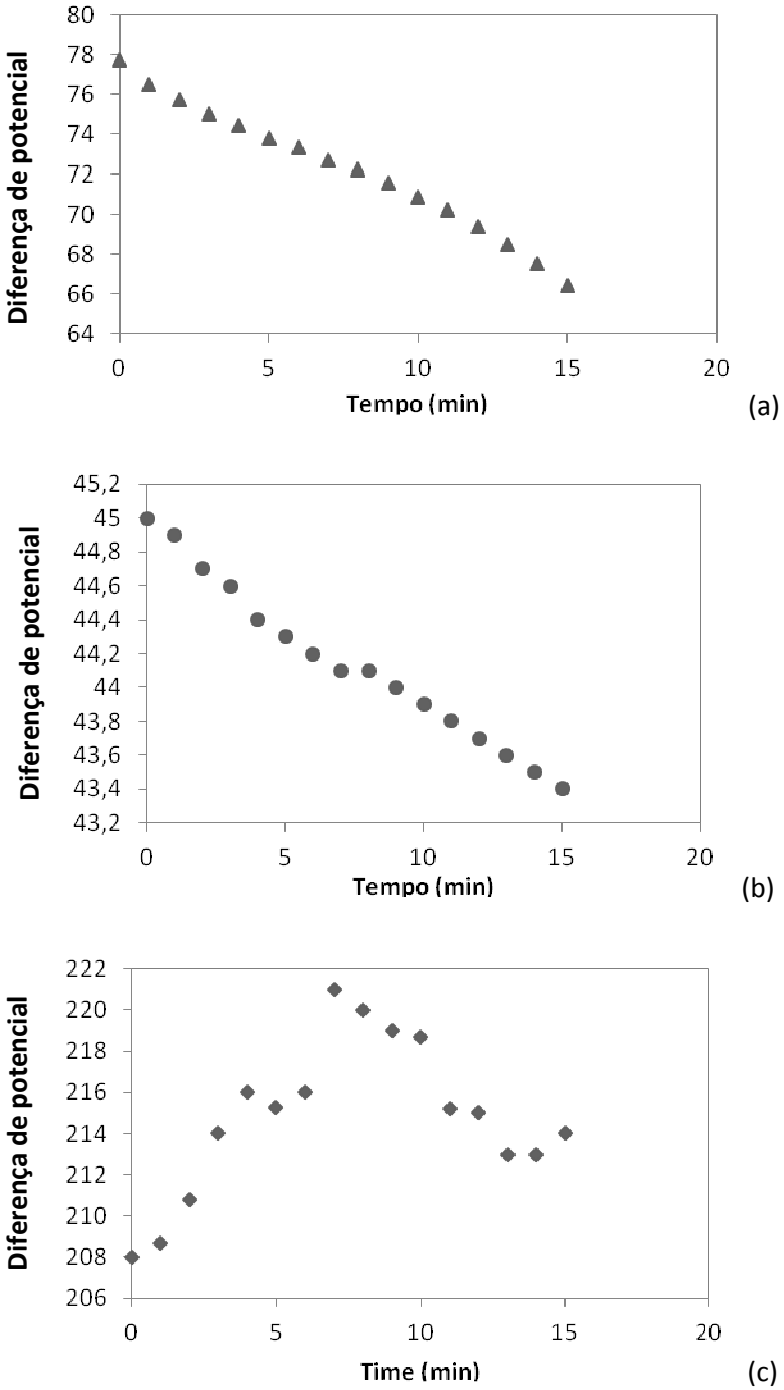


Figura 4. 7 - Valores de variação de potencial (Δ mV) em amostra de óleo soja com extrato enzimático de *Yarrowia lipolytica* (a) 20% v/v e (b) 50%v/v de óleo de soja (c) extrato de *Aspergillus niger* com 50% v/v de óleo de soja.

Tabela 4. 8 – Variação da diferença de potencial em amostras de óleo de soja com diferentes concentrações.

Concentração de óleo de soja (%v/v)	Variação de potencial *extrato enzimático (mV)*	
	Aspergillus niger	***Yarrowia lipolítica***
20%	4,9 ± 0,06	11,3 ± 0,21
50%	6,4 ± 0,14	1,6 ± 0,19

Ensaios realizado em triplicada

Como o objetivo central do presente trabalho foi o desenvolvimento de um biossensor para monitoração da qualidade de amostras de biodiesel, avaliou-se ada a eficiência de atividade dos extratos enzimáticos utilizando biodiesel como substrato. Os resultados, apresentados na Tabela 4.9, demonstra para os ésteres formados após a transesterificação do óleo de soja, os extratos apresentaram perfis diferentes (opostos). No extrato de *Yarrowia lipolítica* o valor de atividade aumentou com o aumento da concentração de substrato (biodiesel), porém para o extrato de *Aspergillus niger* o valor de atividade diminuí com a aumento da concentração de substrato.

Tabela 4. 9 – Atividade dos extratos enzimáticos usando biodiesel como substrato

Concentração de biodiesel l(%v/v)	***Atividade (U/mL)***	
	Aspergillus niger	***Yarrowia lipolítica***
20%	4,45	2,02
50%	1,34	6,38

Para os testes com o sistema de transdução e as enzimas foram selecionados concentrações mais baixas de biodiesel (10 a 30 % v/v) de modo a verificar seu comportamento. Em ambos os extratos estudados, no presente trabalho, foi verificada a variação de potencial após a ação da enzima ao substrato (biodiesel) (Tabela 4.10)

Tabela 4. 10 – Variação de diferença de potencial (mV) em amostras de biodiesel.

Concentração de biodiesel (%v/v)	∆ *mV extrato enzimático*	
	Aspergillus niger	***Yarrowia lipolítica***
10%	4,7 ± 0,16	2,1 ± 0,04
20%	7,4 ± 0,09	4,7 ± 0,08
30%	10,7 ± 0,1	6,3 ± 0,08

Os extratos enzimáticos de *Aspergillus niger* e de *Yarrowia lipolítica* juntamente com o transdutor selecionado (eletrodo de pH), apresentaram resposta de variação de diferença de potencial proporcional ao aumento da concentração das amostras de biodiesel, características adequada para ser utilizada no desenvolvimento do biossensor, pois o transdutor utilizado foi capaz de detectar os íons formados pela ação do biocompomente (extrato enzimático) sob o substrato selecionado, neste caso o biodiesel.

Como o objetivo do trabalho visa selecionar a lipase que melhor se adeque a construção do biossensor enzimático para o controle de qualidade de amostras de biodiesel foram realizados também ensaios com lipase comercial de *Candida rugosa* tipo VII.

4.6. – LIPASE COMERCIAL (Lipase de *Candida rugosa* tipo VII Sigma-Aldrich).

Para avaliar a eficiência da aplicação da Lipase comercial de *Candida rugosa* para construção do biossensor proposto foram realizados ensaios para determinar as melhores condições de atuação da enzima livre como imobilizada.

4.6.1 – Influência do pH e da força iônica na atividade da enzima.

O desempenho catalítico das enzimas está diretamente relacionado a sua conformação e a estabilidade da sua estrutura molecular, que por sua vez a depende das condições ambientais do meio reacional, tais como pH e força

iônica do meio, assim um planejamento experimental completo 2^2 (Delineamento Composto central rotacional - DCCR) foi realizado, tendo como variáveis independentes: pH e força iônica do meio reacional, sendo a força iônica do meio baseada na concentração molar da solução tampão utilizada (tampão fosfato de potássio (29,5 a 170,5 mM)) para determinar a influências destas nas variáveis respostas. As variáveis respostas utilizadas foram a atividade enzimática e a variação da diferença de potencial, conforme descritos no item 3.3 (a i) e no item 3.10, respectivamente.

Os níveis utilizados e os resultados obtidos no planejamento experimental são apresentados nas Tabelas 4.11 e 4.12.

Tabela 4. 11 - Faixa de valores estudados para o estudo da influencia do pH e força iônica

Variáveis	**Níveis**				
	-1,41	**-1**	**0**	**+1**	**+1,41**
pH	6,5	7,15	8,75	10,35	11,0
Força iônica (mM)	29,5	50	100	150	170,5

Tabela 4. 12 - Resultados obtidos no DCCR 2^2 para influência do pH e força iônica.

Ensaios	Valores Codificados		Valores Reais		Atividade Enzimática (U/mL)	Variação de potencial
	pH	Força iônica	pH	Força iônica		
1	-1	-1	7,15	50	413,78	1,0
2	+1	-1	10,35	50	609,19	11,0
3	-1	+1	7,15	150	195,4	2,0
4	+1	+1	10,35	150	275,85	4,0
5	-1,41	0	6,5	100	0,0	0,0
6	+1,41	0	11,0	100	126,43	14,0
7	0	-1,41	8,75	29,5	482,75	6,0
8	0	+1,41	8,75	170,5	409,95	13,0
9	0	0	8,75	100	505,74	10,0
10	0	0	8,75	100	482,75	10,0
11	0	0	8,75	100	494,75	9,0

A partir da Tabela 4.12 é possível observar que houve uma variação nos valores obtidos tanto para atividade enzimática, de 0,0 a 505,74 U/mL (ensaio 9, quando se realizou o experimento em pH 8,75 e força iônica de 100), como para a variação de potencial de 0,0 a 14,0 (ensaio 6, condições utilizadas pH 11 e força iônica 100). Esta variabilidade dos resultados indicam que a enzima lipase utilizada foi sensível ás variáveis e faixas de valores estudadas, neste caso pH e força iônica do meio reacional.

Analisando os resultados dos pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11) e calculando as médias e desvios padrões destes ensaios, obtém o desvio percentual de 2,33% para atividade enzimática e de 0,58% para variação de potencial, indicando que foi possível obter uma reprodutibilidade.

Os resultados apresentados na Tabela 4.13 mostram que a atividade da lipase foi afetada pelo pH ($p = 0,005078$) e pela força iônica ($p = 0,002459$). Um incremento no valor da força iônica (nível -1 para +1) conduziu a um

decréscimo na atividade, enquanto que um incremento nos valores de pH levaram a um aumento na atividade da enzima, indicando que o pH teve um efeito positivo (aumento de pH de 7,15 a 10,35 elevou a atividade enzimática em média de 113,66 U/mL). Quando analisamos a estimativa dos efeitos para a variação de potencial pode-se verificar que apenas o pH foi estatisticamente significativo na variável resposta, apresentando um efeito positivo em media de 7,95 mV de aumento na resposta (Tabela 4.13).

No entanto, realizar ensaios com valores de pH acima da faixa determinada podem provocar perda de estabilidade e desnaturação da enzima. Assim analisando a Tabela 4.13 e as Figuras 4.8a e 4.8b para as duas variáveis respostas foram selecionados pH 8,75 e 50mM para as próximas etapas do trabalho.

Tabela 4. 13 - Estimativa dos efeitos para atividade (U/mL) evariação de potencial (mV).

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor
	Atividade				Variação de potencial			
Media	494,413	6,639	74,474	0,000180	9,6667	0,333333	29,000	0,001187
pH	113,665	8,131	13,979	0,005078	7,94975	0,408248	19,47282	0,002627
Força iônica	-63,669	8,131	-20,13	0,002459	0,97487	2,38794	2,38794	0,139572

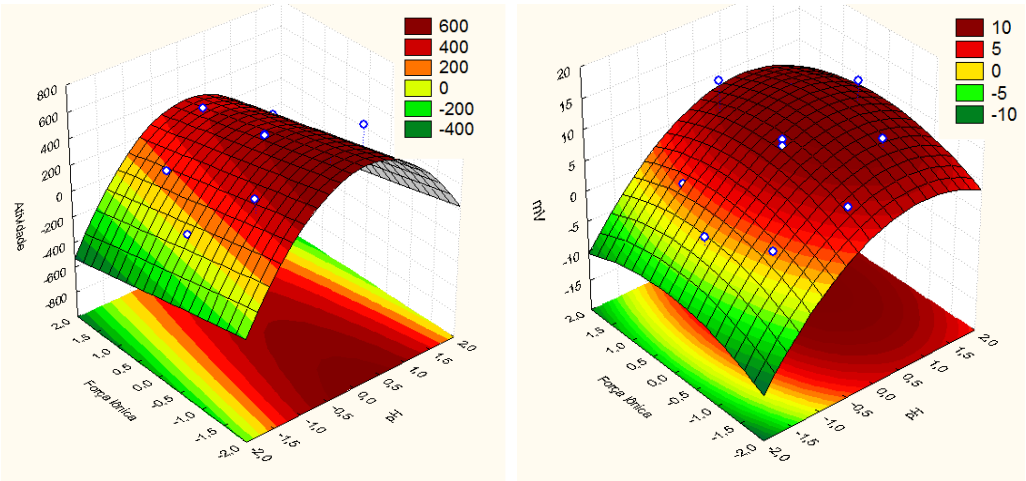


Figura 4. 8 - Superfície de resposta para (a) atividade (U/ml) e (b) variação de potencial

4.6.2 – Imobilização da Enzima Lipase Comercial

A fim de determinar o tempo ideal para o procedimento de imobilização da enzima lipase comercial, foram adicionados 20mL de solução enzimática, em tampão fosfato de potássio 50mM pH 7,0, por grama de suporte ativado. O conjunto foi mantido sob agitação orbital durante 24 horas a temperatura ambiente; nesse caso, não foi utilizado agitador magnético a fim de se evitar possíveis abrasões no suporte. Nos tempos de 0, 1h, 2h, 4h, 6h e 24h, foram retiradas alíquotas do sobrenadante reacional, para verificar a atividade enzimática residual na fase líquida.

A Figura 4.9 (a) mostra que a atividade enzimática no sobrenadante tende a zero antes de se completar 1 hora de exposição das enzimas ao suporte ativado. Logo, subentende-se que toda a enzima presente anteriormente na solução foi ligada covalentemente ao suporte com menos de 1 hora de reação, já que o sobrenadante reacional não apresenta mais atividade após este tempo.

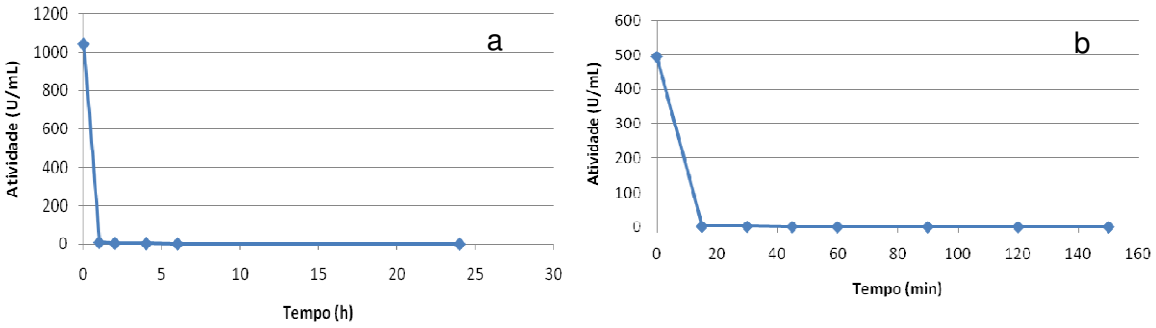


Figura 4. 9 - Decaimento da atividade enzimática do sobrenadante durante o processo de imobilização enzimática da enzima lipase comercial (a) com 24 horas de imbilização, (b) com 3 horas de imobilização.

A partir dos valores de atividade enzimática no início (1042,12 U/mL) e no fim (0,345 U/mL) do processo de imobilização, foi possível calcular rendimento de 99,97% para o processo de imobilização.

Foi realizado, ainda, um segundo experimento medindo-se as atividades enzimáticas dos sobrenadantes reacionais em tempos menores, a saber: 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 150 minutos. A Figura 4.7(b) demonstra que houve

significativo decaimento da atividade enzimática no sobrenadante após 15 minutos do início da imobilização obtendo um rendimento de 99,83% para o processo.

Comparando-se a atividade do derivado imobilizado obtido nos dois processos de imobilização (com 24hs e 3hs) foi possível observar que a atividade obtida, em ambos os casos, foram bem semelhantes, 148,37 U/g e 157,23 U/g, respectivamente, sendo então selecionado o tempo de 3hs como tempo necessário para o processo de imobilização. C-H Kuo *et al* 2012 após realizar estudos avaliando o tempo de imobilização de lipase de *Candida rugosa* (Amono Ay-30) e determinaram que para o suporte selecionado (quitosana-Fe_3O_4) a melhor atividade obtida do derivado imobilizado foi com 3,5 hs de processo obtendo 20U/g de quitosana-Fe_3O_4.

Para verificar as melhores condições de atuação da enzima lipase imobilizada foi realizado um planejamento DCCR 2^2 com quatro pontos axiais e 3 pontos centrais (Tabela 4.14), analisando a influência de duas variáveis de reação, temperatura e pH do meio reacional.

Tabela 4. 14 – Faixa de valores estudados para o estudo da influencia do pH e temperatura para lipase comercial imobilizada.

Variáveis	**Níveis**				
	-1,41	**-1**	**0**	**+1**	**+1,41**
pH	3	3,9	6	8,1	9
Temperatura	20	26	40	54	60

A Tabela 4.15 mostra os resultados do planejamento DCCR 2^2, onde os valores das variáveis resposta, atividade enzimática, variam de 0,00 a 562,06 U/g nas condições estudadas, para os 11 experimentos. Ressalta-se ainda que a diferenciação entre estes pontos de máximo e de mínimo é bem maior do que a variação do valor da atividade enzimática para as condições do ponto central, onde se estuda a reprodutibilidade do experimento (Δ = 8,68), indicando que as variações observadas para os diferentes ensaios do planejamento são decorrentes das diferentes condições do meio reacional.

Tabela 4. 15 - DCCR 2^2 para influência da temperatura e do pH na atividade enzimática da enzima lipase comercial imobilizada

Ensaios	Valores Codificados		Valores Reais		Atividade Enzimática (U/g)
	pH	Temperatura	pH	Temperatura	
1	-1	-1	3,9	26	0,00
2	+1	-1	8,1	26	234,8
3	-1	+1	3,9	54	0,00
4	+1	+1	8,1	54	362,75
5	-1,141	0	3,0	40	0,00
6	+1,41	0	9,0	40	562,06
7	0	-1,141	6,0	20	0,00
8	0	+1,41	6,0	60	303,44
9	0	0	6,0	40	113,80
10	0	0	6,0	40	96,55
11	0	0	6,0	40	103,45

O maior valor de atividade da lipase imobilizada (562,06 U/g) foi encontrado no ensaio 6, quando se realizou o experimento com valor de pH no ponto extremo (9,0) e com valor de temperatura no ponto central (40ºC), por outro lado os experimentos realizados com valores de pH 3,0; 3,9 e 6,0 não apresentaram atividades, demonstrando que a enzima lipase comercial utilizada no presente estudo apresenta um melhor comportamento em meio alcalino.

De acordo com o teste *t*, apresentado no gráfico de Pareto (Figura 4.10) o fator mais importante foi a variação de pH, o qual teve um efeito altamente significativo (99% de nível de confiança). O efeito temperatura e a interação entre eles também foram significativos ($p < 0,01$). Os valores apresentados no gráfico de Pareto mostram que todas as variáveis independentes estudadas e a sua interação apresentaram um efeito positivo na atividade da lipase imobilizada.

Tal característica também foi detectada por Bayramoglu *et al.,* (2002) e Paula *et al*., (2008) que relataram que lipase de *Candida rugosa* tipo VII (mesma utilizada no presente trabalho), após processo de imobilização por ligação covalente em suporte polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) e membrana de hidrogel (pHEMA-MAPA / 2-hydroxyethylmethacrylate-co-methacrylamido-phenylalanine), respectivamente, apresentaram melhor desempenho hidrolítico em meio alcalino (pH 8,0 – 8,5) e um aumento de atividade enzimática proporcional ao aumento de temperatura reacional até 50ºC, ocorrendo em temperaturas superiores um decaimento de atividade hidrolítica do derivado imobilizado.

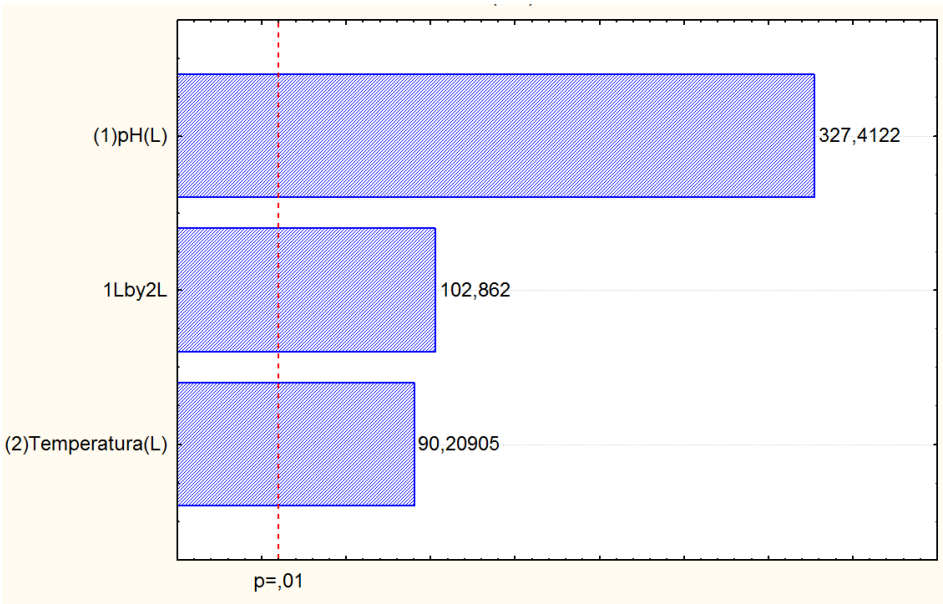


Figura 4. 10 - Efeitos das variáveis independentes estudadas para enzima lipase comercial.

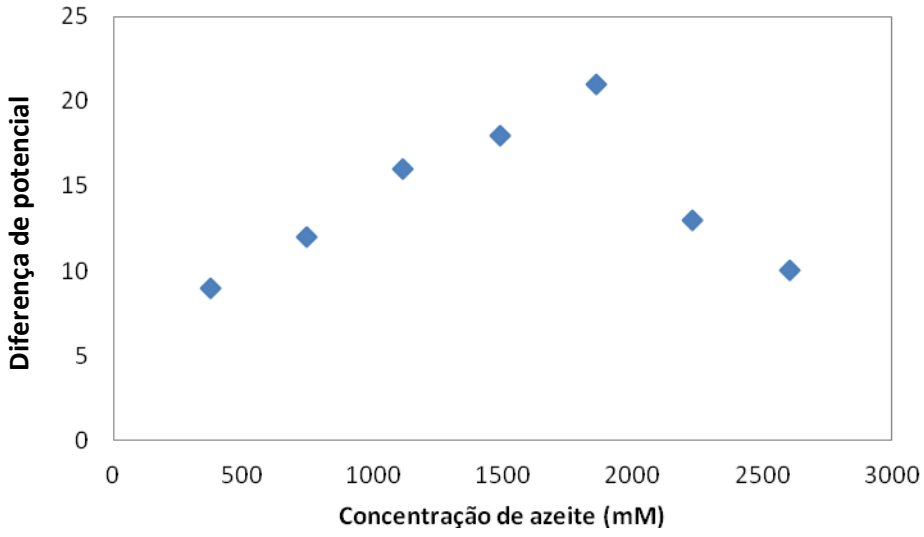
4.6.3 – Testes usando o Sistema de Análise Biossensor Potenciométrico

Para os testes posteriores visando adaptar a enzima lipase comercial de Candida rugosa livre e imobilizada ao sistema de transdução, usado no biossensor proposto, foi utilizado o sistema de análise mostrado na Figura 4.2.

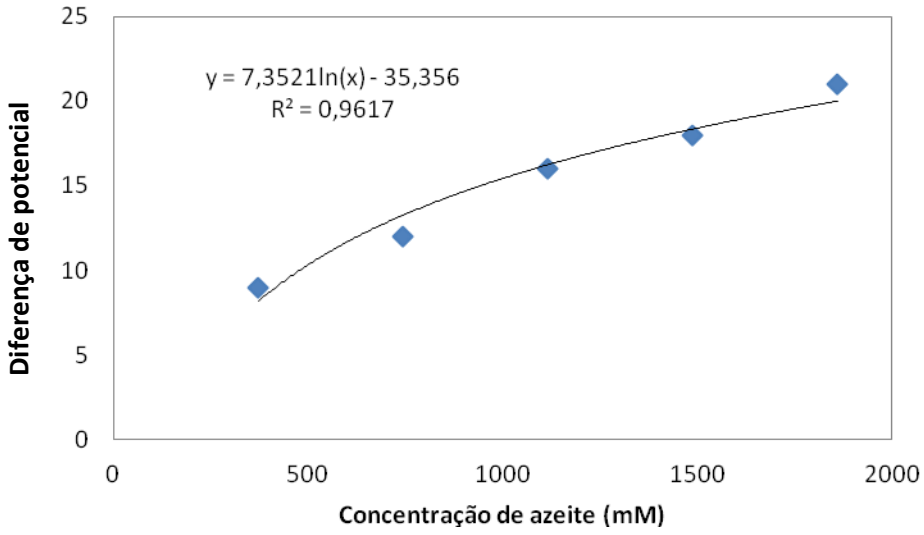
a) Testes com enzima Lipase Comercial de *Candida rugosa* Livre

Para verificar a resposta do sistema transdutor (mV) pela ação da enzima lipase (solução enzimática com 494,25U/mL) sobre amostras de triglicerídeos, foram realizados inicialmente testes estáticos usando o sistema de análise. Nestes ensaios a enzima livre foi colocada em contato com as soluções de substrato (azeite de oliva), preparadas nas concentrações de 372 a 2604 mM, por um tempo reacional de 15 minutos na temperatura de 37ºC.

A Figura 4.12 mostra a variação de potencial em resposta a ação da atividade da lipase na forma livre em amostras de azeite de oliva em diferentes concentrações durante os testes estáticos. A partir da Figura 4.12a é possível observar que até uma concentração de 1860mM de azeite de oliva foi possível obter uma linearidade logarítmica na resposta da variação de mV em relação a atividade da enzima, em função da formação do produto (H^+) (Figura 4.12b). A mesma relação de linearidade logarítmica também foi obtida quando foram utilizadas amostras de biodiesel nas concentrações variando de 253,4 a 1766,9 mM (Figura 4.13).



(a)



(b)

Figura 4. 11 - (a) Variação de potencial em resposta a ação da atividade da lipase na forma livre em amostras de azeite de oliva em diferentes concentrações (b) parte linear.

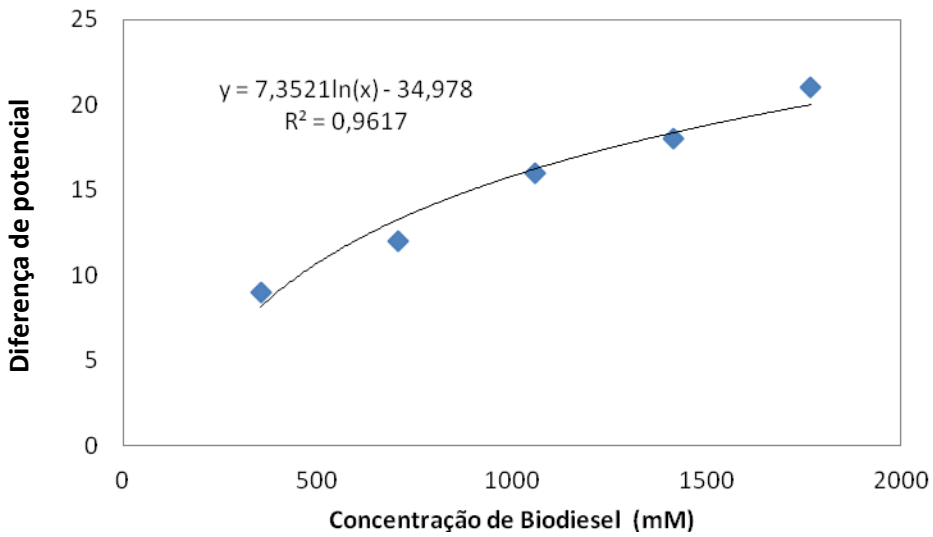
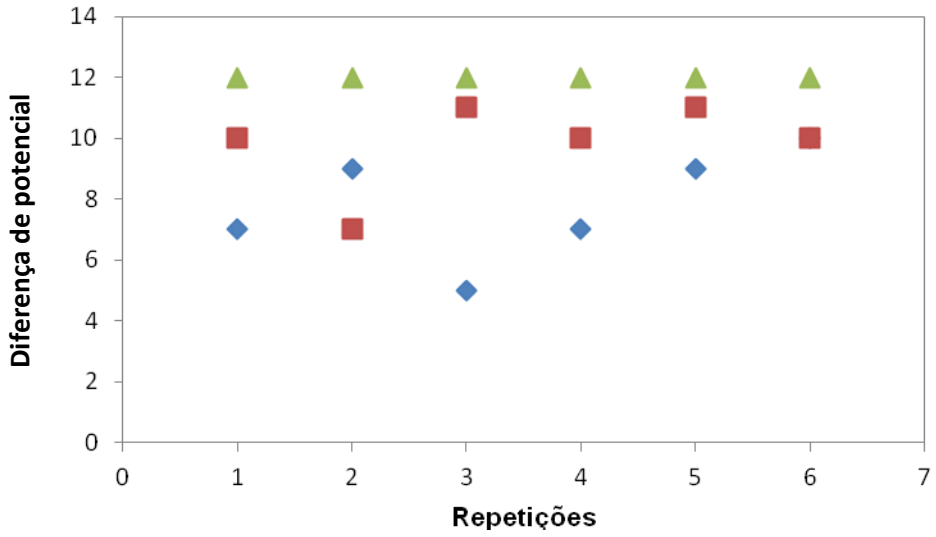


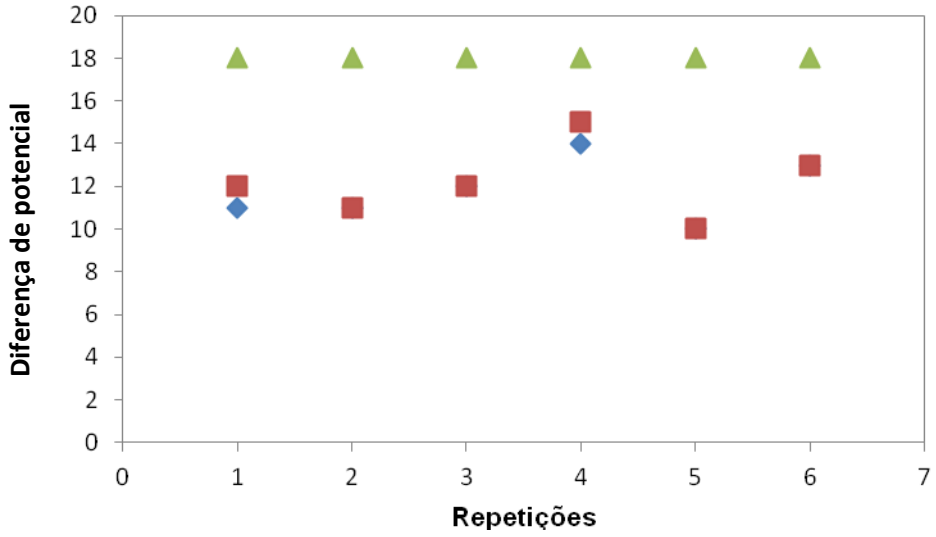
Figura 4. 12 - Variação de potencial em resposta a ação da atividade da lipase na forma livre em amostras de biodiesel em diferentes concentrações.

Além do comportamento logarítmico (com R^2 = 0,9617), demonstrando a sensibilidade do método de análise proposto, outro critério avaliado foi a estabilidade de resposta do sistema de transdução proposto em relação ao tempo da reação enzimática. Testes sucessivos (seis testes) foram realizados com amostras de azeite de oliva e biodiesel com a mesma concentração (744 e 1413,56mM, respectivamente) e com a mesma quantidade de solução enzimática (1 mL de solução de atividade de 494,25U/mL) a 37ºC, variando o tempo reacional, sendo os resultados apresentados na Figura 4.13.

Os resultados apresentados (Figura 4.13) demonstram que com 5, 10 e 15 min de reação enzimática o sistema enzima-transdutor de pH, demonstraram estabilidade, ou seja, foram obtidos desvios médios de 1,333; 0,667, e 0 respectivamente, nas análises realizadas, mostrando que tal sistema pode ser utilizado para detecção do sinal da resposta biológica da reação enzimática da lipase, quando esta é utilizada na sua forma livre.



(a)



(b)

Figura 4. 13 - Avaliação da estabilidade de resposta do sistema transdutor com o tempo de reação (▲) 5 min (▲) 10 min (▲) 15 min, (a) Azeite de oliva (744 mM), (b) Biodiesel (1413,56 mM).

b) Testes com enzima Lipase Comercial de Candida rugosa Imobilizada

Ensaios com a enzima imobilizada foram realizados a fim de verificar se também nesta condição a resposta do sistema transdutor se mantinha estável, pois para ser considerado um biossensor, o componente biológico deve está em contato direto com elemento transdutor e para atender essa exigência a enzima deve esta imobilizada.

Ensaios visando a construção da curva de resposta para o sistema eletrodo de pH e a enzima imobilizada foram realizados, acoplando a enzima e o eletrodo no sistema descrito na Figura 4.2, sob vazão de escoamento de 25 mL/min. Estes testes simulam uma calibração do biossensor proposto e podem ser realizados facilmente através de experimentos sob as condições padrões que variam para cada instrumento. Curvas então podem ser traçadas usando um conjunto de pontos experimentais obtidos observando o sinal de saída do instrumento (eletrodo de íon seletivo e transdutor de pH) para um determinado valor do sinal de entrada (concentração de amostra de biodiesel). Estas curvas são chamadas de curvas de calibração e permitem obter a faixa linear e o grau de linearidade da resposta do instrumento. Saber se a resposta de um instrumento é ou não linear é indispensável. Instrumentos não lineares não possuem relação direta da leitura do sinal de saída com o da entrada. Desta forma, para estes instrumentos é necessário obter uma função de calibração e a partir dela relacionar valores de saída e entrada.

Para a determinação das curvas de calibração para o biossensor enzimático, foram usadas amostras de biodiesel na faixa de concentração de 353,4 a 1766,9 mM; sendo testadas de forma crescente em valores de concentração, e com lavagem da enzima imobilizada com tampão fosfato de potássio durante as medidas e a variação de potencial obtida para cada concentração testada.

A curvas de calibração para o biossensor enzimático, pode se observadas na Figura 4.14.

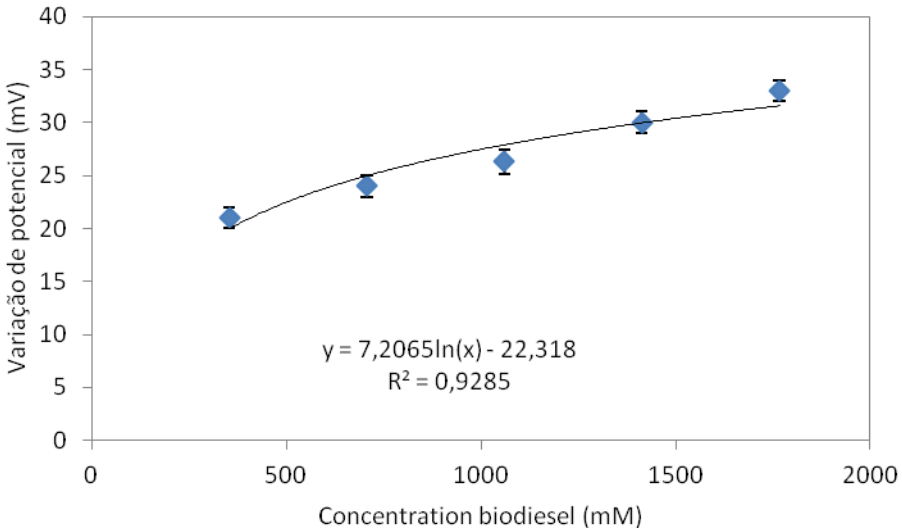


Figura 4. 14 - Curva de calibração para o biossensor enzimático usando enzima Lipase Comercial

Ao analisar a linearidade da curva apresentada na Figura 4.14 pode-se observar que as curva obtida usando o sistema biossensor enzimático em análise crescente de concentração de biodiesel e com lavagem entre as medidas foi a que apresentou linearidade logaritimica, com coeficiente de correlação de R^2 = 0,928, indicando uma boa relação de dispersão dos pontos gerados de entre os parâmetros avaliados, ou seja a variação de diferença de potencial cresce a medida que a concentração de amostra de biodiesel aumenta.

4.6.4 – Estimativa da Qualidade das amostras de biodiesel de soja aplicando o sistema biossensor desenvolvido

O principal objetivo da aplicação do biossensor enzimático desenvolvido é em amostras de biodiesel para detecção de triglicerídeos e detecção da qualidade das amostras quando submetidas a estocagem. Em relação aos triglicerídeos, ou ácidos graxos, estes podem estar presentes nestas amostras quando a reação de transesterificação para produção de biodiesel não for

completa, diferença esta percebida, pela detecção do pH da amostra com e sem o uso do biossensor enzimático.

Em relação a estocagem ou quando as amostras de biodiesel são expostas a condições de oxidação, o que pode gerar a degradação dos ésteres, o biossensor não deve apresenta resposta, por não haver substrato, ésteres, para ação da enzima lipase, não havendo portanto produção de ácidos graxos e variação de potencial detectável.

Para comprovar a aplicabilidade do biossensor desenvolvido em amostras reais quando expostas a condições oxidantes, amostras de biodiesel de três diferentes concentrações foram submetidas ao processo de oxidação, como descrito do item 3.10, e analisadas pelo biossensor, sendo a resposta em diferença de potencial detectada. Os resultados são apresentados na Tabela 4.16.

Tabela 4. 16 - Respostas do biossensor enzimático a amostras de Biodiesel antes e após o processo de oxidação

Amostra de Biodiesel	Processo de oxidação e valores de ΔmV	
	Antes do processo	Depois do processo
353,39 mM	11	3
1060,17 mM	14	3
1766,96 mM	16	4

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4.16 foi possível observar que, nas amostras de biodiesel não oxidadas os ésteres presentes inicialmente foram convertidos em ácidos graxos pela ação da enzima lipase e estes foram detectados, sendo a resposta em diferença de potencial (ΔmV) registrada. Nas amostras de biodiesel oxidadas, quando expostas ao ar, a variação de ΔmV foi mínima para as amostras testadas, fato que pode ser explicado devido a falta de triglicerídeos nas amostras oxidadas podendo as pequenas variações obtidas ser atribuídas a ruídos dos sinais de resposta do eletrodo.

Com base nos resultadas apresentados foi possível verificar que o Biossensor Enzimático Potenciométrico desenvolvido apresentou eficiência e aplicabilidade para ser utilizado como instrumento para controle de qualidade de amostras de biodiesel obtidos a partir de óleo soja nas condições estabelecidas, 1g de enzima imobilizada, 10mL de amostra a 37ºC por 15 minutos de reação.

CAPÍTULO 5 PRODUÇÃO DE LIPASE

Para o desenvolvimento de um biossensor um dos pontos cruciais é a escolha do componente biológico para que ele responda de forma adequada às necessidades para a sua aplicação e o menor custo deste. O menor custo do biocomponente tornaria menos onerosa a construção do biossensor fazendo com que este possa ser competitivo em relação aos métodos de medida tradicionais. Assim o Capitulo 5 apresenta os resultados obtidos na produção de lipase aplicando duas cepas de leveduras, *Candia rugosa* e *Yarrowia lipolítica*.

5.1 - Produção de Lipase de *Candida rugosa*

Paras os testes iniciais para produção de lipase por fermentação submersa foi realizado um planejamento experimental visando determinar as melhores concentrações dos componentes selecionados, extrato de levedura (X_1), extrato de malte (X_2), peptona (X_3), ácido oléico (X_4) e tween 80 (X_5). Neste planejamento foi feito um delineamento fracionário 2^{5-1} com 3 pontos centrais. O ponto central foi realizado em triplicata a fim de estimar o erro experimental. Os resultados foram analisados pelo software Statistica (versão 6.0). Os níveis das variáveis independentes encontram-se na Tabela 5.1.

As variáveis independentes (componentes do meio) estudadas, extrato de levedura, extrato de malte, peptona, ácido oléico e tween 80, variaram de acordo com a Tabela 5.1, segundo o planejamento delineamento fracionário a ser analisado (Tabela 5.2). Todos os experimentos foram executados de forma randômica. As condições utilizadas foram 150 rpm de agitação, 27ºC por 72 horas.

Tabela 5. 1 – Níveis das variáveis independentes estudadas no delineamento fatorial 2^{5-1}.

Variáveis	Símbolo	Níveis		
		-1	0	+1
Extrato de Levedura (% p/v)	X_1	0,5	1,0	1,5
Extrato de Malte (%p/v)	X_2	0,1	0,5	0,9
Peptona (% p/v)	X_3	0,5	1,0	1,5
Ácido Oléico (% p/v)	X_4	0,5	1,0	1,5
Tween 80 (% p/v)	X_5	1,0	1,5	2,0

Tabela 5. 2 – Matriz do planejamento com os valores codificados e com os resultados experimentais.

Ensaios	Extrato de levedura	Extrato de malte	Peptona	Ácido oléico	Tween 80	Atividade (U/mL)	Cresc. cel (mg p.s/ml)
1	-1	-1	-1	-1	+1	2,20	15,76
2	+1	-1	-1	-1	-1	1,87	24,00
3	-1	+1	-1	-1	-1	1,47	20,99
4	+1	+1	-1	-1	+1	2,36	23,89
5	-1	-1	+1	-1	-1	1,38	20,84
6	+1	-1	+1	-1	+1	1,95	24,82
7	-1	+1	+1	-1	+1	0,98	23,08
8	+1	+1	+1	-1	-1	1,38	26,68
9	-1	-1	-1	+1	-1	1,22	31,02
10	+1	-1	-1	+1	+1	0,16	43,48
11	-1	+1	-1	+1	+1	3,42	26,96
12	+1	+1	-1	+1	-1	1,30	38,51
13	-1	-1	+1	+1	+1	4,40	39,72
14	+1	-1	+1	+1	-1	2,12	34,94
15	-1	+1	+1	+1	-1	9,20	40,82
16	+1	+1	+1	+1	+1	3,01	46,03
17	0	0	0	0	0	1,71	41,71
18	0	0	0	0	0	1,79	41,95
19	0	0	0	0	0	1,79	41,90

A Tabela 5.2 mostra os resultados do delineamento fracionário 2^{5-1} do estudo de produção de lipase por fermentação submersa á 150rpm a 27ºC por 72 horas. As variáveis respostas variaram de 15,76 a 46,03 mg p.s cél./mL para crescimento celular e de 0,16 a 9,20 U/mL para atividade enzimática, nas

condições estudadas, para os 19 experimentos. Ressalta-se ainda que a diferença entre estes pontos de máximo e mínimo é bem maior do que a variação dos valores de atividade enzimática e de crescimento celular para as condições do ponto central onde se estuda a reprodutibilidade (erro experimental) do experimento (Δ = 0,08 para atividade enzimática e Δ = 0,24 para crescimento celular), indicando que as variações observadas para os diferentes ensaios do delineamento fatorial são decorrentes das diferentes condições de formulação do meio.

Analisando os valores de atividade enzimática obtidos no delineamento fatorial podemos observar que no ensaio 10 (experimento realizados com extrato de malte e peptona no nível mais baixo e extrato de levedura e tween 80 nos níveis mais altos) foi onde ocorreu a menor produção de lípase. Por outro lado, no ensaio 15 que foi realizado utilizando extrato de malte e peptona nos níveis mais altos e extrato de levedura e tween 80 nos níveis mais baixos, foi obtida a maior atividade enzimática. Observou-se também que os maiores valores de atividade foram encontrados nas condições onde as variáveis peptona e ácido oleico estavam na concentração mais alta (1,5%$_{p/v}$).

Utilizando o programa Statistica versão 6.0, empregou-se a técnica da Analise de Variância (ANOVA) na analise dos resultados a fim de se determinar a influencia de cada variável independente frente à variável resposta. A Tabela 5.3 mostra os efeitos das variáveis estudadas.

Tabela 5. 3 - Efeitos estimados, desvio padrão e teste-t, calculados para o delineamento fatorial 2^{5-1} tento como resposta a atividade hidrolítica do p-nitrofenil laurato.

Fatores	Efeitos	Desvio padrão	t(13)	p-valor
Média	2,301	0,0107	213,382	0,000022
Extrato de Levedura (X_1)	-1,262	0,0235	-53,69	0,00034
Extrato de malte (X_2)	0,977	0,0235	41,57	0,00057
Peptona (X_3)	1,302	0,0235	55,42	0,00032
Ácido oleico (X_4)	1,404	0,0235	59,75	0,00028
Tween 80 (X_5)	-0,183	0,0235	-7,8	0,01606

Analisando os efeitos (Tabela 5.3) para atividade hidrolítica dos extratos enzimáticos observou-se que a variável X_4 foi a que apresentou um maior efeito significativo (α = 90%), sobre a variável resposta, de forma que um aumento na concentração desse substrato resulta um efeito positivo estatisticamente significativo. Por outro lado um aumento nas concentrações de X_1 e X_5 apresentou um efeito negativo estatisticamente significativo sobre a atividade hidrolítica do extrato enzimático.

Trabalhos da literatura (Pernas, *et al* 2000; Ferra *et al* 2001, Gordillo *et al* 1998) relatam o efeito positivo do ácido oléico como agente indutor na produção de lipase por leveduras, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho. Gombert *et al*. (1999) e Maia *et al* (1999) também observaram um efeito positivo da peptona como fonte de nitrogênio na produção de lipase por leveduras.

Nesta etapa do trabalho foi selecionado p-valor igual a $p<0,1$, por se tratar de uma etapa de seleção de variáveis.

Com base nos resultados obtidos até o presente momento podem ser definidas as variáveis: extrato de malte, peptona e ácido oléico como importantes na produção de lipase, e que as variáveis extrato de levedura e tween 80, podem ser utilizadas nas quantidades do nível -1, visando minimizar os custos de produção, já que seus efeitos não foram estatisticamente significativos.

Porém devido a problemas de contaminação com a cepa de *Candida rugosa* INCQS 40285 (ATCC 10571) nas próximas etapas do trabalho foi utilizada uma outra cepa de levedura, *Yarrowia lipolítica* INCQS 40149 (ATCC 18942) também indicada para produção de lipase.

5.2 – Produção de Lipase de *Yarrowia lipolítica*

5.2.1 – Seleção do meio de cultivo

Com base na literatura sobre lipases produzidas a partir de *Yarrowia lipolítica* foram selecionados duas composições de meios com a finalidade de definir a melhor composição do meio de cultura na qual a atividade lipásica alcançada fosse a maior. Para essa etapa foi utilizado um pré-inóculo incubado em meio YPD por aproximadamente 18h e as condições de cultivo utilizadas foram 27ºC e 150rpm de agitação, nos seguintes meios:

- Meio 1 – glicose 1,5% (p/v), peptona 3% (p/v), extrato de lêvedo 3% (p/v), azeite 0,5%(p/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0,8% (p/v), pH 6,5.
- Meio 2 – NH_4Cl 0,53% (p/v), extrato de lêvedo 1% (p/v), peptona 1% (p/v), ácido oléico 1% (p/v), pH 7,0.

A atividade catalítica, bem como a estabilidade e a especificidade da enzima, dependem da sua estrutura tridimensional. Condições ambientais, tais como pH, podem afetar a estrutura da enzima e em decorrência a sua propriedade. Assim na Tabela 5.4, pode-se observar os valores de atividades obtidas com os dois meios selecionados e em diferentes valores de pH

Tabela 5. 4 - Atividade lipásica (U/mL) nos meios de composição 1 e 2 em diferentes valores de pH

Valores de pH	Meio 1	Meio 2
pH 5,5	-	-
pH 6,0	1,86	3,83
pH 7,0	0,16	7,79
pH 8,0	0,93	11,13

O extrato enzimático obtido a partir do meio 2 foi o que apresentou maior atividade (7,79 U/mL para pH 7,0) quando comparado com o valor obtido com o meio 1 (0,16 U/mL para pH 7,0). Com relação a variação de pH os valores de atividade dos extratos do meio 2 aumentaram com o aumento dos valores de pH, aparentando ter uma caráter mais alcalino.

Extrato enzimático obtido a partir de *Yarrowia lipolítica* CBS 6303 (Destain *et al* 1997) apresentou valores de atividade enzimática aproximadamente constante formando um *platô* de atividade máxima entre os valores de pH 5 e 7. Em valores de pH maiores que 7 a atividade diminui. Mingrui *et al* (2007) determinou que a atividade máxima para extrato enzimático de *Yarrowia lipolítica* foi em pH 8,0, porém em pH 9,0 ocorre uma redução drástica, remanescendo cerca de 20% da atividade.

A partir dos resultados apresentados, o meio 2 foi escolhido para a produção da lipase, assim como a solução tampão (pH) a ser utilizada para as análises de determinação de atividade (solução tampão de fosfato de potássio 50mM pH 7,0).

5.2.2 – Avaliação da influência dos componentes do meio de cultivo

Nesta etapa foi realizado um delineamento fracionado 2^{4-1}. Para esse planejamento as variáveis independentes estudadas foram: concentração de extrato de levedura, cloreto de amônio peptona, e ácido oléico como indutor. A resposta avaliada foi atividade lipolítica de lipase e crescimento celular. As condições de utilizadas foram 27º C e 150 rpm, 72hs.

Os valores reais (não codificados) das variáveis independentes utilizados nos ensaios deste planejamento estão apresentados na Tabela 5.5 com seus respectivos níveis codificados. A matriz do planejamento experimental com os resultados estão apresentado na Tabela 5.6.

Tabela 5. 5 - Níveis das variáveis independentes estudadas no delineamento fatorial 2^{4-1}.

Variáveis	Símbolo	Níveis		
		-1	0	+1
Extrato de Levedura (% p/v)	X_1	1,0	1,5	2,0
NH_4Cl (%p/v)	X_2	0,5	1,0	1,5
Peptona (% p/v)	X_3	1,0	1,5	2,0
Ácido Oléico (% p/v)	X_4	1,0	1,5	2,0

Tabela 5. 6 - Matriz do planejamento com os valores codificados e com os resultados experimentais.

Ensaios	Extrato de levedura	NH_4Cl	Peptona	Ácido oléico	Atividade (U/mL)	Cresc. cel (mg p.s/ml)
1	-1	-1	-1	-1	0,41	43,21
2	+1	-1	-1	+1	1,66	122,44
3	-1	+1	-1	+1	0,05	73,15
4	+1	+1	-1	-1	1,99	65,94
5	-1	-1	+1	+1	6,16	88,00
6	+1	-1	+1	-1	16,92	60,09
7	-1	+1	+1	-1	2,34	67,29
8	+1	+1	+1	+1	19,08	115,46
9	0	0	0	0	2,03	96,10
10	0	0	0	0	2,92	99,70
11	0	0	0	0	3,90	83,72

Com base nos resultados apresentados na Tabela 5.9 a maior atividade obtida foi 19,08 U/mL onde os valores de ácido oléico, peptona e extrato de levedura foram de 2%$_{(p/v)}$ cada e 1,5%$_{(p/v)}$ de NH_4Cl. O valor de pH final em todos os ensaios ficou em torno de 8,5.

Fickers *et al* (2006) em seus estudos atingiram um maior valor de atividade (1118 U/mL) utilizando 3% de extrato de levedura e 3% de soro de leite, 1,5% de glicose e 0,5% de azeite de oliva em biorreator de 2000L com controle da taxa de oxigênio dissolvido.

Observando os resultados obtidos nos pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11) (Tabela 5.7) é possível verificar que a variação que ocorreu entre os

valores foi pequena com desvio padrão de 0,94 indicando assim, uma reprodutibilidade dos dados obtidos nesta etapa.

Tabela 5. 7 – Cálculo dos desvios dos pontos centrais

Tempo de fermentação (horas)	Ensaios			Média	Desvio Padrão	Desvio Percentual
	9	10	11			
Atividade (U/mL)	2,03	2,92	3,9	2,95	0,94	31,71
Crescimento celular (mg p.s/ml)	96,1	99,7	83,72	93,17	8,38	9,00

Porém em ensaios posteriores não foi possível obter os mesmos resultados encontrados nos pontos centrais e no ensaio 6 (ensaio onde foi obtido o maior valor de atividade). Portanto, após a análise dos resultados desta etapa foi necessário realizar um estudo para padronização de inóculo, com objetivo de minimizar o erro experimental e aumentar a reprodutibilidade dos resultados, promovendo um incremento na produção de lipase, para realização das próximas etapas.

5.2.3 – Padronização do inóculo

No estudo do procedimento de padronização do inóculo foi verificado a cinética de crescimento da levedura *Yarrowia lipolítica*. O meio usado para essa avaliação foi o meio YPD e os resultados estão apresentados na Figura 5.1

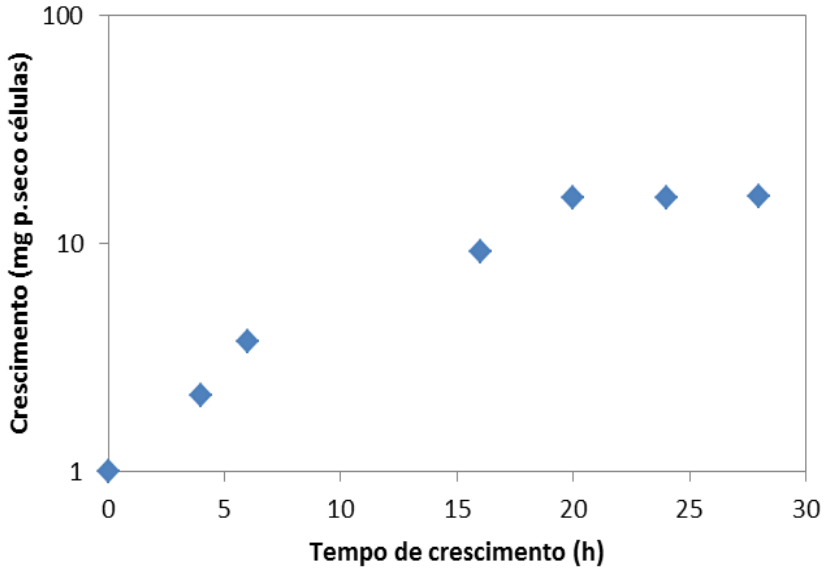


Figura 5. 2 - Curva de crescimento de *Yarrowia lipolítica.*

Analisando o gráfico de crescimento celular de *Yarrowia lipolítica* (Figura 5.1) a fase de crescimento exponencial ocorreu de 5h a 19 h e dentro desse intervalo foi escolhido o tempo de 16h como o padrão para obtenção do inóculo, tempo também utilizado por Destain *et al.,* (1997).

5.2.4 – Cinética da produção de lipase

A cinética de produção de lipase foi avaliada para se conhecer o perfil da produção de lipase ao longo do tempo de fermentação. Para tal finalidade foram avaliados neste teste os tempos de amostragem de 2,5 a 72 horas para verificar se eram adequados para realização das análises de atividades lipolíticas, bem como a reprodutibilidade dos resultados.

Tabela 5. 8 - Resultados do teste de cinética de produção de lipase – Atividade lipolítica (U/mL)

Tempo de fermentação (horas)	Atividade			Média	Desvio Padrão	Desvio Percentual
	1	2	3			
2:30	0,313	3,864	0,209	1,46	2,08	142,32
5	0,522	3,029	0,418	1,32	1,48	111,74
16	1,149	3,656	0,00	2,40	1,77	73,79
24	4,073	1,776	0,836	2,23	1,67	74,74
28	1,253	4,387	0,00	2,82	2,22	78,57
40	0,0	0,313	0,209	0,26	0,16	61,10
48	1,358	2,820	0,00	2,09	1,03	49,50
72	1,149	0,731	0,00	0,94	0,3	31,43

Condições de processo: 27ºC, 200rpm de agitação e composição do meio: Ácido oléico 1% (v/v); NH_4Cl 0,5% (p/v); Peptona 1% (p/v); Extrato de lêvedo 1% (p/v)

O intervalo entre 24 e 72 horas de processo foi o que obteve os maiores valores atividades enzimáticas, atingindo o seu valor máximo dentro deste intervalo. O que se pode notar é que neste intervalo de tempo o desvio padrão em relação a média foi diminuindo.

Os maiores valores de atividade lipolítica foram de 4,073 U/mL com 24hs e 4,39 U/mL com 48hs de fermentação. A partir dos resultados apresentados na Tabela 5.8 pode-se observar que os valores de atividades obtidos no presente teste foram baixos e os desvios percentuais foram bem elevados.

No entanto, a medida que o processo de fermentação evoluiu os valores da atividade enzimática (lipolítica) apresentaram uma redução nos valores de desvio, atingindo 31,43% de desvio percentual com 72 horas de processos. Infelizmente, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura não apresenta uma discussão sobre a falta de reprodutibilidade nos resultados de

fermentação com leveduras (e fungos filamentosos) e a necessidade de sistematizar os procedimentos que minimizem estas variações.

Um fator que pode contribuir para as variabilidades do processo é o erro associado à análise da atividade lipolítica. A determinação é feita utilizando uma emulsão de azeite de oliva, esta emulsão pode sofrer variações devido à velocidade de agitação, homogeneização da agente emulsificante, dentre outros erros indeterminados que podem acompanhar o procedimento de análise. Porém é relevante citar que todo o cuidado para minimizar estes erros experimentais foram tomados.

Em paralelo foram realizados ensaios diminuindo as concentrações dos componentes, extrato de lêvedo, cloreto de amônio e peptona. Os resultados apresentados na Tabela 5.9 mostram que os valores de atividades obtidos foram menores que os apresentados anteriormente diminuindo de 1,03 para 0,56 U/mL no tempo de 48 horas de fermentação.

Tabela 5. 9 - Atividade lipolítica (U/mL) com meio modificado

Tempo de fermentação (horas)	Atividade			Média	Desvio Padrão	Desvio Percentual
	1	2	3			
24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
48	1,15	0,10	0,94	0,73	0,56	76,11
72	1,25	1,25	0,21	0,90	0,60	66,47

Composição do meio Ácido oléico 1% (v/v); NH_4Cl 0,5% (p/v); Peptona 0,5% (p/v); Extrato de lêvedo 0,5% (p/v), 27ºC, 200rpm de agitação

Os resultados obtidos para produção de lipase com a levedura *Yarrowia lipolítica* apresentaram um melhor desempenho com tempo de fermentação de 24 e 28 horas, porém com as réplicas o desvio padrão obtido foi alto sendo assim necessários mais estudos para tentar avaliar e estudar os problemas reprodutibilidade apresentados.

CAPÍTULO 6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 – Conclusões

Ensaios realizados com os extratos enzimáticos de *Aspergillus niger* e *Yarrowia lipolytica* apresentaram atividade hidrolítica em amostras de óleos de soja, sendo que entre as concentrações de 350 e 1750 mM de ácido graxos o valor de atividade aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração da amostra. Quando os extratos foram testados usando o eletrodo de pH só foi possível obter uma resposta satisfatória entre as concentrações de 10 a 30% v/v de biodiesel.

A utilização da lipase comercial de *Candida rugosa* para desenvolvimento do sistema Biossensor Enzimático Potenciométrico para triglicerídeos, permitiu avaliar a qualidade das amostras de biodiesel pela hidrólise dos ésteres presentes nessas amostras pela ação da enzima lipase, imobilizada em sílica por meio de ligação covalente, através da diferença de potencial medida pelo sistema transdutor aplicado. O sistema apresentou boa reprodutibilidade apresentando uma erro de em torno de 1,73 em valores reais e uma sensibilidade aceitável podendo ser observado uma variação de potencial de 15mV entre as amostras de menor e maior concentração (253,4 a 1766,9 mM). Quando aplicado a amostras de biodiesel submetidas ao processo de oxidação, pela aplicação de ar, o sistema também demonstrou aplicabilidade.

O processo utilizado para produção de lipase utilizando as cepas de leveduras *Candida rugosa* e *Yarrowia lipolítica* demonstrou resultados satisfatórios, no entanto não foi possível obter um reprodutibilidades dos resultados

6.2 – Sugestões para trabalhos futuros

Como sugestões para dá continuidade ao trabalho desenvolvido:

- Desenvolvimento de um *Kit* enzimático de analise que possibilite o controle de qualidade das amostras de biodiesel de forma pratica e rápida quando comparados aos métodos convencionais aplicados,
- Estudos para miniaturização do sistema ou mesmo sua adaptação de forma a torna o sistema portátil visando sua aplicação *in situ.*.
- Aplicação do sistema Biossensor Enzimático Potenciométrico em amostras de biodiesel de diferentes fontes, como também em amostras de óleos vegetais.

Referências Bibliográficas

ALFAYA, A.A.S; KUBOTA, L.T.A. Utilização de materiais pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Quimica Nova**, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2008.

ALHADEFF, E.M.; SALGADO, A.M.; PEREIRA, JR.N.; VALDMAN, B. Development and Application of an Integrated System for Monitoring Ethanol Content of Fuels, 113-116, n. 12, 2004. 125-136.

ALHADEFF, E.M.; SALGADO, A.M.; PEREIRA, JR.N.; VALDMAN, B.; CÓS, O.; VALERO, F. Microreactor for the determination of ethanol by an automatic sequential injection analysis system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, p. 17-26, 2007.

ALHADEFF, E.M.; SALGADO, A.M; PEREIRA, JR.N.; VALDMAN, B. Integrated Biosensor systems for ethanol analysis. **In Press: Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2008.

ALHADEFF, E.M.; SALGADO, A.M; PEREIRA, JR.N.; VALDMAN, B.A. Sequential Enzymatic Microreactor System For Ethanol Detection Of Gasohol Mixtures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 361-372, 2005.

AMARAL, P.F.F.; ROCHA-LEÃO, M.H.M; MARRUCHO, I.M.; COUTINHO, J.A.P.; COELHO, M.A.Z. Improving lipase production using a perfluorocarbon as oxygen carrier. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 81, p. 1368-1374, 2006.

ARYA, S.K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B.D. Resent a advanves in chelesterol biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 1083-1100, 2008.

BASRI, M; AMPON, K; YUNUS, W.M.Z; RAZAK, C.N.A.; SALLEH, A.B. Enzymatic synthesis of fatty esters by hydrophobic lipase derivatives immobilized on organic polymer beads. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 72, p. 405-411, 1995.

BASU, I; SUBRAMANIAN, R.V; MATHEW, A.; MATHEW, A.; KAYASTHA, A; CHADHA, A; BHATTACHARYA, E. Solid state potentiometric sensor for the estimation of tributyrin and urea. **Sensors and Actuators B**, v. 107, p. 418-423, 2005.

BAYRAMOGLU, G.; KAÇAR, Y.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix. **Journal of food engineering**, 52, 2002. 367-374.

BUCHHOLZ, K; KASCHE, V; BORNSCHEUER, U. **Biocatalysts and Enzyme Technology**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

CABRAL, , JOAQUIM M.S; AIRES-BARROS, MARIA RAQUEL; GAMA, MIGUEL. **Engenahria Enzimática**. [S.l.]: [s.n.], 2003.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. Engenharia Enzimatica. [S.l.]: Lidel, 2003.

CAMMAROTA, M.C.; TEIXEIRA G.A.; FREIRE, D.M.G. Enzymatic préhydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents.. **Biotechnology Letters** , 23, 2001. 1591-1595.

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, 2004.

CDYA SAGAR, L.; NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification--a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248-268, 2006.

C-H KUOA, Y-C LIUB, CHIEH-MING J. CHANGB, JIANN-HWA C, CHANGA, C-J SHIEH. Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe3O4 nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, 87, 2012. 2538– 2545.

ERICSSON, D.J; KASRAYAN, A; JOHANSSON, P. X-ray structure of Candida Antarctica lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, p. 109-119, 2008.

FERNANDEZ, R.E; HAREESH, V.; BHATTACHARYA, E.; CHADHA, A. Comparison of a potentiometric and a micromechanical triglyceride biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 1276-1280, 2009.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; CABRERA, Z.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 565-569, 2007.

FREIRE, D.M.G; CASTILHO, L.R. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. **Rev. Bras. Farm**, v. 81, p. 48-56, 2000.

GORDILHO, M.A; MONTESINOS, J.L; CASAS, C; VALERO, F. Improving lipase prodution from Candida rugosa by a biochemical engineering approach. **Chemistry and Physics Lipids**, v. 93, p. 131-142, 1998.

GORIUSHKINA, T.B.; SHKOTOVA, L.V.; GAYDA, G.Z.; KLEPACH, H.M.; GONCHAR, M.V.; SOLDATKIN, A.P.; DZYADEVYCH, S.V. Amperometric biosensor based on glycerol oxidase for glycerol determination. **Sensor and Actuators B: Chemical**, 2009.

HA, S.H; LAN, M.N.; LEE, S.H; HWANG, S.M; KOO, Y.M. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 480-483, 2007.

HAJAR, M.; SHOKROLLAHZADEH, S; VAHABZADEH, F.; MONAZZAMI, A. Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 3, p. 188-194, 2009.

HAMA, S; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T; NUMATA, T; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing Rhizopus oryzae cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 3, p. 273-278, 2007.

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

HERNANDEZ-MATRIN, E.; OTERO, C.. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym (R) 435 and Lipozyme (R) TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 277-286, 2008.

HOFLAND, G. W., DE RIJKE, R., THIERING, R., VAN DER WIELEN, L. A. M., WITKAMP, G. J. Isoeletric precipitation of soybean protein using carbon dioxide as a volatile acid. **Journal of Chromatography B**, 743, 2000. 357-368.

HOSSAIN, M.Z; SHRESTHA, D.S; KLEVE, M.G. Biosesnsor for Biodiesel Quality Sensing. **Journal of Arkansas Academy of Science**, v. 64, p. 82-85, 2010.

HSU, A.F.; JONES, K.C.; FOGLIA, T.A.; MARMER, W.N. Transesterification activity of lipases immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 11, p. 917-921, 2004.

ISO, M.; CHEN, B.X.; EGUCHI, M; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001.

IUPAC. Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes. Pure and Applied Chemistry, v. 67, p. 597-600, 1995.

LI, L.L; DU, W; LIU, D.H.; WANG, L.; LI, Z.B. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, p. 58-62, 2006.

LÔBO, I.P.; FERREIRA, S.L.C; CRUZ, R.S. Biodiesel: Parâmetros de Qualidade e Métodos Analíticos. **Quimíca Nova**, v. 32, n. 6, p. 15961608, 2009.

MACEIRAS, R.; VEGA, M.; COSTA, C.; RAMOS, P.; MARQUES, M.C. Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel from waste frying oil. **Fuel**, v. 88, n. 11, p. 2130-2134, 2009.

MAHADIK, ND; PUNTAMBEKAR, US; BASTAWDE, KB; KHIRE, JM; GOKKHALE, DV. Production of acidic lipase by Aspergillus niger in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, 33, 2002. 715-721.

MARÍA, P.D.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; ALCÁNTARA, A.R. Understanding Candida rugosa lipases: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 180-196, 2006.

MENDES, A.A; CASTRO, H.F; PEREIRA, E.B; JÚNIOR, A.F. Aplicação de lipase no tratamento de água residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

MIRÓN, J.; GONZÁLEZ, M. P.; PASTRANA, L.; MURADO, M. A. Diauxic production of glucose oxidase by Aspergillus niger in submerged culture a dynamic model.. **Enzyme and Microbial Technology**, 31, 2002. 615–620.

NIE, K.L.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T.W. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, p. 142-147, 2006.

PAULA, A.V.; MOREIRA, A. B. R; BRAGA, L.P.; E CASTRO, H. Z; BRUNO, L.M.. Comparação do desempenho da lipase de candida rugosa imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias.. **Quimica Nova**, 2008.

RANGANATHAN, S.V; NARASIMHAN, S.L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3975-3981, 2008.

REDDY, R.R.K.; BASU, I.; BHATTACHARYA, E.; CHADHA, A. Estimation of triglycerides by a porous silicon based potentiometric biosensor. **Current Applied Physics**, v. 3, p. 155-161, 2003.

REDDY, R.R.K.; CHADHA, A.; BHATTACHARYA, E. Porus silion based potentiometric triglyceride biosensor. **Biosensor e Bioelectronics**, v. 16, p. 313-315, 2001.

REDDY, R.R.K; BASU, I; BHATTACHARYA, E; CHAGHA, A. Estimation of triglycerides by a porous silicon based potentiometric biosensor. **Current Applied Physics**, v. 3, p. 155-161, 2003.

RICCARDI, C.S; COSTA, P.I.; YAMANAKA, H. The visa grant number is: 0720110271817K. This is the unique number assigned to the visa. Visa holders should keep this visa grant number with them, as they may have to provide it to the Department of Immigration and Citizenship (the Department) during th. **Quimíca Nova**, v. 25 (2), p. 316-320, 2002.

ROBLES-MEDINA, A.; GOZALEZ-MORENO, P.A; ESTEBAN-CERDA, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 398-408, 2009.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 648-653, 2007.

SALAZAR, L.; BERMUDEZ, J.L; RAMÍRES, C.; LAMA, E.F; SINISTRERRA, J.V. Resolution of 3-naphthoxy-1,2-propanediol using Candida Antarctica lipase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 10, p. 3507-3414, 1999.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 3, p. 291-299, 2005.

SALIS, A.; PINNA, M; MONDUZZI, M; SOLINAS, V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 54, n. 1-2, p. 19-26, 2008.

SANDSTROM, A. G.; WIKMARK, Y.; ENGSTROM, K.; NYHLÉN, J; BACKVALL, JAN-E. Combinatorial reshaping of the Candida antarctica lipase A substrate pocket for enantioselectivity using an extremely condensed library. **PNAS - Exploring Copper Compounds**, v. 3, p. 78-83, 2012.

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

SETUZ, S.; SALIS, S.; DEMONTIS, V.; SALIS, A.; MONDUZZI, M.; MULA, G. Porous silicon-based potentiometric biosensor for triglycerides. **Physica Status Solidi (a)**, v. 204, n. 5, p. 1434-1438, 2007.

SHARMA, R; CHISTI, Y; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotecnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHAW, J.F; CHANG, S.W; LIN, S.C; WU, T.T.; JU, H.Y; AKOH, C.C; CHANG, R.H; SHIEH, C.J. Continuous enzymatic synthesis of biodiesel with Novozym 435. **Energy & Fuels**, v. 22, n. 2, p. 840-844, 2008.

SHIEH, C.J.; LIAO, H.F.; LEE, C.C. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 88, n. 2, p. 103-106, 2003.

TOMASULA, P. M., CRAIG JR., J. C., BOSWELL, T. T., COOK, R. D., KURANTZ, M. J., MAXWELL, M. Preparation of casein using carbon dioxide. **Journal of Dairy Science**, 78, 1995. 506-514.

VIJAYALAKSHMI, A.; TARUNASHREE, Y.; BARUWATI, B.; MANORAMA, S.V; NARAYANA, B.L; JOHNSON, R.E.C; RAO, N.M. Enzyme field effect transistor (ENFET) for estimation of triglycerides using magnetic nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 1708-1714, 2008.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journ. Molecular Catalysis: Enzymatic 9**, p. 113-148, 2000.

VYAS, A.P.; VERMA, J.L; SUBRAHMANYAM, N. A review on FAME production processes. **Fuel**, v. 89, n. 1, p. 1-9, 2010.

WANG, Y; WU, H.; ZONG, M.H. Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 7232-7237, 2008.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized Candida antarctica lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 77, n. 4, p. 355-360, 2000.

WATENABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TAMINAGA, Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 78, n. 7, p. 703-707, 2001.

YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A.N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chemical Engineering Journal**, p. 262-267, 2007.

YU, M.; QIN, S.; TAN, T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from Yarrowia lipolytica. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 384-391, 2007.