



Susana Matos da Cruz Imobilização de CAL B em microrreatores
Silva



Susana Matos da Cruz Imobilização de CAL B em microrreatores
Silva

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Artur Jorge de Faria Ferreira, Professor coordenador da Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Águeda e da Professora Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Leal, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha Mãe que se sacrificou muito para que eu concluísse esta etapa da minha vida.

o júri

Presidente

Prof.^a Dr.^a Maria Inês Purcell de Portugal Branco

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Artur Jorge de Faria Ferreira

Professor coordenador da Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Águeda

Prof.^a Dr.^a Luísa Alexandra Seuanes Serafim Leal

Professora auxiliar convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dr.^a Ana Paula Mora Tavares

Investigadora auxiliar do Departamento de Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Agradecimentos

Agradeço ao Doutor Artur Jorge de Faria Ferreira e à Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Leal pela compreensão, paciência e ajuda durante todo o trabalho.

A todos os colegas de laboratório, Belinda, Nuno, Marina, Andrea, Paula, Liliana, Ana e Matheus não podia deixar um especial agradecimento por todo o apoio e disposição.

À Tânia, o meu braço direito, por todo o apoio nos momentos de maior dificuldade e pela cumplicidade e partilha.

Não me poderia esquecer de todos os meus amigos que me deram força para continuar em especial à Sandra, à Daniela e ao Ricardo.

Às meninas do R2-1A, um enorme agradecimento por todo o apoio e preocupação, e um agradecimento especial à Inês.

Agradeço a toda a minha família, ao meu irmão e à minha mãe que apoiaram mesmo nos momentos mais difíceis.

palavras-chave

Microrreator enzimático, Imobilização de enzima, CAL B, Cinética Enzimática.

Resumo

Esta dissertação teve dois objetivos fundamentais. O primeiro objetivo foi rever a aplicação dos microrreatores na área da biotecnologia. O segundo ponto foi a análise da atividade enzimática da CAL B imobilizada no titanossilicato lamelar AM-1 e em celulose bacteriana, tanto por ligação covalente como por adsorção.

No início do trabalho procedeu-se a uma revisão da literatura sobre microrreatores e a sua aplicação em processos enzimáticos. A partir desta revisão definiu-se a parte experimental a ser desenvolvida na segunda parte do trabalho.

A segunda parte consistiu na imobilização da CAL B em titanossilicato AM-1 e em celulose bacteriana tanto por ligação covalente como por adsorção. Relativamente ao AM-1 e à celulose bacteriana, a imobilização foi realizada com sucesso tanto por adsorção como por ligação covalente. As atividades enzimáticas obtidas mostraram que a celulose bacteriana é um melhor suporte de imobilização que o AM-1 pois a CAL B apresentou melhores valores de atividade específica. Quanto ao tipo de imobilização, a ligação covalente foi a que se obteve com mais sucesso pois a enzima mostrou melhor atividade.

Keywords

Enzymatic Microreactor, Enzyme Immobilization, CAL B, Enzyme Kinetics.

Abstract

This thesis had two fundamental objectives. The first objective was to review the implementation of microreactors in biochemistry. The second point was the analysis of the enzymatic activity of the CAL B immobilized on titanossilicato lamelar AM-1 and on bacterial cellulose, either by covalent binding as by adsorption.

At the beginning of the work was carried a review of the literature on microreactors and its application in enzymatic processes. From this review was defined the experimental part to be developed in the second part of the work.

The second part was to immobilize the CAL B in the titanosilicate AM-1 and in the bacterial cellulose both by covalently bound as by adsorption. For the AM-1 and the bacterial cellulose, the immobilization was successfully performed both by adsorption as by covalent binding. The achieved enzyme activity showed that the bacterial cellulose is a better support of immobilization than AM-1 because CAL B showed best values of specific activity. Regarding the type of immobilization, covalent binding was obtained whit more success because the CAL B showed a higher specific activity.

Índice

Âmbito do trabalho e objetivos	1
1. Revisão bibliográfica	3
1.1 Princípios básicos dos microrreatores.....	3
1.2. Microbiorreatores	6
1.2.1. Imobilização de enzimas em microrreatores.....	7
1.2.2. Suportes para imobilização	15
1.2.3. Cinética enzimática.....	19
1.3. Lipases	22
1.3.1. Características e aplicações das lipases	22
1.3.2. Aplicações de lípases em microrreatores.....	24
2. Materiais e Métodos.....	27
2.1. Reagentes, matérias-primas e aparelhos utilizados	27
2.1.1. Enzima	27
2.1.2. Suportes de imobilização	27
2.1.3. Reagentes	28
2.1.4. Equipamento	28
2.2. Métodos de imobilização	28
2.2.1. Imobilização por adsorção	28
2.2.2. Imobilização por ligação covalente	29
2.3. Determinação da quantidade de enzima imobilizada	31
2.4. Determinação da atividade de CAL B	31
2.5. Determinação da atividade das partículas de titanossilicato AM-1.....	33
2.6. Microscopia eletrónica de varrimento	33
3. Análise e discussão de resultados	35

3.1.	Determinação da atividade da CAL B Livre	35
3.2.	Ensaio com CAL B imobilizada	36
3.2.1.	Titanossilicato AM-1 como suporte de imobilização.....	37
3.2.2.	Celulose bacteriana como suporte de imobilização.....	43
3.2.3.	Comparação dos resultados obtidos para os diferentes suportes.....	48
4.	Conclusões e Trabalho Futuro	51
5.	Bibliografia.....	53
Anexo.....		59
Anexo A -	Calibração do método de Lowry modificado por Onishi e Barr	59
Anexo B -	Curva de calibração do p-NP	61
Anexo C -	Cálculo do erro associado à atividade e à atividade específica da CAL B	64
Anexo D -	Utilização de fibra ótica como suporte de imobilização	66

Índice de Figuras

Figura 1 – (A) Microrreator capilar, (B) Microrreator microestruturado produzido por micromaquinaria de alta precisão.....	3
Figura 2 – Principais técnicas de imobilização de enzimas: (a) – Ligação covalente, (b) – Adsorção a um suporte sólido, (c) – Aprisionamento/encapsulamento, (d) – Reticulação intermolecular.	8
Figura 3 – Esquema da síntese de SENS.....	13
Figura 4 – Representação esquemática da imobilização da <i>Transglutaminase</i> a um suporte revestido por caseína	14
Figura 5 – Imobilização da enzima ao líquido iónico (LI) e catálise num sistema bifásico (adaptado [49]).	18
Figura 6 – Representação gráfica da variação da energia livre de Gibbs (G) de uma reação não catalisada (—) para uma reação catalisada (- - -)	19
Figura 7 – Relação da velocidade de reação com a concentração do substrato de um reação enzimática.	21
Figura 8 – A: Micropartículas de titanossilicato AM-1; B: Membrana de celulose bacteriana	27
Figura 9 – Representação esquemática do processo de imobilização.	29
Figura 10 – Celulose bacteriana preparada para a imobilização.....	30
Figura 11 - Variação temporal da absorvência de p-NP durante reação de hidrólise para o estudo da atividade da enzima livre.	35
Figura 12 – Variação da concentração do p-NP ao longo da reação de hidrólise para o estudo da atividade de CAL B livre.	36
Figura 13 - Variação da concentração de p-NP durante a reação catalisada pela CAL B imobilizada por adsorção em titanossilicato AM-1.	38
Figura 14 – Variação da concentração de p-NP durante a reação catalisada pela CAL B imobilizada por ligação covalente em titanossilicato AM-1.....	41
Figura 15 – Variação da concentração de p-NP para as diferentes reações em que se utilizou CAL B imobilizada no suporte AM-1.	42
Figura 16 - Análise SEM ao AM-1: (A) Antes da imobilização, (B) Depois da imobilização de CAL B por adsorção e (C) Depois da imobilização de CAL B por ligação covalente.	43
Figura 17 – Variação da concentração de p-NP durante a reação catalisada pela CAL B imobilizada por adsorção em celulose bacteriana.	45

Figura 18 - Variação da concentração do p-NP durante da reação catalisada pela CAL B imobilizada por ligação covalente em celulose bacteriana.	47
Figura 19 - Análise SEM à celulose bacteriana: (A) antes da imobilização, (B) depois da imobilização de CAL B por adsorção e (C) depois da imobilização de CAL B por ligação covalente.	48
Figura A.1 - Reta padrão para a determinação da quantidade de proteína em solução.	59
Figura B.1 - Relação entre a absorvência e a concentração de p-nitrofenol.	62
Figura D.1 - Curva da análise termogravimétrica à fibra ótica numa atmosfera de azoto e uma velocidade de aquecimento de 5°C/min.	66
Figura D.2 - Curva da análise termogravimétrica à sílica numa atmosfera de árgon e uma velocidade de aquecimento de 5°C/min. ⁴	67
Figura D.3 - Análise química por EDS à fibra ótica.	68
Figura D.4 - Análise SEM à fibra ótica.	68

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Processos de aplicação de lipases em microrreatores.	26
Tabela 2 – Resultados obtidos nos ensaios de imobilização por adsorção em titanossilicato AM-1.	37
Tabela 3 – Resultados da quantidade de CAL B desorvida das partículas de AM-1.	39
Tabela 4 – Resultados da quantidade de enzima imobilizada e eficiência do processo de imobilização por ligação covalente a partículas de AM-1.....	40
Tabela 5 - Quantidade de enzima adsorvida e rendimento de processo de imobilização em celulose bacteriana.	44
Tabela 6 – Resultados da quantidade de CAL B desorvida da celulose bacteriana.	46
Tabela 7 – Resultados da quantidade de enzima imobilizada e rendimento do processo de imobilização por ligação covalente à celulose bacteriana.	46
Tabela 8 – Resultados de atividade e atividade específica da lipase para os diferentes ensaios.	48
Tabela A.1 - Valores de absorvência e de concentração para a curva de calibração.	59
Tabela B.1 - Valores de absorvência para a solução de p-Nitrofenol a diferentes concentrações.....	61
Tabela B.2 - Valores de pH e absorvência para soluções de diferentes concentrações de p-nitrofenol para a determinação da curva de calibração do p-NP.....	62
Tabela D.1 - Quantidade de enzima imobilizada por ligação covalente na fibra ótica.	66

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

Abreviatura/Acrónimo	Designação
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APTES	3-(Aminopropil)trietioxisilano
BioMEMS	Sistemas microeletromecânicos biológicos (do inglês <i>Biological Microelectromechanical systems</i>)
CAL B	Candida Antartica Lipase B
CLEAS	Agregados de enzima reticulados (do inglês <i>Cross-linked enzyme aggregates</i>)
CLECS	Cristais de enzima reticulados (do inglês <i>Cross-linked enzyme crystals</i>)
CSTR	Reator contínuo perfeitamente agitado (do inglês <i>Continuous stirred-tank reactor</i>)
DSC	Varredura diferencial de calorimetria (do inglês <i>differential scanning calorimeter</i>)
E	Enzima
EDS	Espectroscopia de dispersão de energia (do inglês <i>Energy-dispersive spectroscopy</i>)
ES	Complexo enzima-substrato
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High-performance liquid chromatography</i>)
IMER	Reatores de microfluidos enzimáticos imobilizados (do inglês <i>Immobilized Microfluidic Enzymatic Reactors</i>)
LOC	<i>Lab-on-a-chip</i>
MBR	Biorreatores membranares (do inglês <i>Membrane Bioreactors</i>)
MEMS	Sistemas microeletromecânicos (do inglês <i>Microelectromechanical systems</i>)
NMR	Ressonância magnética nuclear (do inglês <i>Nuclear magnetic resonance</i>)
P	Produto de reação
PDMS	Poli(dimetil siloxano)
PFR	Reator tubular contínuo (do inglês <i>Plug flow reactor</i>)
p-NP	p-Nitrofenol

p-NPB	p-Nitrofenil butirato
S	Substrato
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento (do inglês <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SENS	Nanopartículas constituídas por uma única enzima (do inglês <i>Single-enzyme nanoparticles</i>)
TGA	Análise termogravimétrica (do inglês <i>thermogravimetric analysis</i>)
μ-TAS	Sistemas de microanálise total (do inglês <i>micro-total analysis systems</i>)

Lista de Símbolos

Símbolo	Designação	Unidades
C	Concentração	mM
k	Constante cinética de reação	
K _m	Constante de Michaelis-Menten	
m _{CAL B}	Massa de lipase B de <i>Candida antarctica</i>	mg
Re	Número de Reynolds	Adimensional
r _{in}	Velocidade inicial de reação	mM.min ⁻¹
r _{máx}	Velocidade máxima de reação	mM.min ⁻¹
t	Tempo de reação	Min
U	Unidade de enzima – Quantidade de enzima que produz x μmol de p-NP por minuto.	μmol.min ⁻¹
U/g-suporte	Atividade da enzima imobilizada	μmol.min ⁻¹ .g ⁻¹
U/mg-enzima	Atividade específica da enzima	μmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹
V _{p-NP}	Volume de p-NP	mL
V _s	Volume de solvente	mL
V _{solução}	Volume de Solução	mL
[p-NP]	Concentração de p-nitrofenol	μg.mL ⁻¹
[Enzima] ₀	Concentração da enzima na solução inicial	μg.mL ⁻¹
η _I	Rendimento da quantidade de enzima imobilizada	%

Âmbito do trabalho e objetivos

Nos dias de hoje, uma das preocupações fundamentais da indústria química é minimizar o impacto dos processos químicos no meio ambiente. Desta forma, pretende-se diminuir a quantidade de poluentes gerados e reduzir a utilização de recursos naturais finitos como fonte de energia e de matérias-primas.

A miniaturização de reatores químicos aliada à utilização de biocatalisadores nas indústrias farmacêutica e química permitirá reduzir o impacto dos processos e utilizar recursos naturais de origem renovável.

Por esta razão, nos últimos anos, a investigação na área de microrreatores, utilizando de catalisadores “verdes” (do inglês “*green*” *catalysts*) tem vindo a aumentar.

Os catalisadores “verdes” ou biocatalisadores podem ser desde enzimas a micro-organismos e a forma como são aplicados depende do objetivo final de cada processo, como por exemplo, desenvolvimento de biossensores ou síntese de produtos químicos entre outras finalidades.

Neste trabalho estudou-se a atividade da enzima lipase B da levedura *Candida antarctica* (CAL B) imobilizada em suportes adequados a microrreatores. Estes suportes foram micropartículas de titanossilicato lamelar AM-1 e celulose bacteriana. Foram efetuados estudos de imobilização tanto por adsorção como por ligação covalente.

A CAL B tem, atualmente, aplicações industriais nas mais diversas áreas, como a indústria alimentar, dos detergentes, na produção de papel, na produção de químicos entre outras.

Os objetivos deste trabalho foram rever o conceito de microrreator e a sua aplicação com biocatalisadores e testar a atividade da CAL B imobilizada em micropartículas. De forma a cumprir os objetivos propostos, este trabalho inicia-se com a revisão do conceito de microrreator e sua aplicação, dando ênfase aos processos enzimáticos (capítulo 1). No capítulo 2 é descrito o trabalho experimental, detalhando todas as metodologias utilizadas. No capítulo 3 apresentam-se e discutem-se os resultados experimentais obtidos. Por fim, no capítulo 4 apresentam-se as conclusões finais de todo o trabalho e algumas sugestões de trabalho futuro.

1. Revisão bibliográfica

1.1 Princípios básicos dos microrreatores

Um microrreator define-se como um dispositivo miniaturizado, com uma das dimensões inferior a 1 mm, onde ocorrem reações químicas[1-3]. Na maioria dos casos esta dimensão é inferior a 1 mm variando entre dez a cem micrómetros. Este tipo de dispositivos também é denominado por reator microestruturado ou reator de fluxo [4, 5].

Além dos microrreatores, já existem desenvolvimentos para dispositivos na escala nanométrica denominados por nanorreatores [6]. Por exemplo os nanotubos de carbono [7] têm vindo a ser utilizados para aplicações na preparação de elétrodos e biossensores [8]. A diferença principal entre estes dois tipos de dispositivos, além da dimensão, é o movimento e as interações das moléculas no espaço de reação.

Os microrreatores são construídos através da microtecnologia e engenharia de precisão ou por modificação e junção de microcapilares [3]. Na sua maioria, são microcanais esculpidos num suporte que pode ser de diversos materiais como a cerâmica, o vidro, o material polimérico, o aço inoxidável ou o teflon [3, 9]. Podem também ser um conjunto de tubos capilares como mostra a Figura 1. A seleção destes materiais para a construção dos microdispositivos é naturalmente influenciado pelas condições de operação do processo.

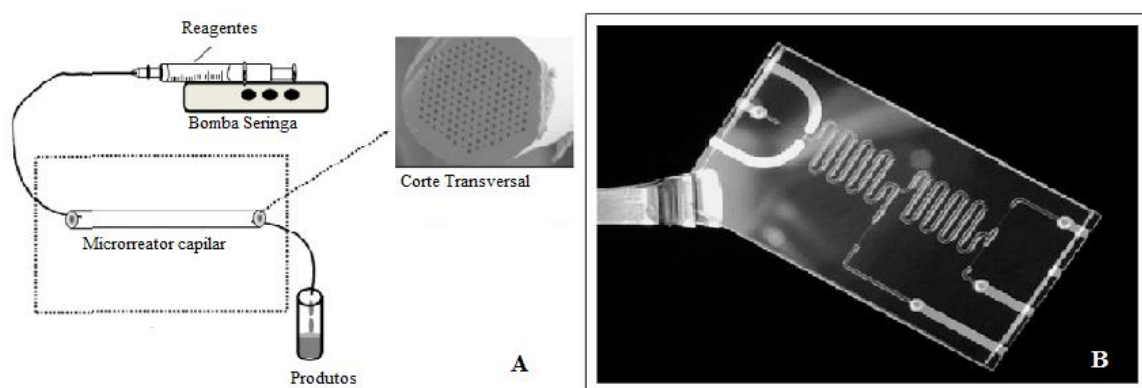


Figura 1 – (A) Microrreator capilar (adaptado [5]), (B) Microrreator microestruturado produzido por micromaquinaria de alta precisão [9].

Os microrreatores permitem que os volumes de reagentes utilizados sejam na ordem dos microlitros. Isto é uma mais-valia pois desta forma conseguem-se diminuir os custos, o

desperdício de reagentes e, conseqüentemente, o impacto ambiental. Também é de referir, que desta forma, o manuseamento de reagentes considerados perigosos torna-se mais seguro [3, 10]. Estes dispositivos permitem um controlo da temperatura e pode-se integrar facilmente um sensor para controlo da reação [11]. O tamanho reduzido destes dispositivos resulta numa razão de área superficial/volume na ordem dos $5.0 \times 10^4 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$, e o pequeno espaço de difusão leva um melhoramento significativo na transferência de massa e de calor [3]. Isto permite que o processo operacional seja mais facilmente controlável, favorecendo o rendimento e a seletividade da reação. Esta é uma vantagem essencial em sistemas enzimáticos, onde os controlos da temperatura e do pH são essenciais [12]. Além da melhoria significativa da transferência de massa e calor nestes dispositivos existem outras propriedades que beneficiam com a diminuição de escala, como as forças gravitacionais e de inércia que tendem a perder relevância passando as forças interfaciais e viscosas a ser dominantes neste ambiente [3].

A nível hidrodinâmico, os microrreatores, devido às suas pequenas dimensões, apresentam normalmente fluxo laminar, com um número de *Reynolds* (Re) inferior a 10 e muitas vezes, inferior a 1, ou seja, funcionam em regime laminar, sem qualquer ocorrência de turbulência [4, 12]. Além disso, a razão entre a área superficial e o volume é elevada, situação em que as interações interfaciais têm um papel muito importante. O fluxo é um aspeto muito importante para a modelação das reações e é determinado pelos balanços de forças inerciais, viscosas e interfaciais. A mistura dos reagentes depende principalmente da difusão molecular, mas este processo de difusão é lento, por isso, têm sido realizados estudos de modo a aumentar a área interfacial superficial e a diminuir o comprimento de difusão [3]. Estes estudos foram realizados em microrreatores denominados por micromisturadores, e que permitem maximizar a homogeneização da mistura reacional de forma rápida e controlável. Classificando-se como ativos ou passivos, os misturadores ativos têm uma energia externa de impulsão, como a energia elétrica, térmica entre outras, os passivos é induzida uma força no fluxo de forma a melhorar a mistura [3].

Nestes sistemas, devido às alterações na escala, a tensão superficial e os efeitos eletrocinéticos tornam-se significativos quando as forças de inércia são desprezáveis [13]. Para controlar uma rede de microcanais são necessários vários elementos, como válvulas, mecanismos e unidades de bombeamento, unidades de injeção, entre outros dependendo do caso em estudo [3]. Alguns mecanismos de bombeamento devem ser desenvolvidos de

modo a obter-se um controlo de fluxo confiável e a evitar problemas de flutuação de fluxos e contrapressão [12]. A rugosidade da superfície, heterogeneidade, potencial de superfície e eletrocinética, são propriedades importantes para o dimensionamento dos sistemas de bombeamento e para o tipo de aplicação do sistema [12]. Os mecanismos de bombeamento podem ser simples, como forças capilares, que são mais facilmente implementadas, mas o controlo das velocidades de fluxo é limitado [12]. Também podem ser implementadas microbombas, que oferecem uma maior flexibilidade, contudo os custos de produção são muito elevados e normalmente só são utilizadas em aplicações médicas [12]. Para colmatar este problema, vários métodos tradicionais têm vindo a ser estudados, mas nenhum com muito sucesso. Um desses métodos refere-se à utilização do fluxo eletro-osmótico (EOF), que evita flutuações da difusão. Por outro lado, a necessidade de aplicação de voltagens elevadas para a miniaturização do fluxo eletro-osmótico sem a utilização de chips de fornecimento de potência é problemática [14]. No caso de um microcanal com enzimas imobilizadas à superfície, estas vão alterar a carga da superfície do canal e conseqüentemente a velocidade do fluido [12].

Os sistemas microelectromecânicos (MEMS) são uma tecnologia que pode ser aplicada para a construção de microrreatores, pois permite a construção de dispositivos com dimensões que podem variar entre os micrómetros e os milímetros [15]. Os dispositivos construídos por esta tecnologia começaram a ser aplicados também na área da biotecnologia, originando os dispositivos BioMEMS. Surgiram também os sistemas de microanálise total (μ -TAS), que têm vindo a crescer de uma forma muito rápida na área de engenharia de microrreatores enzimáticos. Além dos μ -TAS, os sistemas integrados *lab-on-a-chip* (LOC) também têm vindo a ser desenvolvidos em paralelo [12]. *Lab-on-a-chip* são dispositivos que integram uma ou mais funções de um laboratório num chip. A integração de canais de fluxo e câmaras de reação nos sistemas microanalíticos LOC permitiu uma aceleração, automação e miniaturização das tradicionais ferramentas laboratoriais, uma melhoria da performance e uma redução drástica do tamanho das amostras [8]. A junção de processos enzimáticos com os sistemas microanalíticos LOC é a chave para a expansão para outros nichos de mercado, sendo assim as indústrias farmacêutica e química tem vindo a desencadear o interesse em sistemas de alto rendimento para a análise cinética levando à expansão de reatores microfluidicos de enzimas imobilizadas [12].

Os sistemas de detecção são um desafio para os sistemas microfluidos. Um dos sistemas que se tornou muito popular nos laboratórios de microfluidos enzimáticos foi o dispositivo de detecção de fluorescência, por ser fácil de implementar e permitir obter dados cinéticos [12]. Recentemente surgiram sistemas de detecção de absorvência que incorporam fibras óticas em microdispositivos para aplicações analíticas e médicas, embora ainda não estejam muito desenvolvidos no mercado [12]. Dos sistemas de detecção desenvolvidos e a ser comercializados são os sistemas de microfluidos integrados com interfaces comuns de separação e ferramentas analíticas, assim como cromatografia líquida de alto desempenho, HPLC [12].

1.2. Microbiorreatores

Os biorreatores são reatores onde decorrem processos bioquímicos que envolvem organismos ou substâncias bioquímicas ativas como por exemplo enzimas, coenzimas, hormonas, anticorpos, entre outros [16].

Os microbiorreatores operam segundo os mesmos princípios que os biorreatores de grande escala, podendo funcionar em descontínuo ou em contínuo. A operação em contínuo é mais vantajosa quando o catalisador é imobilizado. A maioria dos exemplos de microrreatores enzimáticos contém o catalisador imobilizado num suporte sólido e operam em contínuo [12, 17]. Com estes dispositivos podem-se obter conversões superiores às obtidas num reator descontínuo [8].

Como já foi referido anteriormente os materiais utilizados na produção de microrreatores dependem dos custos e do tipo de aplicação, entre outras características. Para os microrreatores enzimáticos, a superfície do suporte de imobilização e o modo de operação do reator precisam de ser desenvolvidos de modo a favorecer a imobilização do catalisador e o comportamento da reação [12].

Os microrreatores de enzimas imobilizadas também se podem denominar por dispositivos IMER, reatores de microfluidos enzimáticos imobilizados [12]. Estes dispositivos são aplicados na produção de biossensores, síntese orgânica, dispositivos médicos para análises clínicas, análises alimentares, entre outras. Um exemplo prático, são sistemas de detecção de compostos fluorescentes como proteínas [18, 19]. Na secção 1.3.2 na Tabela 1 encontram-se vários exemplos de aplicações de dispositivos IMER.

1.2.1. Imobilização de enzimas em microrreatores

As enzimas são proteínas cuja função é promover determinadas reações químicas e bioquímicas [20]. Comparativamente aos catalisadores químicos as reações catalisadas por um biocatalizador têm várias ordens de grandeza superiores às reações catalisadas quimicamente; as condições de operação das reações quando se utiliza um biocatalizador são influenciadas pela proteína que é utilizada, pois cada uma tem um pH e temperatura ótimos de operação [21]. Nas reações enzimáticas raramente ocorrem produtos secundários ao contrário das reações químicas. Finalmente as enzimas podem ser consideradas como catalisadores “verdes”, ou seja, não são prejudiciais para o meio ambiente [20, 22].

As enzimas podem estar livres no seio do fluido, ou podem ser imobilizadas. A imobilização de enzimas consiste no alojamento de uma enzima num determinado espaço, para que não haja uma perda da atividade catalítica e que possa ser reutilizada de forma contínua [23]. A imobilização de enzimas é uma mais-valia para os processos, microrreatores, por aumentar a sua estabilidade, permitir a reutilização das mesmas devido à menor perda de atividade ao longo do tempo, simplifica a separação dos produtos de reação e, facilita os processos de fluxo contínuo e aumenta a estabilidade das enzimas [12, 24]

Várias técnicas de imobilização de enzimas têm vindo a ser estudadas, para que a implementação de processos catalíticos, seja viável [25, 26]. Tal como foi referido, a imobilização enzimática, se for bem-sucedida, aumenta a estabilidade da enzima mas esta também depende das condições de operação e de armazenamento como o pH, temperatura, ambiente químico e dos solventes utilizados. A estabilidade térmica enzimática é umas das vantagens mais significativas deste processo, pois desta forma o sistema pode operar a temperaturas superiores à temperatura ótima de operação da enzima sem que esta desnature e durante períodos de tempo significativos. Ao imobilizar as enzimas, a quantidade de enzima que é gasta durante um processo é menor e facilita a sua reutilização, podendo diminuir os custos do processo [5, 24, 27, 28].

A atividade enzimática depende de fatores como pH, temperatura, ambiente químico e do solvente utilizado. Além disso é muito sensível ao processo de imobilização utilizado. Mesmo com o controlo de todas as condições operacionais, a atividade pode diminuir facilmente durante o processo de imobilização. No entanto este problema é compensado pela possibilidade de reutilização do biocatalizador e a maior facilidade em purificar o

produto obtido. Apesar de todas as vantagens na imobilização de enzimas, este processo só pode ser implementado se for economicamente viável. Os custos só diminuem se as enzimas puderem ser reutilizadas, e na prática isto pode ser controlado considerando a quantidade de enzima necessária por unidade de produto formado[8]. As técnicas mais comuns de imobilização dividem-se em quatro categorias: ligação covalente, adsorção a um suporte sólido, aprisionamento/encapsulação e reticulação intermolecular. Estas são apresentadas na Figura 2 [8].

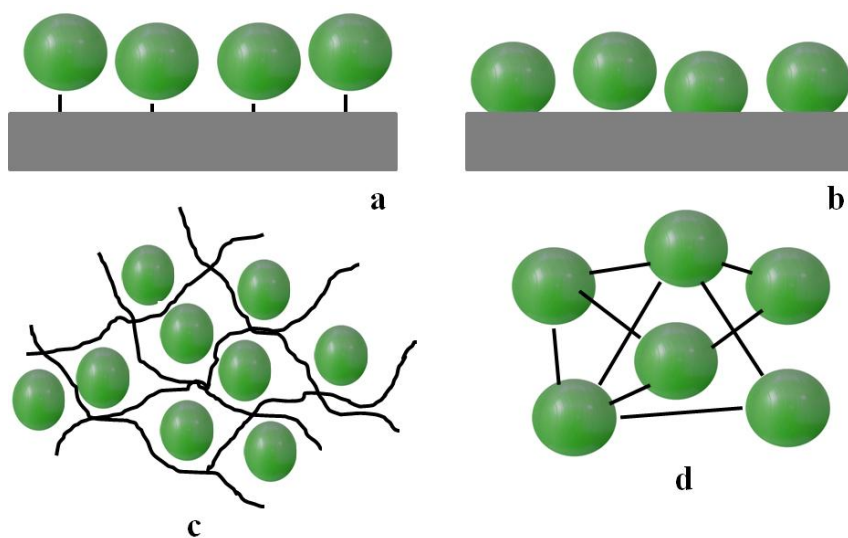


Figura 2 – Principais técnicas de imobilização de enzimas: (a) – Ligação covalente, (b) – Adsorção a um suporte sólido, (c) – Aprisionamento/encapsulamento, (d) – Reticulação intermolecular.

1.2.1.1. Ligação covalente

Tal como o nome indica, esta técnica baseia-se na ligação covalente entre a enzima e os grupos reativos do suporte de imobilização. Desta forma obtêm-se preparações muito estáveis, e a perda de enzima a partir do suporte é mínima mesmo na presença de soluções fortemente ionizadas. Contudo, esta técnica também pode levar à perda de atividade ou inatividade da enzima se o grupo funcional da enzima utilizado para a imobilização estiver perto do centro ativo ou for o centro ativo da enzima [12, 29].

Assim o estabelecimento da ligação covalente deve envolver um grupo funcional que não seja essencial para a ação catalítica da enzima nem afetar o centro ativo [29]. De forma

a cumprir estes requisitos, os processos de imobilização privilegiam o estabelecimento das ligações com os grupos amino, carboxilo, hidroxilo, tiol e fenol das proteínas [21].

Durante o processo de imobilização covalente deve ter-se em consideração o seguinte: (1) se os grupos funcionais das enzimas são adequados à imobilização covalente nas condições escolhidas, (2) a reação entre a proteína e o suporte de imobilização e (3) se a funcionalidade do suporte escolhido é adequada à imobilização da proteína [29].

Os suportes inorgânicos são resistentes ao ataque microbiano e a solventes orgânicos [30]. No entanto, a sua característica inorgânica dificulta a ligação covalente entre a matriz enzimática e o suporte. Nestes casos utilizam-se, normalmente, derivados trialcóxissilano contendo um grupo orgânico funcional, sendo este método denominado de silanização [21]. O procedimento para a imobilização consiste, simplificadamente, nos seguintes passos [29]: primeiro procede-se à ativação dos grupos funcionais do suporte de imobilização, através da utilização de reagentes adequados cuja escolha depende do tipo de suporte e da enzima utilizada. De seguida estabelece-se a ligação covalente do grupo funcional da enzima com o grupo funcional do suporte de imobilização. Para isto prepara-se uma solução enzimática e um reagente se necessário para se formar a ligação [29].

1.2.1.2. Adsorção

A adsorção é a ligação das enzimas a um suporte sólido por adsorção física, ligações iónicas ou ambas sem a modificação química prévia da matriz ou da enzima. Este é um dos processos de imobilização de enzimas mais simples, não sendo necessário a utilização de reagentes, tornando-se numa técnica de baixo custo. Além disso, normalmente não existe o risco do centro ativo da enzima ser danificado durante o processo [21, 25, 29].

Tal como nos restantes processos de imobilização, a natureza da enzima e do suporte de imobilização podem afetar a quantidade de enzima imobilizada e a atividade enzimática final. No caso particular desta técnica a ligação da enzima é influenciada pela área superficial do suporte e a proporção de grupos hidrofílicos/hidrofóbicos do suporte [21, 25, 29].

No caso da adsorção física as forças responsáveis pela imobilização são fracas e, normalmente são ligações de hidrogénio, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Desta forma, a imobilização para proteínas de maior dimensão podem estabelecer um maior número de interações. A adsorção por ligações iónicas envolve,

essencialmente, a ligação de sais carregados que atraem as zonas, da proteína com a carga oposta [21, 29].

Uma das desvantagens deste método reside no facto de que durante o processo pode ocorrer a dessorção da enzima, ou seja, a libertação da enzima do suporte devido às forças de ligação serem fracas. Por esta razão, ao longo do tempo de operação, a atividade das enzimas imobilizadas vai-se perdendo de forma gradual. Além disso vai ocorrer a contaminação do produto final com enzimas, o que pode constituir um problema sério, principalmente na indústria alimentar [29]. A dessorção também pode ocorrer devido a alterações conformacionais da enzima ou alterações hidrodinâmicas do sistema reacional [21]. Para minimizar a dessorção é necessário controlar variáveis operacionais como pH, força iónica e temperatura. Contudo, não é possível eliminar totalmente a dessorção, devido ao equilíbrio entre as espécies adsorvidas que resulta numa perda contínua de enzima [29].

Uma outra forma possível de minimizar a dessorção é através da reticulação da enzima utilizando um reagente bifuncional após o passo de adsorção. No entanto após este procedimento, verificou-se que a reutilização do suporte é limitada [21].

O suporte para imobilização por adsorção normalmente deve ser preferencialmente poroso, podendo ser origem sintética ou natural. A solução da enzima a imobilizar deve ser diluída até uma determinada concentração com uma solução tampão que deverá ter o pH ótimo desta. A solução é colocada em contato com o suporte durante algum tempo a uma determinada temperatura até se obter o equilíbrio de adsorção, ou até se conseguir a concentração de proteína desejada no suporte. No final o suporte é lavado com a solução tampão e fica pronto a ser utilizado [29].

1.2.1.3. Aprisionamento/encapsulação

Este método consiste no aprisionamento ou encapsulamento da enzima numa matriz polimérica ou utilizando a técnica sol-gel [31]. O biocatalizador não estabelece ligações químicas com o suporte, e desta forma a molécula enzimática não sofre alterações na sua estrutura. O processo de fabrico é simples e reproduzível. Esta técnica permite modificar a porosidade da matriz consoante o tamanho do biocatalisador que se pretende imobilizar. Desta forma a matriz permite a passagem de moléculas de massa molecular inferior à do biocatalisador. Neste caso, também é possível modificar quimicamente a matriz,

introduzindo unidades eletroquímicas com propriedades óticas que permitem medir sinais de absorvência e fluorescência, aumentar as resistências química e térmica; diminuir a degradação biológica e diminuir efeitos de inchamento [32].

As desvantagens desta técnica são: (1) a difusão contínua do biocatalisador devido ao diâmetro não uniforme dos poros do gel; (2) perda de atividade enzimática devido aos radicais livres produzidos durante a reação de polimerização; (3) limitações significativas à transferência de massa, uma vez que esta ocorre apenas por difusão molecular; (4) baixa estabilidade mecânica e (5) reduzida longevidade do gel devido ao crescimento celular quando são imobilizadas células metabolicamente ativas [21, 33].

Existem diferentes métodos de realizar o aprisionamento de biocatalisadores em géis poliméricos. A polimerização pode realizar-se na presença da enzima, utilizando-se monómeros ou pré-polímeros já misturados com o biocatalisador. Também é possível utilizar uma solução polimérica com contra iões resultando num gel ionotrópico. Neste caso, a reticulação pode ocorrer por precipitação da solução polimérica na presença de um agente de gelificação [21]

1.2.1.4. Reticulação intermolecular

O método mais comum é a imobilização da enzima num suporte poroso. Desta forma, confere-se, estabilidade à enzima e previne-se que esta sofra lixiviação. Esta técnica geralmente decorre em dois passos. No primeiro, as moléculas são adsorvidas para o interior dos poros do suporte e no segundo, as enzimas adsorvidas são reticuladas por adição de um reagente, por exemplo o glutaraldeído, para produzir agregados de enzimas estáveis e ativos. As principais desvantagens desta abordagem são a dificuldade em controlar o tamanho dos agregados, levando à possibilidade do substrato ou o produto não se difundirem muito facilmente entre as reticulações enzimáticas [25].

Contudo esta técnica tem evoluído para que a utilização do suporte de imobilização não seja fundamental. As abordagens mais recentes são os cristais de enzima reticulados (CLECS) e os agregados de enzima reticulados (CLEAS) que não utilizam suporte de imobilização, embora apresentem problemas de difusão, sobretudo no caso de macromoléculas [31]. Estas duas técnicas dependem fortemente das condições operacionais, como a temperatura ou pH, entre outras [8].

Na preparação de CLECS, a enzima, que deve ter uma pureza elevada, é cristalizada numa solução aquosa a uma temperatura adequada. Depois os cristais formados são reticulados com glutaraldeído [31]. Os CLECS apresentam uma maior atividade e enantioselectividade em solventes orgânicos do que em soluções aquosas, além de reterem a atividade enzimática em condições extremas de temperatura e pH, e em misturas orgânicas ou soluções orgânico-aquosas [8].

Os CLEAS são obtidos por precipitação de proteínas seguida da reticulação com glutaraldeído. Podem exibir baixa estabilidade num reator de tanque agitado ou em reatores tubulares. Se forem encapsulados em suportes porosos ou numa rede rígida de poli(vinil álcool), podem ser largamente utilizados em processos biocatalíticos robustos [8].

1.2.1.5. Outras técnicas

Para além das técnicas de imobilização apresentadas anteriormente, existem outras, menos comuns que se apresentam de seguida.

Micelas Invertidas

Esta técnica de imobilização de enzimas é muito prática e simples pois basta colocar moléculas de tensoativo numa solução orgânica apolar num meio com agitação. Depois da junção, o tensoativo e as moléculas orgânicas agregam-se formando micelas invertidas, onde a camada externa é constituída pelas caudas hidrofóbicas e o interior pelos grupos hidrófilicos. De seguida basta introduzir a enzima liofilizada ou sob a forma de solução concentrada de modo a ficar encapsulada dentro das micelas invertidas. Para manipular as condições ótimas de operação é necessário manipular variáveis como o grau de hidratação da micela, o tipo de solvente e o tipo de tensoativo [21].

É importante referir que as micelas invertidas são ópticamente transparentes, o que é uma mais-valia quando se quer caracterizar os solutos e as micelas em soluções aquosas utilizando de técnicas espectroscópicas [21]. Estes sistemas apresentam áreas interfaciais muito elevadas, aproximadamente 100 m²/mL. As limitações difusionais também são baixas pois a distância entre a enzima e a interface é muito pequena. Podem existir dificuldades na separação e recuperação da enzima caso a concentração de tensoativo utilizado ser elevada [21].

As micelas invertidas além de serem um método de imobilização de enzimas também são referidas como nanorreatores ou microrreatores, devido às suas propriedades estruturais [34].

Irradiação por Micro-ondas

A irradiação por micro-ondas é uma tecnologia recente que imobiliza enzimas por adsorção ou por ligação covalente [8]. A necessidade de desenvolver esta tecnologia, surgiu da dificuldade em distribuir as enzimas pelos poros em suportes porosos, devido a limitações difusionais, sobretudo para enzimas de grandes dimensões. Utilizando a tecnologia de irradiação por micro-ondas combinada com a adsorção, o tempo para imobilização diminui de forma significativa e a quantidade de enzima imobilizada aumenta drasticamente. A combinação desta técnica com a formação de ligações covalentes, aumenta a estabilidade térmica para altas temperaturas e melhora a atividade catalítica [8].

Nanopartículas constituídas por uma única enzima (SENS)

Esta nova tecnologia é muito atrativa, porque as nanopartículas de enzimas exibem uma boa estabilidade em condições muito extremas [35]. A enzima é rodeada de um composto orgânico/inorgânico poroso com uma espessura inferior a alguns nanómetros. Este processo de formação das SENS é dividido em três passos (Figura 3): no primeiro passo, a superfície da enzima é modificada e solubilizada num meio hidrofóbico; num segundo passo, os grupos vinilo polimerizam em hexano e por último, ocorre a hidrólise e a condensação do grupo funcional trimetoxissilil (TMS) [35].

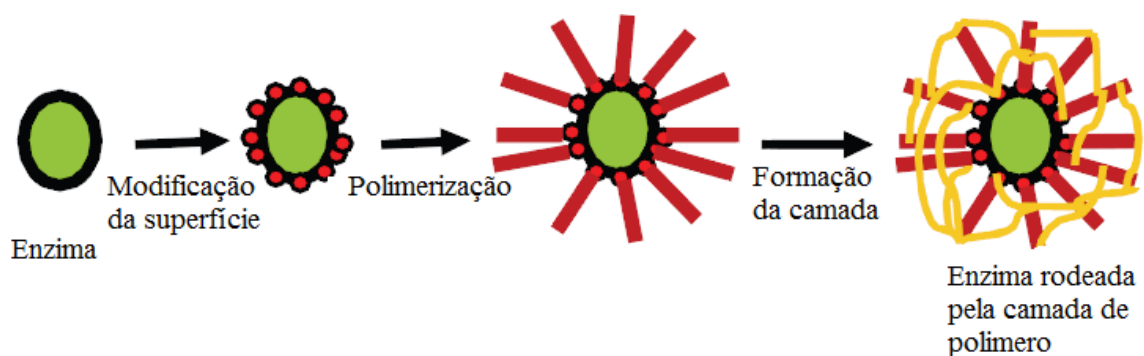


Figura 3 – Esquema da síntese de SENS (adaptado [35]).

Fotoimobilização

O método de fotoimobilização não requer nenhum equipamento específico e é apropriado para a imobilização em pequena e grande escala. Consiste na exposição da proteína e do suporte de imobilização a luz ultravioleta ou solar, que com as condições adequadas leva a uma imobilização covalente da proteína ao suporte [8].

Imobilização por meio de uma enzima

Esta técnica, de uma forma simplificada, consiste em revestir o suporte de imobilização com uma proteína e depois ligar de forma covalente a enzima pretendida a esse revestimento. O objetivo desta técnica é evitar a desativação da enzima quando esta é imobilizada por ligação covalente tradicional [8].

O tamanho da ligação peptídica para a imobilização da proteína é relativamente pequeno, como é uma enzima que medeia a imobilização, esta é bastante específica em condições suaves. A Figura 4 representa um exemplo de aplicação deste método [8, 36].

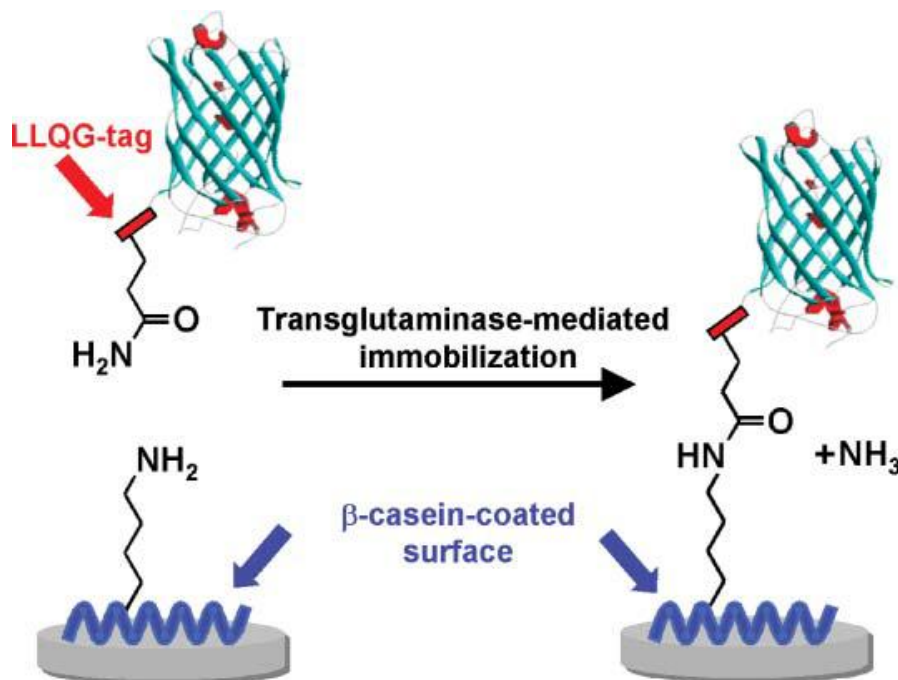


Figura 4 – Representação esquemática da imobilização da *Transglutaminase* a um suporte revestido por caseína [36].

Imobilização por múltiplos passos

Esta técnica é utilizada para melhorar as outras técnicas de imobilização, principalmente, a imobilização covalente. Este processo inclui: (1) interação intermolecular física ou química da superfície da enzima com os novos grupos funcionais introduzidos na superfície do suporte de imobilização; (2) uma posterior reação covalente intramolecular entre os nucleófilos da enzima já imobilizada e os grupos epóxi do suporte de imobilização [8].

1.2.2. Suportes para imobilização

Como já foi referido anteriormente os suportes para imobilização diferem consoante a estrutura e a atividade da enzima, o método de imobilização e as condições processuais. Por isso durante a escolha do suporte para a imobilização da enzima deve-se ter em conta vários fatores dos quais se destacam [21]:

- grupos funcionais reativos;
- carácter hidrófobo/hidrófilo;
- resistência química, mecânica e biológica;
- geometria do suporte;
- custo/disponibilidade;
- químicos (orgânico ou inorgânico);
- morfologia (poroso ou não poroso).

Como o número de fatores relevantes para a escolha da matriz mais adequada é elevado, normalmente, é preferência recai sobre as mais flexíveis [21]. De seguida apresentam-se as características de alguns dos suportes mais utilizados para a imobilização de enzimas.

1.2.2.1. Materiais inorgânicos

A utilização de materiais inorgânicos, devido à sua grande estabilidade mecânica, térmica e química, tem sido amplamente estudada como suporte para a imobilização de enzimas [8]. A seguir são referidos alguns exemplos.

Os suportes mesoporosos são muito promissores para imobilização de enzimas pois apresentam uma grande área superficial e um volume de poros elevado [37]. Assim,

assegura-se a retenção de uma grande quantidade de enzimas, o que leva a uma alta produtividade e rendimento relativamente ao tempo de reação. O material mesoporoso funcional com uma química superficial estável e uma estrutura mesoporosa única, pode criar um microambiente favorável para as enzimas retidas e uma boa afinidade entre a enzima e o suporte. Neste caso consegue-se obter uma eficiência de imobilização elevada resultado num melhoramento da estabilidade enzimática. Um exemplo de aplicação de material mesoporoso foi a utilização de sílica mesoporosa para a imobilização de amilase, glucoamilase e a invertase[37].

A utilização de materiais inorgânicos microporosos, com estruturas lamelares ou tridimensionais, para a imobilização enzimática também tem sido estudada. Um exemplo de aplicação são os zeólitos, aluminossilicatos cristalinos microporosos com estruturas formadas por redes tridimensionais. As suas propriedades podem ser manipuladas de forma a se gerar ou regular o caráter ácido/básico, hidrofóbico/hidrofílico e obter uma adsorção seletiva. Estas propriedades dependem principalmente da estrutura, composição, natureza catiónica e estrutura dos seus poros. Assim, os zeólitos apresentam características no qual a adsorção de enzimas é favorável, e este pode ser utilizado como uma interface entre a fase aquosa, no interior do zeólito, e a fase orgânica contendo o substrato[38-40]. A imobilização de lipase em zeólitos já foi testada com reações de hidrólise e esterificação [39, 41].

Existem vários exemplos de aplicação de argilas, aluminossilicatos-lamelares, como suporte para imobilização de diversas enzimas. Por exemplo, a lipase foi imobilizada por adsorção em argilas sintéticas [42]. Para além de aluminossilicatos, existem diversos materiais lamelares, como por exemplo o titanossilicato AM-1[43], material sintetizado na Universidade de Aveiro, que foi o material inorgânico utilizado como suporte para a imobilização da enzima CAL B neste trabalho.

O AM-1, também denominado por JDF-L1 [44], é um titanossilicato com uma estrutura lamelar, de composição $\text{Na}_4\text{Ti}_2\text{Si}_8\text{O}_{22} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A sua estrutura lamelar é constituída por tetraedros de SiO_4 e pirâmides de base quadrada de TiO_5 . Cada vértice da base desta pirâmide é compartilhado com um tetraedro de SiO_4 de maneira a formar uma folha contínua. Entre as folhas encontram-se os catiões de sódio e as moléculas de água [43-45]. Tipicamente a síntese de AM-1 é realizada da seguinte forma: mistura-se 10,05 g de uma solução de silicato de sódio (27% m/m SiO_2 , 8% m/m Na_2O), 1,62 g de hidróxido de sódio

e 8,0 g de água [43]. Em seguida é adicionado a esta solução TiCl_3 (7,01 g, de uma solução 23,5% m/m de TiCl_3 em 5,9 % m/m HCl) e agita-se de forma vigorosa. O gel formado (3,1 $\text{Na}_2\text{O}:2\text{SiO}_2:1,0\text{TiO}_2:101\text{H}_2\text{O}$) foi esterilizado durante 4 dias. Este foi caracterizado por SEM, difração de raio-x em pó, NMR de massa ^{29}Si e ^{23}Na , quantidade de adsorção de água e TGA/DSC [43, 46]. A caracterização SEM mostrou que o AM-1 é constituído por aglomerados laminares. O espectro NMR de massa ^{29}Si para o AM-1 mostra apenas um pico a -107,4 ppm. Em relação à adsorção, este não adsorve azoto, mas relativamente à água tem alguma afinidade pois adsorve cerca de $0,115\text{g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{catalisador}}$. Pelas análises térmicas realizadas verificou-se que é estável acima de 550-600 °C.

1.2.2.2. Materiais poliméricos

Os polímeros sintéticos e naturais também têm vindo a ser muito aplicados como suportes para imobilização. Entre estes materiais incluem-se as espumas de poliuretano, esponjas porosas de queratina, nylon, celulose, entre outros. Os filmes de nylon foram testados em biorreatores que combinam biocatalisadores com biosseparação, representando uma mais-valia devido ao baixo custo, à rapidez de produção de filme de nylon e à facilidade de recuperação da enzima no final do processo [8]. A celulose é um polímero natural de origem vegetal, inerte, biocompatível, e tem um carácter hidrofílico que pode ser regulado para a imobilização de enzimas. Devido à sua estrutura microestruturada, a celulose tem uma grande capacidade de imobilizar uma elevada quantidade de enzima [47, 48]. A celulose bacteriana é um biopolímero próspero na área da saúde e é sintetizada por bactérias de alguns géneros como: *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*. Esta é considerada uma celulose pura e a sua forma de produção reduz os custos do produto final. O polímero linear de celulose é fortemente associado através das ligações de hidrogénio que são responsáveis pela formação das fibras de celulose, nesta existem ligação intramoleculares que estão associadas á rigidez desta e ligações intermoleculares responsáveis pela formação da fibra vegetal [49]. Devido a estas características, neste trabalho, utilizou-se celulose bacteriana como suporte de imobilização da enzima CAL B.

1.2.2.3. Líquidos iônicos

Os líquidos iônicos normalmente são utilizados de três formas diferentes: como solventes puros, como co-solventes num sistema aquoso ou num sistema bifásico [50]. Além disso, os líquidos iônicos também podem ser utilizados como suportes de imobilização. Estes compostos são sais iônicos líquidos a temperaturas inferiores a 100°C, são facilmente manuseáveis, e formam sistemas bifásicos com a água o que é uma mais-valia em sistemas biocatalíticos, além disso permitem separar as enzimas do sistema reacional com mais facilidade. No entanto a nível industrial os líquidos iônicos ainda não são muito utilizados por questões económicas [8].

Rumbau *et al.* utilizaram um sistema bifásico água/líquido iônico para imobilizarem a enzima *Horseradish peroxidase* ao líquido iônico e depois misturaram o líquido iônico na solução aquosa com os restantes reagentes. A reação decorreu de acordo com o esquema apresentado na Figura 5. Estes autores verificaram que era mais simples separar e reutilizar a enzima devido ao sistema bifásico formado [51].

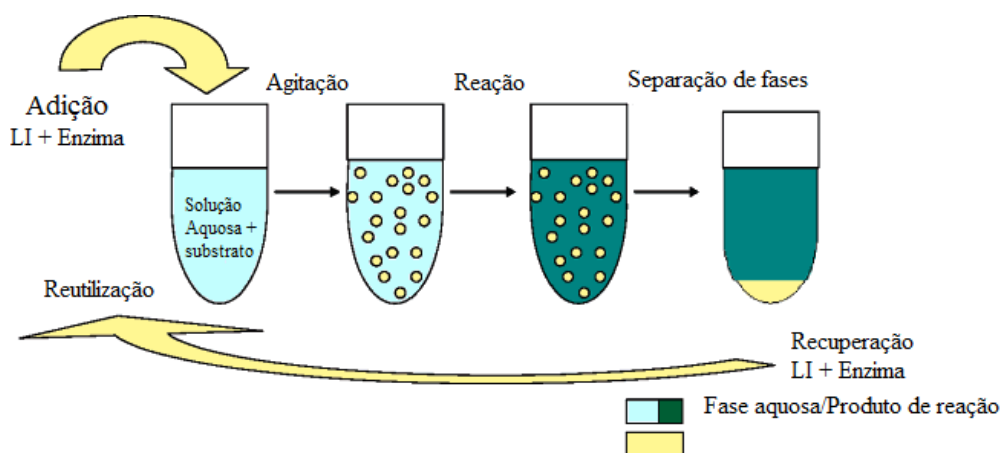


Figura 5 – Imobilização da enzima ao líquido iónico (LI) e catálise num sistema bifásico (adaptado [49]).

1.2.2.4. Suportes magnéticos

Os suportes magnéticos também podem ser utilizados na imobilização de enzimas pois as suas propriedades magnéticas permitem uma rápida separação da mistura reacional por aplicação de um campo magnético exterior [52]. Podem facilmente ser estabilizados num reator fluidizado de fluxo contínuo aplicando-se um campo magnético exterior. Como

normalmente não se consegue imobilizar uma grande quantidade de enzima, os suportes são mergulhados em polímeros orgânicos ou sílica inorgânica formando um suporte híbrido permitindo imobilizar uma maior quantidade de enzima [8].

As nanopartículas magnéticas apresentam mais vantagens em relação a outros suportes pois apresentam uma baixa resistência à transferência de massa, resolvendo os problemas difusionais, e têm um custo operacional baixo [52].

1.2.3. Cinética enzimática

Uma reação enzimática ocorre da seguinte forma: a enzima (E) liga-se ao substrato (S) formando um complexo enzima-substrato (ES) necessário para a formação dos produtos. Desta forma, na reação enzimática, a energia necessária para a conversão do reagente em produto é menor que na reação não catalisada [53]. Na Figura 6 representa a variação da energia livre de Gibbs (G) de uma reação não catalisada (—) e catalisada (- -). ΔG_1^{+} e ΔG_1^{+} representam a energia de ativação necessária para a reação, catalisada e não catalisada, respetivamente. A energia de ativação da reação inversa para a catalisada e não catalisada é dada, respetivamente por ΔG_{-1}^{+} e ΔG_{-1}^{+} . Verifica-se que a energia de ativação necessária para a reação catalisada é inferior à energia necessária para a reação não catalisada.

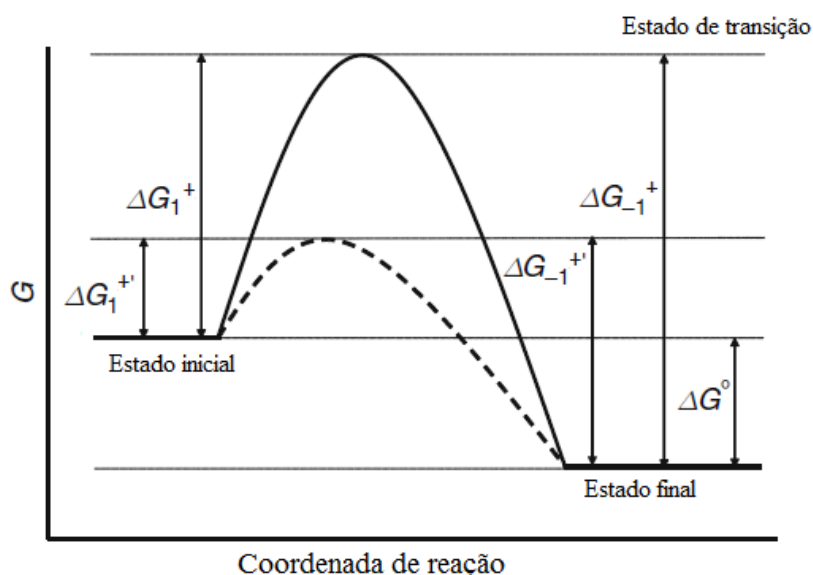
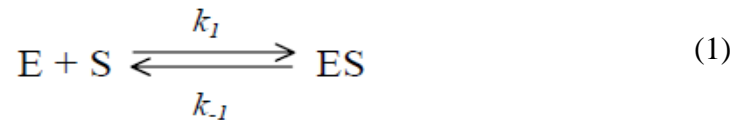


Figura 6 – Representação gráfica da variação da energia livre de Gibbs (G) de uma reação não catalisada (—) para uma reação catalisada (- -) (adaptado [53]).

Leonor Michaelis e Maud Mentem propuseram um modelo para descrever a cinética enzimática que consiste em dois passos. Inicialmente a enzima liga-se ao substrato formando o complexo ES, este é um passo reversível e relativamente rápido [53]:



De seguida, ocorre o passo catalítico em que o complexo ES sofre uma transição dando origem, novamente, à enzima livre e à formação do produto:



Este último passo é o mais lento, ou seja é o passo limitante da velocidade de reação, sendo assim, a velocidade de reação deve ser proporcional à concentração de *ES* [53].

É de referir que a enzima existe sempre na forma livre *E* e no complexo *ES*. Se a concentração do substrato for pequena, a enzima livre estará em maior concentração e a reação é proporcional à concentração de *S*, pois o equilíbrio da equação (1) é deslocado para a formação de *ES* à medida que a concentração de *S* aumenta [53].

A velocidade máxima de reação (*V*_{máx}) obtém-se quando praticamente toda a enzima está na forma de complexo *ES*, e neste ponto, mesmo que se aumente a concentração de substrato, a velocidade não se altera [53].

Durante algum tempo, depois da formação de *ES*, a concentração do complexo *ES* mantem-se constante. Este período de tempo em que a concentração de *ES* se mantem constante é denominado de estado estacionário, e é nestas condições que se desenvolve a equação de Michaelis-Menten. Eventualmente, a reação entra na fase de formação do produto e a concentração de *ES* começa a decrescer gradualmente [53].

A equação de Michaelis-Menten traduz a variação da velocidade de uma reação enzimática em função da concentração de substrato [53].

No estado estacionário:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \Rightarrow k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (3)$$

Sabendo que a concentração de enzima livre é dada por:

$$[E] = [E]_0 - [ES] \quad (4)$$

A partir da substituição de (4) em (3) vem que:

$$k_1([E]_0 - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \Leftrightarrow \frac{([E]_0 - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M \quad (5)$$

onde K_M é a constante de Michaelis-Menten.

A velocidade inicial da reação é $r_{in} = k_2[ES]$, da equação (5) obtém-se $[ES]$ e substituindo na velocidade inicial vem:

$$r_{in} = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_M + [S]} \quad (6)$$

Sabendo que a velocidade máxima ocorre quando $[ES]=[E]_0$, então a velocidade máxima é $r_{máx} = k_2[E]_0$, substituindo na equação (6) obtém-se a equação (7) denominada por equação de Michaelis-Menten.

$$r_{in} = \frac{r_{máx}[S]}{K_M + [S]} \quad (7)$$

A partir desta equação, relaciona-se numericamente $r_{máx}$ e K_M . Quando r_{in} é metade da $r_{máx}$, o valor da concentração de substrato é o valor de K_M , (Figura 7). Sendo assim, K_M é equivalente à concentração do substrato e indica a “afinidade” da enzima pelo substrato, quanto menor o valor de K_M , maior será a “afinidade” da enzima pelo substrato [53].

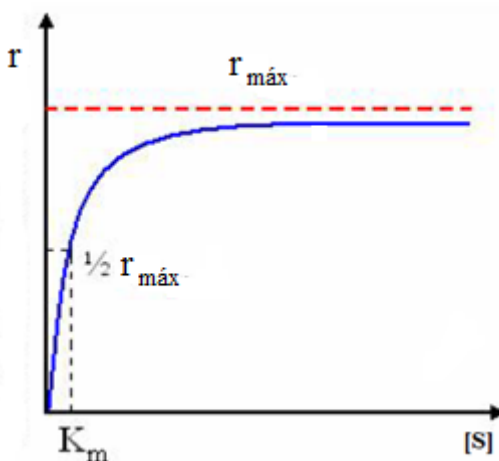


Figura 7 – Relação da velocidade de reação com a concentração do substrato de um reação enzimática [51].

1.3. Lipases

1.3.1. Características e aplicações das lipases

Neste momento, a nível industrial, as enzimas estão a passar pela maior fase de pesquisa e desenvolvimento dos últimos anos, resultando num desenvolvimento de novos produtos e melhoramento da performance dos processos já existentes. Existem cerca de 4000 enzimas conhecidas mas apenas cerca de 200 são utilizadas a nível comercial, sendo a maioria de origem microbiana. É de notar que cerca de 75% do mercado enzimático pertence às enzimas com ação hidrolítica, grupo que inclui as lipases [54].

As enzimas de origem microbiana são produzidas principalmente por fungos e bactérias, e geralmente esta também é a escolha para a produção da lipase. A produção de lipase extracelular depende das condições de cultivo como a quantidade de azoto e carbono disponíveis, a presença de sais inorgânicos que pode estimular ou inibir a produção da enzima, ou a disponibilidade de oxigénio dissolvido e o arejamento. Os fatores ambientais como o pH e temperatura também são importantes para a produção da lipase microbiana, sendo que o pH ótimo se situa entre 6,0 e 8,0 e a temperatura ótima varia entre 20°C e 40 °C [55].

A lipase cuja designação é triacilglicerol lipase (E.C. 3.1.1.3)¹ catalisa a hidrólise de triacilglicerol a glicerol e ácidos gordos livres, numa interface óleo/água, onde o substrato lipolítico se encontra em equilíbrio entre o estado monomérico, micelar e emulsionado. A cinética da reação lipolítica catalisada pela lipase não pode ser descrita pela equação de Michaelis-Menten pois esta apenas é válida para reações que ocorrem em fases homogéneas [54-56].

Para definir uma enzima lipolítica como uma verdadeira lipase são utilizados principalmente dois critérios: (1) a enzima deve ser ativada na presença de uma interface, ou seja, a sua atividade deve aumentar assim que se forme uma emulsão de triglicerídeos e este fenómeno denomina-se por “ativação interfacial”; (2) a enzima deve conter uma

¹ Classificação numérica para as enzimas, com base nas reações que catalisam.

² AM-n significa Aveiro-Manchester, n=1- 4.

³ Bonicamp, J. M.;Martin, K. L.;McBride, G. R.;Clark, R. W. - Beer's Law Is Not a Straight Line:

superfície que proteja o seu centro ativo e esta “capa protetora” deve afastar-se quando está em contato com a interface [54].

As lipases comercializadas são obtidas utilizando diferentes micro-organismos como bactérias e fungos, o que é uma mais-valia a nível comercial pois desta forma produz-se uma grande variedade de lipases extracelulares [54]. Muitas lipases estão ativas em solventes orgânicos podendo catalisar um número elevado de reações como esterificações, transesterificações, acilações regiosseletivas de glicóis e mentóis, síntese de peptídeos e outras substâncias químicas [54, 56].

Atualmente na indústria, a produção de lipases é um negócio de milhares de milhões de dólares que abrange uma grande variedade de área de aplicação. Estas aplicações incluem síntese orgânica de químicos, formulação de detergentes, síntese de biotensioativos, indústria oleoquímica, indústria agroquímica, produção de papel, indústria alimentar, cosméticos, processamento farmacêutico e síntese de polímeros [54, 56].

Na síntese orgânica de químicos a lipase é muito utilizada devido às suas características e capacidades seletivas quando se tratam misturas racémicas. Outra aplicação das enzimas é na esterificação e transesterificação regiosseletiva de compostos polifuncionais [54, 57].

Devido à excelente regiosseletividade das lipases estas são utilizadas para a produção de muitos enantiómeros, como por exemplo para a produção do enantiómero S do *Sulcatol* [54].

Outra indústria na qual as lipases são utilizadas frequentemente é na indústria dos detergentes onde as enzimas têm um papel fundamental, pois diminuem significativamente o impacto ambiental destes. A utilização de lipases permite temperaturas de lavagem mais baixas o que leva a uma poupança de energia, assim como a redução da quantidade de outros componentes menos desejados nos detergentes. Além disso, as lipases são biodegradáveis, não apresentando um impacto negativo nos processos de tratamentos de águas residuais ou risco para a vida aquática [54].

A utilização de lipases tornou-se bastante frequente na indústria alimentar moderna, pois adequam-se bem a solventes orgânicos devido à sua conformação e propriedades interfaciais de ativação e também, devido ao facto de serem de natureza não tóxica. As lipases são incorporadas na produção de vários aromas, na produção de queijo, para

acelerar a sua maturação, e na esterificação de óleos e gorduras acelerando a lipólise da manteiga, gorduras e natas [54, 55].

As lipases também podem ser utilizadas na construção de sensores para a determinação de triacilglicerol tanto em diagnóstico clínico como na indústria alimentar. Os sensores bioquímicos utilizam enzimas ou outras proteínas imobilizadas na matriz ligada a um transdutor. Os sensores de lípidos são económicos e o tempo de análise é menor quando comparado com os métodos químicos utilizados na determinação de triacilglicerol [54].

Outra aplicação das lipases é no tratamento de efluentes para degradação de óleos e poliésteres das águas residuais, remoção de depósitos de biofilmes de sistemas de água de refrigeração ou purificação de gases residuais provenientes de fábricas [54].

Finalmente, na indústria do papel as lipases são utilizadas na remoção de componentes hidrofóbicos da pasta de papel, como os triglicéridos e ceras, que causam problemas sérios na produção de papel [56].

A *Candida antarctica lipase B* (CAL B) foi a enzima selecionada para este trabalho. Existem vários estudos para a aplicação desta enzima em diferentes indústrias como a indústria alimentar, farmacêutica, produção de químicos, cosmética, entre outras. A CAL B é utilizada em reações de transesterificação e esterificação de fenóis funcionais sintetizando antioxidantes que podem ser adicionados na produção do óleo de girassol [54] e na síntese de maltose e glucose [55]. Na indústria farmacêutica a CAL B é aplicada na policondensação de poliésteres alifáticos [58] e produção de medicamentos anti-inflamatórios como os profenos [59]. A CAL B também é utilizada para a catálise da lipofilização de ácidos fenólicos, que são antioxidantes biologicamente ativos, e podem ser aplicados na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar [60] e utilizada na produção de biodiesel [61].

1.3.2. Aplicações de lipases em microrreatores

Na literatura encontram-se diversos processos em que se testou a utilização de lipases imobilizadas em microrreatores. Os dados obtidos incluem diferentes tipos de suportes e diferentes métodos de imobilização e são revistos na Tabela 1.

A Tabela 1 apresenta alguns processos de aplicação de lipases em microrreatores. Dos processos mencionados na tabela, estão presentes casos em que a lipase está

imobilizada em diferentes suportes ou está livre no seio de um fluido. No caso do artigo da referência [24] o processo baseia-se numa reação em cascata, onde são utilizadas três enzimas diferentes e duas delas foram imobilizadas por ligação covalente. Este processo permite um controlo apertado das condições de reação, caso ocorra a desnaturação de enzima esta pode facilmente ser substituída sem ser necessário mudar o capilar ou a fração de ADN e também é um sistema que pode ser reutilizado.

Nos artigos [62-64], os autores imobilizaram a lipase por adsorção em suportes de sílica e verificaram que atividade da enzima se manteve durante 24 h de utilização contínua, que a enzima apresentou uma estabilidade térmica durante longos tempos de reação e também que as conversões obtidas eram elevadas. Também se imobilizou a enzima por adsorção numa membrana de PES e verificou-se que a enzima apresentou boa estabilidade e durante 12 h de operação contínua não houve perda de atividade [65]. No artigo da referência [66] a enzima foi imobilizada por adsorção iónica numa resina fenólica macroporosa e os autores verificaram que a atividade da enzima pode ser melhorada pois esta depende da quantidade de água presente no sistema, e verificaram que o controlo dos produtos de reação é preciso.

A imobilização em poli (ácido meta-acrílico) por ligação covalente foi estudada por Costantini e os seus colaboradores [67] e verificou-se que o número de grupos ácidos utilizados para a ligação com a enzima depende da espessura do filme de polímero, desta forma é possível controlar a quantidade de enzima imobilizada.

Os artigos das referências [68-70] apresentam a enzima imobilizada por encapsulação em diferentes materiais, sílica mesoporosa, partículas cerâmicas, diatomite e resina acrílica, neste caso verificou-se um aumento da estabilidade e resistência enzimática relativamente às mudanças de temperatura e pH e aos solventes orgânicos.

Plazl *et al.* (2008) estudaram a síntese de acetato de isoamilo, numa operação em contínuo, num microrreator para os sistemas bifásicos de água/n-hexano e de 1-butil-3-metilpiridínio dicianamida /n-heptano, em ambos os casos a enzima não foi imobilizada mas a reciclagem e a reutilização do catalisador foi possível devido á formação de duas fases [71-73]. Segundo os autores o processo do sistema bifásico líquido iónico/n-heptano revelou ser uma ferramenta promissora para esterificações industriais devido ao aumento da atividade enzimática e à fácil reutilização do catalisador [73].

Tabela 1 – Processos de aplicação de lipases em microrreatores.

Microrreator	Lipase	Suporte para imobilização	Método de imobilização	Tipo de processo	Ref.
Microrreator capilar	CAL B	Sílica	Ligação covalente ao ADN	Reação em cascata com CAL B, Horseradish peroxidase e a Glucose oxidase	[24]
Microrreator capilar	Lipase de <i>Phycomyces nitens</i>	Sílica mesoporosa	Adsorção	Reação enzimática contínua para a hidrólise de 4-nitrofenil acetato e a transesterificação de (\pm)-1-feniletanol	[62, 63]
Microrreator capilar	CAL A e CAL B	Monólitos de sílica macroporosa	Imobilização por adsorção	Reação de hidrólise do 4-nitrofenil butirato	[64]
Microrreator de membrana	Lipase AK de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , Lipase PS de <i>Pseudomonas cepacia</i> e Lipase AY de <i>Candida rugosa</i>	Membrana de polietersulfona (PES)	Imobilização por adsorção	Transesterificação de trioleína para a produção de biodiesel	[65]
Microrreator - combinação de um reservatório de vidro com um capilar para o fluxo gasoso	Lipase de <i>Aspergillus oryzae</i>	Resina fenólica macroporosa	Imobilizada sobre uma resina fenólica macroporosa hidrofílica por adsorção iônica	Reação gasosa de hidrólise de acetato de etilo	[66]
Microrreator microestruturado	Lipase de <i>Candida rugosa</i> tipo (VII)	Poli (ácido meta-acrílico)	Ligação covalente da enzima com o grupo ácido carboxílico do poli (ácido meta-acrílico)	Hidrólise de 4-nitrofenil acetato	[67]
Capilar	CAL B	Fibra ótica microestruturada de sílica.	Imobilização covalente	Reação de hidrólise do 4-nitrofenil butirato e síntese do laurato de butilo	[5, 27]
Microrreator capilar	Lipase	Sílica mesoporosa	Imobilização por encapsulação	Reação enzimática para a hidrólise de glicerol	[68, 69]
Microrreator capilar	CAL B e Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	Partículas cerâmicas, diatomite ou resina acrílica	Encapsulamento e reticulação	Reação contínua de acilação do isopropanol com acetato de vinil.	[70]
Microrreator em forma de Y produzido por processos de microprodução	CAL B	----	----	Síntese de acetato de isoamilo num sistema bifásico água/n-hexano	[71]
Microrreator em forma de Y produzido por processos de microprodução	CAL B	----	----	Síntese de acetato de isoamilo num sistema bifásico 1-butil-3-metilpiridínio dicianamida/n-heptano	[72, 73]

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes, matérias-primas e aparelhos utilizados

2.1.1. Enzima

A enzima utilizada foi a *Candida antarctica lipase B* produzida por *Aspergillus niger* (Sigma, L3170).

2.1.2. Suportes de imobilização

Como suportes de imobilização utilizaram-se os microcristais de titanossilicato lamelar AM-1 e a celulose bacteriana.

As micropartículas de titanossilicato AM-1² (Figura 8 - A) foram cedidas pelos orientadores e a sua síntese é descrita na referência [43].

As membranas de celulose bacteriana (Figura 8 - B) foram produzidas no CICECO/UA por uma cultura da bactéria *Gluconacetobacter sacchari* a 30 °C durante 48 h, em condições estáticas durante 5 dias, em meio líquido contendo 20 g/L glucose, 5 g/L peptona, 5 g/L extrato de levedura, 2,7 g/L Na₂HPO₄ e 1,15 g/L ácido cítrico [74]. As membranas foram depois lavadas três vezes com solução NaOH 0.5 M a 80 °C durante 1h até estabilização do pH. Posteriormente efetuou-se uma lavagem com lixívia 1% durante 2 h, e os vestígios de lixívia foram removidos com água destilada. Finalmente, as membranas foram congeladas e posteriormente liofilizadas.



Figura 8 – A: Micropartículas de titanossilicato AM-1;
B: Membrana de celulose bacteriana

² AM-n significa Aveiro-Manchester , n=1- 4.

2.1.3. Reagentes

Os produtos químicos utilizados neste trabalho foram: 3-aminopropil trietoxissilano (Sigma-Aldrich, A3648), ácido acético glacial (Panreac), ácido clorídrico (Acros), ácido láurico (Sigma-Aldrich, W261408), cloreto de sódio (Carlo Erba), fosfato dissódico (Sigma, S5136), fosfato monossódico (Sigma, S5011), hidróxido de sódio (Acros), *Kit* medição da proteína total modificado por Onishi & Barr (Sigma, TP0200), solução de p-nitrofenol (Sigma, N7660), p-nitrofenil butirato (Sigma, N9876), solução de glutaraldeído 50% (Sigma- Aldrich, G7651) e cianoborohidrido de sódio (Sigma-Aldrich, 156159). Os solventes utilizados foram: acetonitrilo (Fisher scientific) e água ultrapura.

2.1.4. Equipamento

Os aparelhos utilizados durante o trabalho foram:

- centrífuga Rotofix 32 A;
- espectrofotômetro UVmini-1240;
- balança analítica Precisa 125 A;
- placa de agitação magnética Agimatic-N;
- microscópio eletrônico de varrimento Hitachi S4100/SU-70.

2.2.Métodos de imobilização

2.2.1. Imobilização por adsorção

Para a imobilização por adsorção nas micropartículas de titanossilicato AM-1, preparou-se uma solução de CAL B de 4 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,01 M e pH 7. No caso da imobilização em celulose bacteriana, preparou-se uma solução de 4 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 7. Posteriormente, as soluções foram colocadas em contato com a mesma quantidade de cada um dos suportes (0,028 g), sob agitação e à temperatura ambiente, durante 7,5 h, 8,0 h, 16,0 h para o AM-1 e 3,0 h e 18,0 h para a celulose bacteriana. Por fim, os suportes foram lavados com o tampão fosfato de sódio pH 7.

2.2.2. Imobilização por ligação covalente

2.2.2.1. Imobilização em titanossilicato AM-1

O processo de imobilização covalente de CAL B no titanossilicato AM-1 foi efetuado com o procedimento descrito por Mugo *et al.* (2010) desenvolvido para a imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em fibras microestruturadas de sílica [5]. Este procedimento baseia-se no método do glutaraldeído para a imobilização das enzimas e apresenta-se esquematicamente na Figura 9.

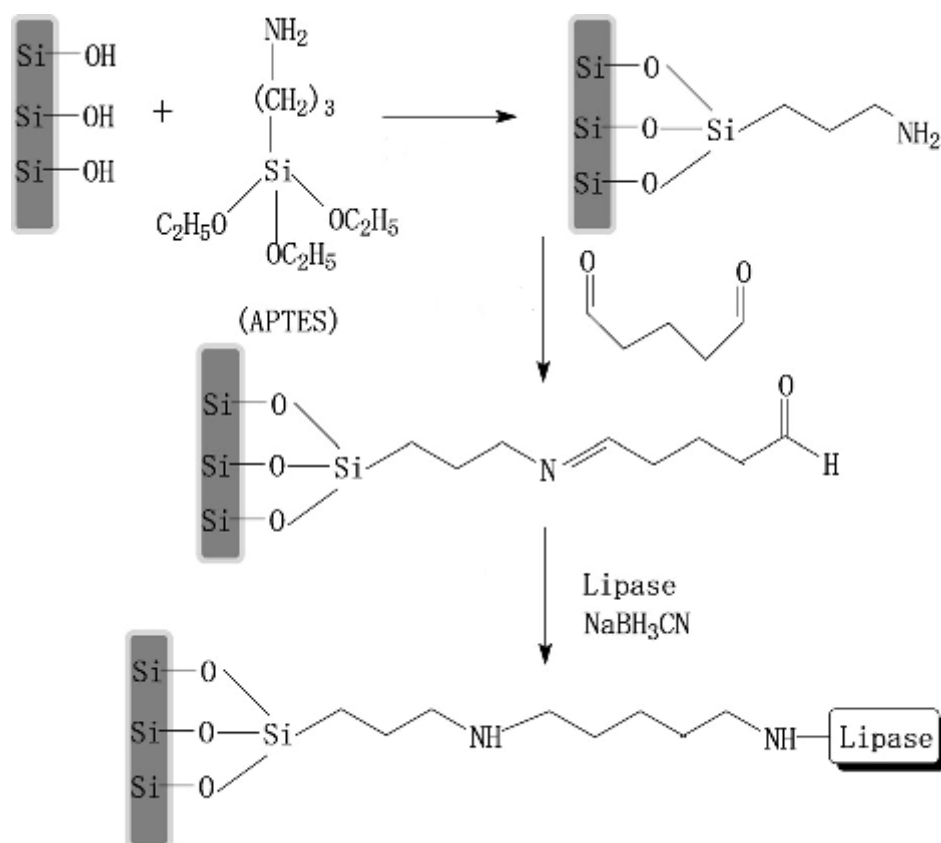


Figura 9 – Representação esquemática do processo de imobilização (adaptado [5]).

O processo iniciou-se com a adição de 0,0280 g de suporte para a imobilização num porta-amostras, adicionaram-se 5 mL de uma solução de 20% de 3-aminopropil trietoxissilano (APTES) (2mL de APTES, 3 mL de ácido acético e 5 mL de água ultrapura). A mistura foi agitada a 300 rpm durante 4 h e, passado este tempo, desligou-se a agitação e deixou-se a repousar durante a noite. Após este período, os suportes foram lavados três vezes com uma solução tampão de fosfato de sódio (0,01M, pH 7), centrifugando-se, para se separar as fases, a 6000 rpm e durante 5 a 10 minutos. De

seguida adicionaram-se 5 mL de uma solução 5% de glutaraldeído em tampão fosfato (0,01M, pH 7) ao suporte sob agitação e deixou-se reagir durante 4 h. Após este período as partículas foram novamente lavadas. Finalmente procedeu-se à imobilização da enzima, adicionando-se ao suporte 5 mL de soluções de CAL B de concentração 8 mg/mL e 4 mg/mL em 1% de sódio cianoborohidrido (NaCNBH₃) em tampão fosfato de sódio (0,01M, pH 7). A mistura foi agitada a 300 rpm testando-se dois tempos de reação, 15,0 h, 16,0 h e 24,0 h. Após este tempo os suportes contendo a enzima imobilizada foram recolhidos e lavados.

2.2.2.2. Imobilização covalente em celulose bacteriana

O processo de imobilização covalente de CAL B em celulose bacteriana foi efetuado de acordo com o procedimento descrito por Carneiro-da-Cunha et al. (1999) desenvolvido para a imobilização de *Candida Rugosa* (Tipo VII) em celulose e derivados de celulose [48].

Prepararam-se segmentos de celulose bacteriana, com comprimento entre 1-2 cm e espessura de 1 a 3 mm, como mostra a Figura 10, e em cada porta amostras colocaram-se 0,0280 g destes segmentos de celulose.



Figura 10 – Celulose bacteriana preparada para a imobilização.

Posteriormente foi preparada uma solução de 10 mL de periodato de sódio 0,5 M e colocou-se nos porta-amostras que continham a celulose com agitação durante 90 min na ausência de luz. No final lavou-se a celulose com água destilada três vezes. Entretanto foi preparada uma solução de CAL B, 2 mg/mL, em tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 7 onde a celulose foi imersa com agitação à temperatura ambiente. Testaram-se dois tempos distintos de contacto entre a celulose e a enzima, 3,0 h e 18,0 h. No final do processo de imobilização tratou-se o suporte-enzima durante 10 minutos, de forma a reduzir a ligação imina a amina e assim garantir uma maior estabilidade, numa solução de 0,5 M de sódio cianoborohidrido em tampão fosfato 0,05 M, pH 7. No final o suporte com a enzima foi lavado com tampão fosfato 0,05 M, pH 7.

2.3.Determinação da quantidade de enzima imobilizada

Para a determinação da quantidade de enzima imobilizada utilizou-se o *Kit* de Onishi & Barr que se baseia na aplicação do método de Lowry modificado. O procedimento que se segue foi adaptado a partir do procedimento que se encontrava no boletim técnico que acompanhava o *kit* [75]. As amostras foram diluídas com uma solução de NaCl 0,85 % de modo a que a concentração de proteína se situasse entre 150-1000 µg/mL. Num tubo de ensaio adicionaram-se 0,2 mL de amostra diluída e 2,2 mL do reagente Biuret, agitou-se bem e deixou-se em repouso à temperatura ambiente durante 10 minutos. Em seguida adicionaram-se 0,1 mL de reagente Folin & ciocalteau's phenol e agitou-se bem e deixou-se repousar durante 30 minutos à temperatura ambiente. No final leram-se as absorvências usando o branco como referência a 728 nm e determinou-se a concentração de proteína (µg/mL) para cada amostra a partir da curva de calibração, para o valor real da concentração, o valor anterior foi multiplicado pelo fator de diluição adequado. A quantidade de enzima imobilizada corresponde à diferença entre a quantidade de enzima presente antes do processo de imobilização e a quantidade presente após o processo.

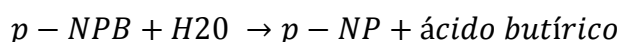
A curva de calibração foi determinada após a medição da absorvência de soluções de proteína padrão diluídas, preparadas a partir da solução de proteína padrão, 100 mg/mL de modo a obter concentrações no intervalo entre 0 e 1000 e sujeitas a procedimento experimental semelhante ao das amostras (Anexo A). A curva de calibração obtida representando o logaritmo da absorvência em função do logaritmo da concentração da proteína é a seguinte:

$$\log(\text{Absorvência}) = (0,846 \pm 0,0473) \times \log([\text{Proteína}]) - (2,454 \pm 0,1300) \quad (8)$$
$$R^2=0,9938$$

2.4.Determinação da atividade de CAL B

A atividade da enzima foi determinada com base na reação de hidrólise do p-nitrofenil butirato (p-NPB), à temperatura ambiente (24°C), e a absorvência foi lida a 410 nm.

A reação de hidrólise é descrita pela seguinte reação química:



e considera-se que uma unidade de enzima (U) é a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de p-NP por minuto.

Inicialmente preparou-se uma solução de p-NPB, 3,4mM, em acetonitrilo e tampão fosfato de sódio 0,01 M e pH 7 numa proporção de 1:1 (v/v) que foi utilizada para todos os ensaios. Na determinação da atividade da enzima livre adicionou-se 2480 μL da solução de substrato (p-NPB) e 20 μL de enzima, com uma concentração de 0,048 g/mL, à célula de quartzo, agitou-se e colocou-se imediatamente no espectrofotómetro iniciando-se a leitura da absorvência de 10 em 10 segundos até ao momento em que a absorvência começou a estabilizar.

No caso da CAL B imobilizada, colocou-se o suporte com a enzima em contacto com 5 mL da solução de substrato e para uma mesma condição experimental, De modo a evitar oscilações de volume, cada tempo de amostragem correspondeu à paragem de uma reação enzimática nas mesmas condições das restantes amostras. Os valores de absorvência obtidos foram convertidos em valores de concentração de p-NP ao longo do tempo de reação utilizando a seguinte curva de calibração:

$$\text{Absorvência} = (8,389 \pm 0,315) \times [p - NP] \quad (9)$$
$$R^2=0,994$$

Para isso preparam-se soluções de p-Nitrofenol com concentrações entre 0,0100 mM e 0,100 mM (Anexo B) e as absorvências foram lidas a 410 nm.

A atividade por massa de suporte e a atividade específica da CAL B determina-se utilizando as seguintes equações, respetivamente.

$$\text{Atividade} = \frac{U}{\text{massa do suporte (g)}} \quad (10)$$

$$\text{Atividade Específica} = \frac{U}{\text{massa da enzima (mg)}} \quad (11)$$

2.5. Determinação da atividade das partículas de titanossilicato AM-1

Para verificar se a hidrólise do p-NPB é influenciada pelo AM-1, realizou-se um ensaio apenas com AM-1, sem CAL B. O ensaio foi realizado com as mesmas condições de operação utilizadas para determinar a atividade da CAL B, seção 2.4.

2.6. Microscopia eletrônica de varrimento

Foram realizadas análises por microscopia eletrônica de varrimento (SEM) aos suportes de imobilização antes e depois da imobilização da CAL B, para verificar a morfologia dos microcristais do AM-1 e dos filamentos de celulose microbiana num microscópio eletrônico de varrimento Hitachi S4100/SU-70. Em todas as amostras depositou-se uma camada de carbono para a realização da análise e utilizou-se um potencial de aceleração de 10,0 kV.

3. Análise e discussão de resultados

3.1. Determinação da atividade da CAL B Livre

Este trabalho iniciou-se com a determinação da atividade da CAL B livre. Este valor de atividade serviu como controlo na avaliação da atividade da enzima após aplicação das técnicas de imobilização. Esta atividade foi determinada utilizando a reação de hidrólise do p-nitrofenil butirato (p-NPB) e as condições de reação foram as mencionadas na secção 2.4. O ensaio foi replicado três vezes e, por isso, os valores de absorvência apresentados na Figura 11 são valores médios.

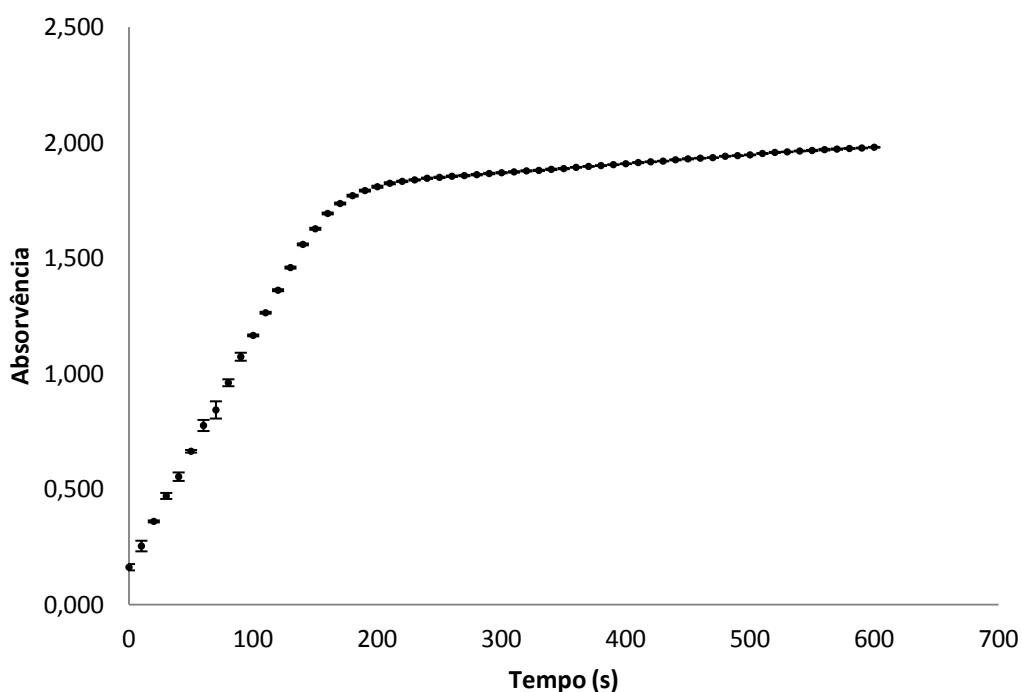


Figura 11 - Variação temporal da absorvência de p-NP durante reação de hidrólise para o estudo da atividade da enzima livre.

Os resultados da Figura 11 mostram que a absorvência aumentou aproximadamente até aos 150 segundos e em seguida começou a estabilizar. A determinação da atividade foi obtida com os valores de concentração até aos 70 segundos após conversão dos valores de absorvência utilizando a reta de calibração para o p-nitrofenol (p-NP), equação (9), como se apresenta na Figura 12.

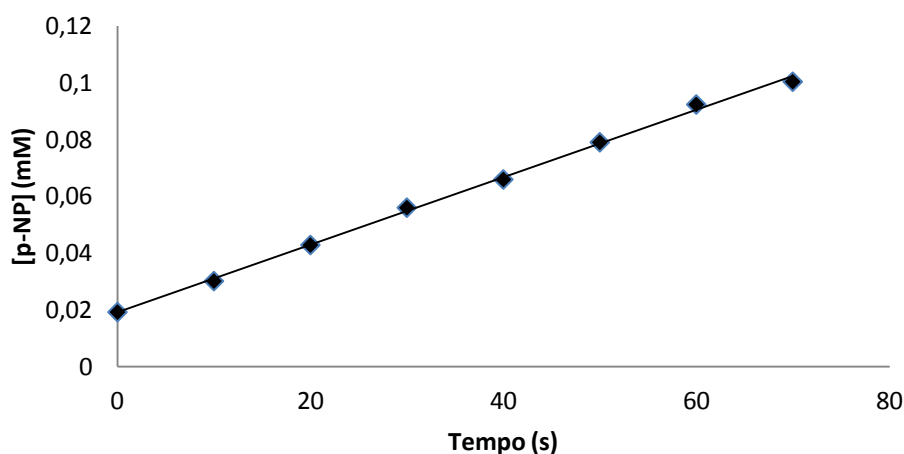


Figura 12 – Variação da concentração do p-NP ao longo da reação de hidrólise para o estudo da atividade de CAL B livre.

O ajuste linear obtido foi o seguinte:

$$[p - NP] = (1,20 \pm 0,021) \times 10^{-3} \times t + (1,92 \pm 0,087) \times 10^{-2} \quad (12)$$

$$R^2=0,9982$$

O declive da reta corresponde à velocidade inicial da reação enzimática e o seu valor foi de $(1,20 \pm 0,021) \times 10^{-3}$ mM/s. A partir deste valor calculou-se a atividade específica da CAL B obtendo-se o valor de $(7,50 \pm 0,331) \times 10^{-3}$ U/mg-proteína.

3.2. Ensaio com CAL B imobilizada

Depois de determinada a atividade da enzima livre, realizaram-se os ensaios de imobilização da CAL B por adsorção e por ligação covalente aos diferentes suportes: micropartículas de titanossilicato AM-1 e celulose bacteriana. A quantidade de enzima imobilizada e a respetiva atividade foram determinadas.

3.2.1. Titanossilicato AM-1 como suporte de imobilização

3.2.1.1 Imobilização por adsorção

Para estudar a imobilização da CAL B por adsorção realizaram-se 4 ensaios em que se estudou tempo de imobilização e a concentração de CAL B inicial, como se apresenta na Tabela 2. Todos os ensaios foram realizados para uma massa de suporte de 0,0280 g.

Tabela 2 – Resultados obtidos nos ensaios de imobilização por adsorção em titanossilicato AM-1.

Ensaio	Tempo de imobilização (h)	Absorvência $\pm 0,001$	[Enzima em solução] (mg/mL)	[Enzima] ₀ (mg/mL)	[Enzima Imobilizada] (mg/mL)	η_r (%)
1	7,5	0,382	2,04	4,03	1,99	49,3
2	7,5	0,379	4,06	7,97	3,91	49,1
3	8,0	0,333	1,74	4,00	2,26	56,5
4	16,0	0,359	1,90	3,84	1,94	50,4

Comparando os ensaios efetuados durante 7,5 h mas com duas concentrações diferentes de enzima inicial, 4,03 mg/mL e 7,97 mg/mL, verificou-se que o rendimento final foi muito semelhante, 49,3 % e 49,1 %, embora a quantidade de enzima imobilizada, no ensaio 2 fosse uma quantidade maior. A alteração do tempo de imobilização de 7,5 h para 8 h, resultou num aumento do rendimento de imobilização para 56,5%. No entanto este aumento do rendimento com tempo de imobilização não se confirmou quando se aumentou o tempo para 16h, tendo-se obtido um valor de 50,4%.

De seguida determinou-se a atividade da CAL B imobilizada por adsorção em AM-1. O suporte-enzima utilizado para a determinação da atividade da CAL B corresponde à enzima imobilizada em AM-1 indicada no ensaio 2 da Tabela 2. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente (24°C), a um pH 7,0, com agitação e as absorvências foram lidas a 410 nm. É de notar que estas condições foram as mesmas para todos os ensaios realizados para a determinação da atividade da CAL B livre ou imobilizada. Os resultados obtidos apresentam-se na Figura 13, o ensaio decorreu durante 55 minutos até a concentração se manter aproximadamente constante, indicando que a reação terminou. Aos valores de concentração de p-NP até aos 35 minutos foi ajustada uma reta de modo a calcular a velocidade de reação.

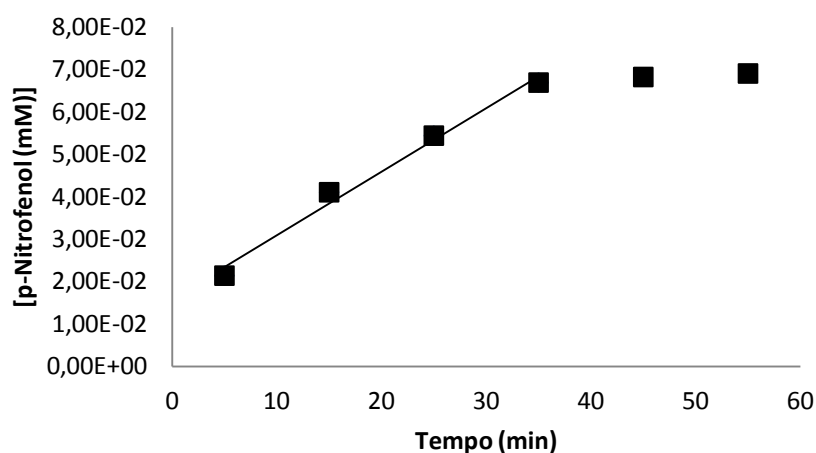


Figura 13 - Variação da concentração de p-NP durante a reação catalisada pela CAL B imobilizada por adsorção em titanossilicato AM-1.

O ajuste linear obtido foi o seguinte:

$$[p - NP] = (1,50 \pm 0,120) \times 10^{-3} \times t + (1,59 \pm 0,274) \times 10^{-2} \quad (13)$$

$$R^2=0,9874$$

O declive da reta corresponde à velocidade inicial da reação enzimática e o seu valor foi de $(1,50 \pm 0,120) \times 10^{-3}$ mM/min. A partir deste valor calculou-se a atividade da CAL B obtendo-se o valor de $(2,68 \pm 0,232) \times 10^{-1}$ U/g-suporte e também a atividade específica obtendo-se o valor de $(3,84 \pm 0,732) \times 10^{-4}$ U/mg-proteína.

Assim como se estudou a quantidade de enzima adsorvida, também se estudou a quantidade de enzima que é dessorvida das partículas de AM-1, pois a dessorção é um dos principais problemas desta técnica de imobilização. Além disso, os valores de atividade obtidos foram inferiores aos valores de atividade obtidos para a enzima imobilizada por ligação covalente sendo a quantidade de enzima imobilizada praticamente a mesma, 49,1% para a enzima imobilizada por adsorção e 52,4 % para a enzima imobilizada por ligação covalente. Como foi referido na secção 1.2.1.1, um dos problemas da técnica de imobilização por ligação covalente é que muitas vezes a enzima perde atividade ou pode mesmo ficar inativa durante a imobilização.

Na Tabela 3, estão apresentados os resultados obtidos para um ensaio, em que se verificou a quantidade de enzima que foi desorvida após a lavagem as partículas de AM-1 com CAL B imobilizada por adsorção.

Tabela 3 – Resultados da quantidade de CAL B desorvida das partículas de AM-1.

	V _{solução} (mL)	Absorvência ±0,001	[Enzima] ₀ (mg/mL)	[Enzima em solução] (mg/mL)	[Enzima imobilizada] (mg/mL)
Solução enzimática	5,0	0,381	3,84	2,04	1,80
1ª Lavagem	5,0	0,375		$2,50 \times 10^{-1}$	1,55
2ª Lavagem	5,0	0,244		$1,51 \times 10^{-1}$	1,40
3ª Lavagem	5,0	0,160		$9,15 \times 10^{-2}$	1,31

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3, verificou-se que durante a lavagem do suporte ocorria a desorção de CAL B. Inicialmente a concentração de CAL B imobilizada era 1,80 mg/mL e no final das lavagens a concentração foi de 1,31 mg/mL. Isto corresponde a uma perda de massa de CAL B de 27,2 %.

A ocorrência de desorção da enzima é um problema frequentemente discutido na literatura. Knezevic e Obradovic (2004) imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* a uma membrana de fibra oca hifrofílica por adsorção e verificaram uma perda de massa de 60% [76]. Lu et al. (2012) imobilizaram a lipase de *Candida sp. 99-125* numa membrana têxtil e verificou-se que a principal causa da perda de atividade da enzima era a desorção desta quando o meio de reação era aquoso [77]. A desorção foi minimizada, quando utilizaram um meio de reação hidrofóbico.

3.2.1.2 Imobilização de CAL B por ligação covalente

A imobilização por ligação covalente, como foi mencionado na revisão bibliográfica, é outra técnica utilizada para a imobilização de enzimas, por isso aplicou-se esta técnica para imobilizar a CAL B às partículas de titanossilicato AM-1. Para isso, realizaram-se 4 ensaios em que se testou a influência do tempo de imobilização e a concentração da enzima em solução. Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados da quantidade de enzima imobilizada e eficiência do processo de imobilização por ligação covalente a partículas de AM-1

Ensaio	Tempo de imobilização (h)	Absorvência $\pm 0,001$	[Enzima em solução] (mg/mL)	[Enzima] ₀ (mg/mL)	[Enzima Imobilizada] (mg/mL)	η_I (%)
1	15,0	0,358	3,79	7,97	4,18	52,4
2	16,0	0,365	1,94	4,03	2,09	51,9
3	24,0	0,319	1,65	4,03	2,38	59,0

Comparando os ensaios, 2 e 3, efetuados durante 16,0 h e 24,0 h mas com a mesma concentração de enzima inicial, 4,03 mg/mL, verificou-se um aumento de 7,1 % do rendimento de imobilização em oito horas. Comparando os ensaios, 1 e 2, efetuados durante 15,0 h e 16,0 h com concentrações de enzima inicial de 7,97 mg/mL e 4,03 mg/mL, respectivamente, verificou-se que o rendimento de imobilização praticamente não se alterou.

Comparando com o valor obtido por Mugo *et al.* imobilizando CAL B numa fibra microporosa de sílica, 5,62 mg/mL, após 24 h de reação verifica-se que os resultados obtidos experimentalmente foram inferiores [5]. Isso pode justificar-se com a diferença entre os suportes utilizados na imobilização. Ambos os suportes contêm grupos silanol para que se realize a imobilização covalente mas não significa que estejam na mesma proporção em ambos os suportes.

De seguida determinou-se a atividade da CAL B imobilizada por ligação covalente nas partículas de AM-1. O suporte-enzima utilizado para a determinação da atividade da CAL B corresponde à enzima imobilizada em AM-1 indicada no ensaio 1 da Tabela 4. As condições de operação deste ensaio são as mesmas utilizadas nos ensaios anteriores. Os resultados obtidos apresentam-se na Figura 14. O ensaio decorreu durante 45 minutos até a absorvência se manter aproximadamente constante, indicando que a reação terminou. Aos valores de concentração de p-NP até aos 25 minutos foi ajustada uma reta de modo a calcular a velocidade de reação.

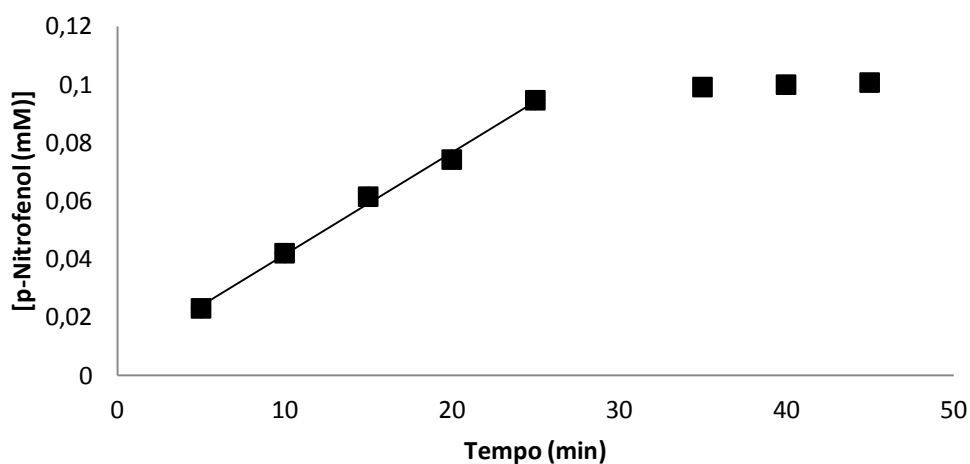


Figura 14 – Variação da concentração de p-NP durante a reação catalisada pela CAL B imobilizada por ligação covalente em titanossilicato AM-1.

O ajuste linear obtido foi o seguinte:

$$[p - NP] = (3,50 \pm 0,130) \times 10^{-3} \times t + (6,60 \pm 2,404) \times 10^{-3} \quad (14)$$

$$R^2=0,9959$$

O declive da reta corresponde à velocidade inicial da reação enzimática e o seu valor foi de $(3,50 \pm 0,130) \times 10^{-3}$ mM/min. A partir deste valor calculou-se a atividade da CAL B obtendo-se o valor de $(6,25 \pm 0,273) \times 10^{-1}$ U/g-suporte e também a atividade específica obtendo-se o valor de $(8,38 \pm 1,377) \times 10^{-4}$ U/mg-proteína.

Para comprovar que a hidrólise do p-NPB não era influenciada de forma significativa pelas partículas de AM-1 realizou-se um ensaio apenas com as partículas de AM-1 sem enzimas. Na Figura 15 estão representados os dados obtidos para as quatro reações, reação apenas com as partículas de AM-1, reação com a enzima imobilizada por adsorção, por ligação covalente e a reação com a enzima livre.

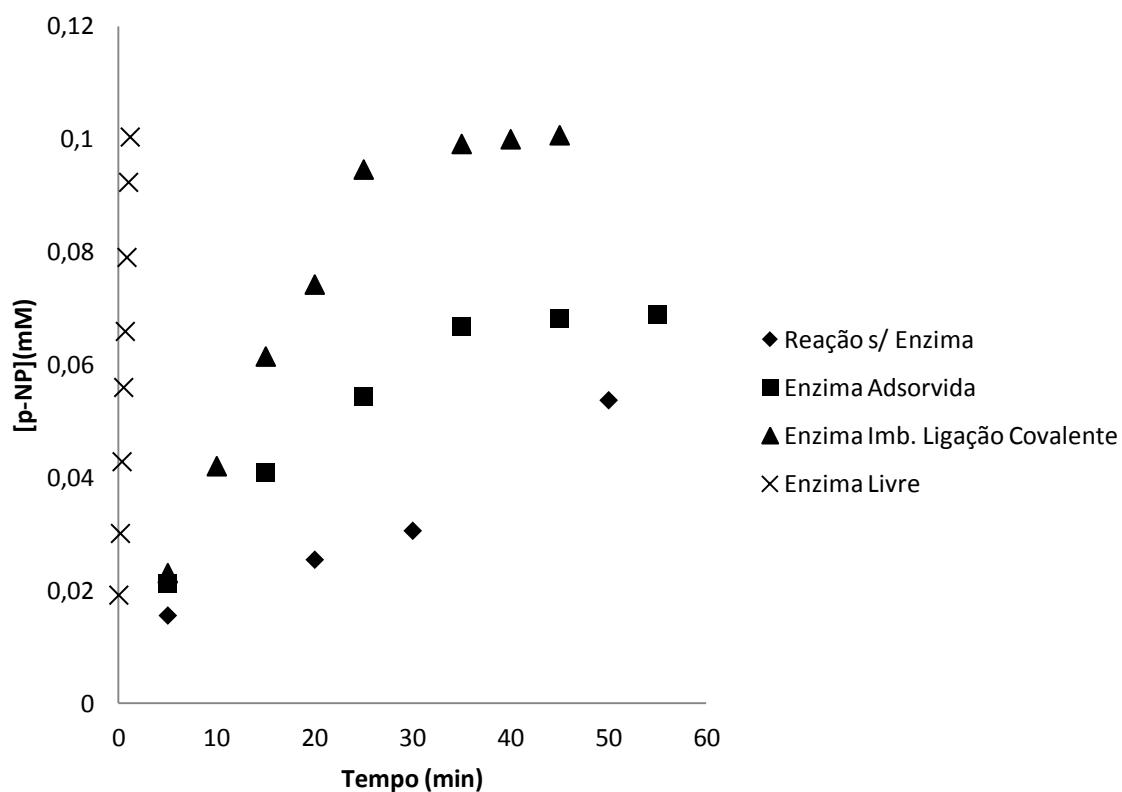


Figura 15 – Variação da concentração de p-NP para as diferentes reações em que se utilizou CAL B immobilizada no suporte AM-1.

A partir dos dados apresentados na Figura 15, verificou-se que a reação sem enzima foi muito mais lenta quando comparada com as reações na presença da CAL B. A morfologia dos microcristais de AM-1 foi analisada por SEM, antes e depois da imobilização, e é apresentada na Figura 16.

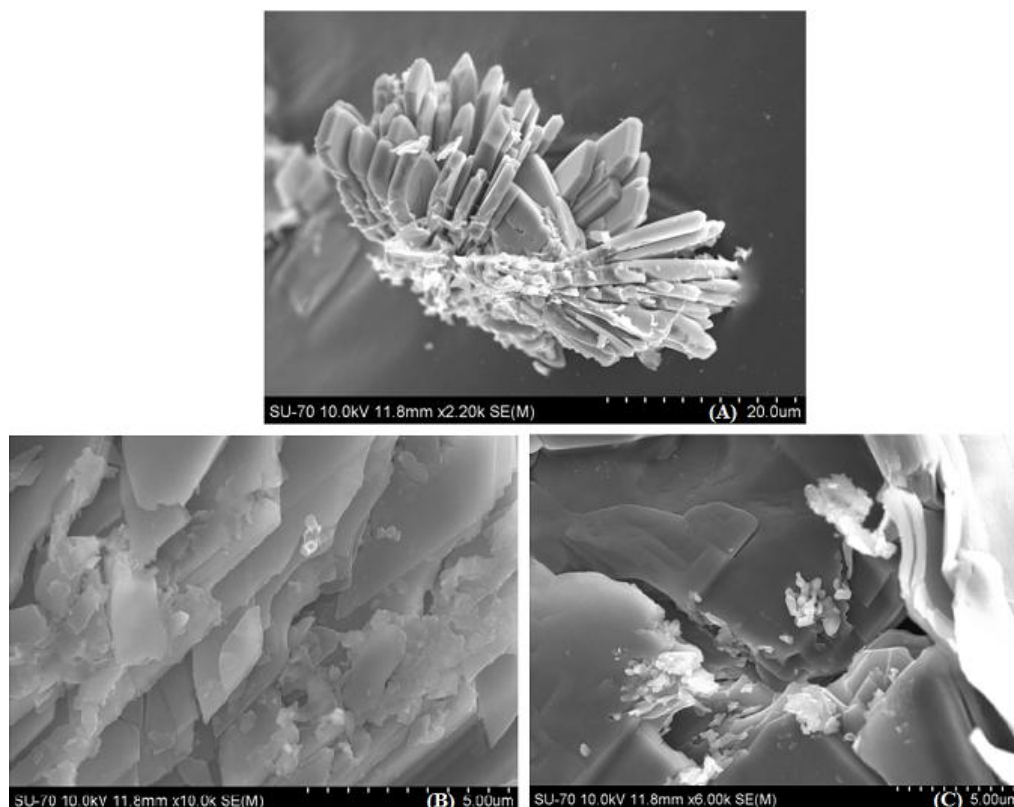


Figura 16 - Análise SEM ao AM-1: (A) Antes da imobilização, (B) Depois da imobilização de CAL B por adsorção e (C) Depois da imobilização de CAL B por ligação covalente.

Na Figura 16 (A) verificou-se que este é lamelar como já foi referido anteriormente, e na Figura 16 (B) e (C) verificou-se a estrutura após a imobilização da enzima, sendo assim, a enzima é imobilizada à superfície do suporte pois este não é poroso.

3.2.2. Celulose bacteriana como suporte de imobilização

3.2.2.1 Imobilização por adsorção

Para a imobilização da CAL B por adsorção, na celulose bacteriana, realizaram-se 2 ensaios para analisar o rendimento de imobilização com a variação do tempo de imobilização como se apresenta na Tabela 5. Os ensaios foram todos realizados com uma massa de suporte de 0,0280 g.

Tabela 5 - Quantidade de enzima adsorvida e rendimento de processo de imobilização em celulose bacteriana.

Ensaio	Tempo de imobilização (h)	Absorvência $\pm 0,001$	[Enzima em solução] (mg/mL)	[Enzima]0 (mg/mL)	[Enzima Imobilizada] (mg/mL)	ηI (%)
1	3,0	0,625	0,954	2,02	1,06	52,7
2	18,0	0,594	0,900	2,02	1,12	55,3

Para o primeiro ensaio, retirou-se amostras da solução enzimática após 3,0 h e obteve-se rendimento de imobilização de 52,7 %. No segundo ensaio, retirou-se amostras da solução enzimática após 18,0 h e obteve-se um rendimento de 55,3 %. Ou seja o prolongamento do tempo de imobilização não conduziu a um aumento significativo do rendimento do processo, indicando que 3 h é o tempo suficiente para que a adsorção ocorra de forma eficiente.

No seguimento do trabalho determinou-se a atividade da CAL B imobilizada por adsorção na celulose bacteriana para o ensaio 1 da Tabela 5. Como já foi referido anteriormente as condições de operação para a determinação da CAL B imobilizada foram as mesmas utilizadas para os ensaios anteriores. Os resultados obtidos apresentam-se na Figura 17. O ensaio decorreu durante 65 minutos até a concentração se manter aproximadamente constante, indicando o final da reação. Aos valores de concentração de p-NP até aos 55 minutos foi ajustada uma reta de modo a calcular a velocidade de reação.

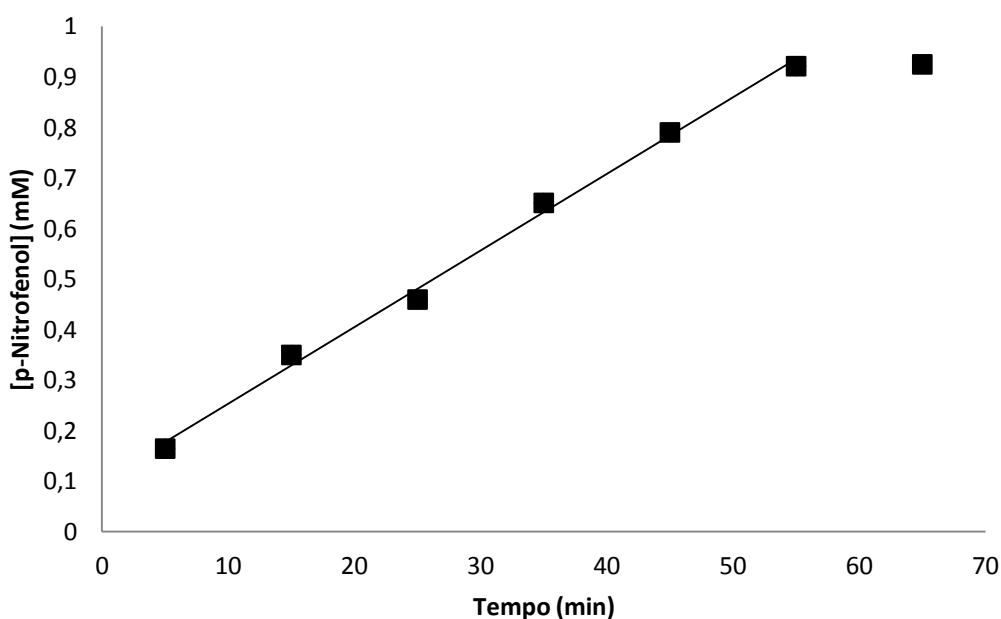


Figura 17 – Variação da concentração de p-NP durante a reação catalisada pela CAL B imobilizada por adsorção em celulose bacteriana.

O ajuste linear obtido foi o seguinte:

$$[p - NP] = (1,51 \pm 0,048) \times 10^{-2} \times t + (0,10 \pm 0,016) \quad (15)$$

$$R^2=0,996$$

O declive da reta corresponde à velocidade inicial da reação enzimática e o seu valor foi de $(1,51 \pm 0,048) \times 10^{-2}$ mM/min. A partir deste valor calculou-se a atividade da CAL B obtendo-se o valor de $3,24 \pm 0,141$ U/g-suporte e também a atividade específica obtendo-se o valor de $(8,53 \pm 1,393) \times 10^{-3}$ U/mg-proteína.

Tal como foi efetuado para as partículas de AM-1, também se estudou a possibilidade de ocorrer dessorção da CAL B da celulose bacteriana. Na Tabela 6 apresentam-se os dados obtidos para um ensaio, em que se verificou a quantidade de enzima que foi dessorvida sempre que a celulose bacteriana foi lavada após a imobilização da CAL B.

Tabela 6 – Resultados da quantidade de CAL B desorvida da celulose bacteriana.

	V _{solução} (mL)	Absorvência ± 0,001	[Enzima] ₀ (mg/mL)	[Enzima em solução] (mg/mL)	[Enzima imobilizada] (mg/mL)
Solução enzimática	5	0,366	3,84	1,95	1,89
1ª Lavagem	5	0,340		$2,23 \times 10^{-1}$	1,67
2ª Lavagem	5	0,177		$1,03 \times 10^{-1}$	1,57
3ª Lavagem	5	0,125		$6,83 \times 10^{-2}$	1,50

A partir dos resultados apresentados na Tabela 6, verificou-se que durante a lavagem do suporte ocorria a desorção de CAL B. Inicialmente a concentração de CAL B imobilizada era 1,89 mg/mL e no final das lavagens a concentração foi de 1,50 mg/mL. Isto corresponde a uma perda de massa de CAL B de 20,6 %. É uma perda de massa um pouco inferior à perda verificada nas partículas de AM-1 mas que influencia de forma significativa a perda de atividade da CAL B.

3.2.2.2 Imobilização de CAL B por ligação covalente

Para a imobilização da CAL B por ligação covalente, na celulose bacteriana, realizou-se um ensaio para analisar o rendimento de imobilização com a variação do tempo de imobilização, Tabela 7. Todos os ensaios foram realizados com uma massa de celulose bacteriana de 0,0280 g.

Tabela 7 – Resultados da quantidade de enzima imobilizada e rendimento do processo de imobilização por ligação covalente à celulose bacteriana.

Ensaio	Tempo de imobilização (h)	Absorvência ± 0,001	[Enzima em solução] (mg/mL)	[Enzima] ₀ (mg/mL)	[Enzima Imobilizada] (mg/mL)	η_I (%)
1	3,0	0,791	1,25	2,02	0,77	38,0
2	18,0	0,799	1,26	2,02	0,75	37,3

A partir dos resultados apresentados na Tabela 7, verificou-se que o rendimento de imobilização foi de 38,0 % e 37,3 % para 3,0 h e 18,0 h, respectivamente. Com o aumento

do tempo de imobilização de 15,0 h o rendimento diminuiu 0,7 %, verificando-se que 3h é o tempo suficiente para que o processo decorra.

No seguimento do trabalho determinou-se a atividade da CAL B imobilizada por ligação covalente na celulose bacteriana para as mesmas condições de operação referidas anteriormente. O suporte-enzima utilizado para a determinação da atividade da CAL B corresponde à enzima imobilizada em celulose bacteriana indicada no ensaio 1 da Tabela 7. Os resultados obtidos apresentam-se na Figura 18, o ensaio decorreu durante 55 minutos até a absorvência se manter aproximadamente constante, indicando que a reação terminou. Aos valores de concentração de p-NP até aos 45 minutos foi ajustada uma reta de modo a calcular a velocidade de reação.

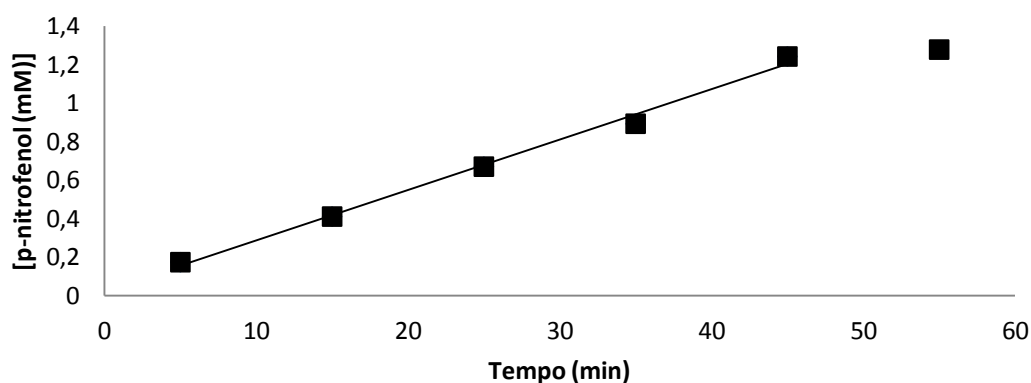


Figura 18 - Variação da concentração do p-NP durante da reação catalisada pela CAL B imobilizada por ligação covalente em celulose bacteriana.

O ajuste linear obtido foi o seguinte:

$$[p - NP] = (2,62 \pm 0,120) \times 10^{-2} \times t + (2,32 \pm 0,346) \times 10^{-2} \quad (16)$$

$$R^2=0,9937$$

O declive da reta corresponde à velocidade inicial da reação enzimática e o seu valor foi de $(2,62 \pm 0,120) \times 10^{-2}$ mM/min. A partir deste valor calculou-se a atividade da CAL B obtendo-se o valor de $5,61 \pm 0,325$ U/g-suporte e também a atividade específica obtendo-se o valor de $(2,09 \pm 0,613) \times 10^{-2}$ U/mg-proteína.

A morfologia da celulose bacteriana foi analisada por SEM, antes e depois da imobilização, e é apresentada na Figura 19, e verificou-se que as enzimas se alojam entre as fibras de celulose.

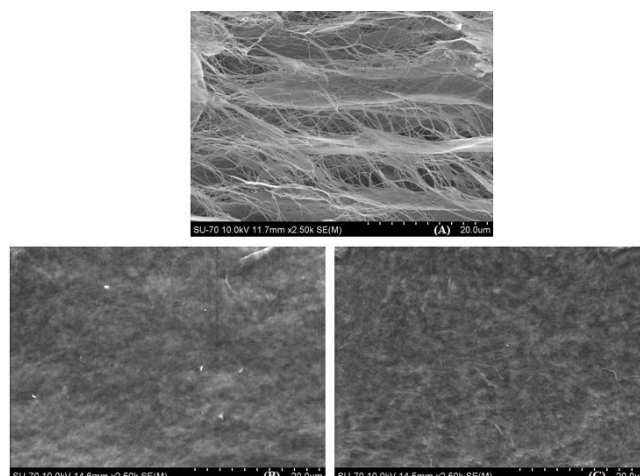


Figura 19 - Análise SEM à celulose bacteriana: (A) antes da imobilização, (B) depois da imobilização de CAL B por adsorção e (C) depois da imobilização de CAL B por ligação covalente.

3.2.3. Comparação dos resultados obtidos para os diferentes suportes

De modo a comparar os diferentes suportes de imobilização, os valores de atividade obtidos ao longo do presente trabalho apresentam-se na Tabela 8. Todos os ensaios foram realizados com a mesma massa de suporte, 0,0280 g.

Tabela 8 – Resultados de atividade e atividade específica da lipase para os diferentes ensaios.

Técnica de imobilização	Suporte de imobilização	$m_{\text{CAL B}}$ (mg)	U ($\mu\text{mol p-NP}/\text{min}$)	U/g-suporte	U/mg-proteína
Adsorção	AM-1	$19,5 \pm 2,11$	$(7,50 \pm 0,622) \times 10^{-3}$	$(2,68 \pm 0,232) \times 10^{-1}$	$(3,84 \pm 0,732) \times 10^{-4}$
	Celulose Bacteriana	$10,6 \pm 1,31$	$(9,06 \pm 0,363) \times 10^{-2}$	$3,24 \pm 0,141$	$(8,53 \pm 1,393) \times 10^{-3}$
Ligação Covalente	AM-1	$20,9 \pm 2,60$	$(1,75 \pm 0,071) \times 10^{-2}$	$(6,25 \pm 0,273) \times 10^{-1}$	$(8,38 \pm 1,377) \times 10^{-4}$
	Celulose Bacteriana	$7,52 \pm 1,796$	$(1,57 \pm 0,085) \times 10^{-1}$	$5,61 \pm 0,325$	$(2,09 \pm 0,613) \times 10^{-2}$
Enzima Livre		$24,0 \pm 0,48$	$(1,80 \pm 0,043) \times 10^{-1}$		$(7,50 \pm 0,331) \times 10^{-3}$

A partir dos dados apresentados na Tabela 8, comparando a atividade específica da CAL B imobilizada com a da enzima livre, verificou-se que CAL B imobilizada tanto por adsorção como por ligação covalente em partículas de AM-1 perdeu atividade específica cerca de 88% relativamente à enzima livre. No caso da CAL B imobilizada na celulose

bacteriana por adsorção, a atividade específica aumentou em cerca de 13%, e no caso da enzima imobilizada por ligação covalente cerca de 3 vezes superior ao valor determinado para a enzima livre. Através destes dados verificou-se que a celulose bacteriana é um suporte de imobilização com melhores características para reter a atividade da CAL B que o titanossilicato AM-1. A celulose bacteriana tem um carácter hidrofílico e desta forma a afinidade com a enzima é elevada. Além disso como é constituída por microfibras possui microambientes que retêm a atividade da enzima [78].

Comparando a atividade específica obtida após a aplicação das duas técnicas de imobilização, a imobilização em AM-1, por ligação covalente teve uma atividade 2,2 vezes superior à atividade da enzima adsorvida. No caso da celulose bacteriana esta tendência, da atividade específica da enzima imobilizada por ligação covalente ser superior à atividade da enzima adsorvida, também se verificou, e neste caso correspondeu a um valor 2,4 vezes superior.

Os resultados obtidos por Cunha *et al* (2008), em que a CAL B imobilizada em agarose por adsorção apresentou uma atividade (U/g-suporte) elevada e quando foi imobilizada por ligação covalente perdeu praticamente toda a atividade [28].

A menor atividade específica da CAL B imobilizada por adsorção pode ter resultado da ocorrência de dessorção da enzima. Este problema foi estudado para os dois suportes de imobilização e verificou-se que a quantidade de massa de CAL B dessorvida foi de 27,3 % para o AM-1 e 20,6 % para a celulose bacteriana. Estes valores mostraram ser significantes. Sendo assim, a atividade específica apresentada para a enzima imobilizada por adsorção não é a atividade real devido à dessorção das enzimas, pois esse facto não foi contabilizado quando se calculou a massa de enzima imobilizada.

Por outro lado, no caso da ligação covalente é necessário ter em atenção que alguma quantidade de enzima pode ter sido adsorvida pelo suporte além da que se ligou covalentemente e portanto neste caso pode existir um efeito duplo, o que pode justificar o melhor desempenho.

Na literatura ainda não existem registos de imobilização de CAL B no titanossilicato AM-1, nem em titanossilicatos similares. Desta forma comparou-se os resultados da atividade de CAL B imobilizada por ligação covalente com resultados obtidos pela mesma enzima imobilizada por ligação covalente numa fibra ótica microestruturada de sílica [5]. O procedimento de imobilização utilizado em ambos os casos foi o mesmo, assim como as

condições de operação para a determinação da atividade da CALB. Relativamente à quantidade de CAL B imobilizada em ambos os suportes, já foi discutido na seção 3.2.1.2 e verificou-se que a quantidade de CAL B imobilizada por ligação covalente em titanossilicato AM-1 foi inferior. A atividade específica da CAL B relatada por Mugo et al. (2010) foi $6,54 \times 10^{-3}$ U/mg-proteína. Este valor é 8 vezes superior ao valor obtido para a CAL B imobilizada por ligação covalente em AM-1.

He et al. (2010) estudaram a imobilização da CAL B por adsorção em monólitos de sílica [64]. A imobilização foi realizada a 4°C durante uma hora com um tampão de pH 7 e concentração 0,05 M. O estudo da atividade foi realizado à temperatura de 25°C. Utilizou-se uma solução de substrato (p-NPB) de 1 mM dissolvido numa solução de decano e tampão (0,05 M e pH 7). A atividade da CAL B imobilizada por He et al. (2010) foi determinada em função da conversão do p-nitrofenil butirato (p-NPB). A conversão é dada por: $\frac{C_p}{C_0} \times 100$, onde C_p é a concentração de p-nitrofenol e C_0 é a concentração de p-NPB. Então a conversão obtida para 16 minutos foi $96 \pm 4,5$ % para 3,6 mg de CAL B imobilizada. Calculou-se este valor também para a CAL B imobilizada em AM-1 e a conversão obtida para 16 minutos foi $1,17 \pm 0,116$ % para $19,5 \pm 2,11$ mg de CAL B. É de notar que este valor de quantidade de enzima imobilizada não é o valor real pois a quantidade de enzima desorvida não foi contabilizada.

Huang et al. (2011) estudaram a imobilização covalente lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulose [47]. O ensaio para a determinação da atividade da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulose, foi realizado a 30,8 °C. O p-nitrofenil palmitato, 14,4 mM, foi diluído em etanol e em tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,1). A atividade obtida para a lipase de *Candida rugosa* foi 29,6 U/g-suporte. Para a CAL B imobilizada por ligação covalente em celulose bacteriana, a atividade obtida foi de $5,6 \pm 0,32$ U/g-suporte. Este valor foi 5 vezes inferior ao valor obtido pela literatura, mas além da enzima não ser a mesma, o substrato utilizado para a determinação da atividade enzimática também foi diferente.

4. Conclusões e Trabalho Futuro

A CAL B imobilizada tanto por adsorção como por ligação covalente no titanossilicato AM-1 perdeu atividade específica numa percentagem superior a 88% relativamente à enzima livre. Já no caso da CAL B imobilizada na celulose bacteriana por adsorção, a atividade específica aumentou em cerca de 13%, e no caso desta imobilizada por ligação covalente na celulose bacteriana a atividade específica foi cerca de 3 vezes superior à atividade específica da enzima livre. Conclui-se então que a celulose bacteriana é um suporte de imobilização mais eficiente que o titanossilicato AM-1 para estas condições de operação.

No caso da imobilização em AM-1, a CAL B imobilizada por ligação covalente apresentou uma atividade 2,2 vezes superior à atividade da enzima adsorvida. Relativamente à celulose bacteriana a atividade foi 2,4 vezes superior. Esta diferença terá resultado não só do facto de ocorrer dessorção de enzima, levando a uma perda significativa de atividade enzimática, mas também ao facto de poder ocorrer alguma adsorção durante o processo de formação de ligação covalente.

Assim como foi referido no capítulo 1, um dos benefícios de se utilizar os microrreatores é que estes utilizam volumes de reação na ordem dos microlitros. É de referir que todo o procedimento de imobilização e de determinação da atividade foi realizado e conseguido com volumes de reação pequenos, no máximo 5 mL, e as quantidades de suporte de imobilização foram de 0,028 g. Desta forma conclui-se que este procedimento pode ser aplicado num microrreator com alguma facilidade.

Concluindo, o titanossilicato AM-1 pode ser utilizado na produção de microrreatores para a imobilização de enzimas, pois imobilizou-se a CAL B. Contudo devem-se realizar estudos com outros métodos de imobilização para a otimização da atividade da CAL B. Relativamente à celulose bacteriana concluiu-se que este é um suporte de imobilização muito promissor para a aplicação em microrreatores, pois este suporte mostrou ser um bom suporte de imobilização para a CAL B retendo a sua atividade catalítica.

Adicionalmente podem deixar-se algumas sugestões para trabalhos futuros:

- Realizar um estudo para a determinação da constante catalítica e a constante de Michaelis-Mentem da CAL B, de forma a perceber pormenores do mecanismo catalítico;
- Estudar a imobilização da CAL B, por outras técnicas, em titanossilicato AM-1 e em celulose bacteriana de forma a colmatar o problema de dessorção que se verificou neste estudo;
- Construção de um microrreator membrana de celulose bacteriana para estudar a produção de compostos que sejam uma mais-valia para a indústria e realizar uma avaliação a nível económico. Por exemplo, o estudo pode ser realizado para a produção do laurato de butilo, um aroma muito utilizado na indústria alimentar.
- Utilização de outro reagente bifuncional, além do glutaraldeído, para ativar o titanossilicato AM-1 para a imobilização, como por exemplo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).

5. Bibliografia

1. Wiles, C.;Watts, P. - Recent advances in micro reaction technology. *Chemical Communications*. Vol. 47, n.º 23 (2011), p. 6512-6535.
2. Barrow, D. - Properties and Use of Microreactors. In: WIRTH, T. - *Microreactors in Organic Synthesis and Catalysis*. Germany: Wiley-VCH, 2008,
3. Marques, M. P. C.;Fernandes, P. - *Microfluidic Devices: Useful Tools for Bioprocess Intensification*. *Molecules*. Vol. 16 (2011), p. 8368-8401.
4. Bolivar, J. M.;Wiesbauer, J.;Nidetzky, B. - Biotransformations in microstructured reactors: more than flowing with the stream? *Trends in Biotechnology*. Vol. 29, n.º 7 (2011), p. 333-342.
5. Mugo, S. M.;Ayton, K. - Lipase immobilized microstructured fiber based flow-through microreactor for facile lipid transformations. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*. Vol. 67, n.º 3-4 (2010), p. 202-207.
6. Ostafin, A.;Landfester, K. - *Nanoreactor Engineering for Life Sciences and Medicine*. Artech House, 2009.
7. Chen, R. J.;Zhang, Y. G.;Wang, D. W.;Dai, H. J. - Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 123, n.º 16 (2001), p. 3838-3839.
8. Xie, T.;Wang, A. M.;Huang, L. F.;Li, H. F.;Chen, Z. M.;Wang, Q. Y.;Yin, X. P. - Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 8, n.º 19 (2009), p. 4724-4733.
9. Watts, P.;Haswell, S. J. - The application of microreactors for small scale organic synthesis. *Chemical Engineering & Technology*. Vol. 28, n.º 3 (2005), p. 290-301.
10. Miyazaki, M.;Honda, T.;Yamaguchi, H.;Briones, M. P. P.;Maeda, H. - *Enzymatic Processing in Microfluidic Reactors*. In: HARDING, S.E.;TOMBS, M.P. - *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Vol 25. Loughborough: Nottingham University Press, 2008, p. 405-428.
11. Marre, S.;Jensen, K. F. - Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems. *Chemical Society Reviews*. Vol. 39, n.º 3 (2010), p. 1183-1202.
12. Matosevic, S.;Szita, N.;Baganz, F. - Fundamentals and applications of immobilized microfluidic enzymatic reactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Vol. 86, n.º 3 (2011), p. 325-334.
13. Hu, G.;Li, D. - Multiscale phenomena in microfluidics and nanofluidics. *Chemical Engineering Science*. Vol. 62, n.º 13 (2007), p. 3443-3454.
14. de Boer, A. R.;Bruyneel, B.;Krabbe, J. G.;Lingeman, H.;Niessen, W. M. A.;Irtsh, H. - A microfluidic-based enzymatic assay for bioactivity screening combined with capillary liquid chromatography and mass spectrometry. *Lab on a Chip*. Vol. 5, n.º 11 (2005), p. 1286-1292.
15. Vittorio, S. A. - *MicroElectroMechanical Systems (MEMS)* [em linha]. [Consult. Disponível em WWW:<[URL:http://www.csa.com/discoveryguides/mems/overview.php](http://www.csa.com/discoveryguides/mems/overview.php)>].
16. Fonseca, M. M.;Teixeira, J. A. - *Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações*. Lisboa, 2007.
17. Koch, K.;Rutjes, F. P. J. T.;Hest, J. C. M. - *Bioorganic Reactions*. In: WIRTH, T. - *Microreactors in Organic Synthesis and Catalysis*. Germany: Wiley-VCH, 2008,
18. Richter, T.;Shultz-Lockyear, L. L.;Oleschuk, R. D.;Bilitewski, U.;Harrison, D. J. - *Bi-enzymatic and capillary electrophoretic analysis of non-fluorescent compounds*

- in microfluidic devices - Determination of xanthine. *Sensors and Actuators B-Chemical*. Vol. 81, n.º 2-3 (2002), p. 369-376.
19. Matsui, K.;Kawaji, I.;Utsumi, Y.;Ukita, Y.;Asano, T.;Takeo, M.;Kato, D.;Negoro, S. - Immunoassay using microfluid filters constructed by deep X-ray lithography. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. Vol. 71, n.º 12 (2007), p. 3098-3101.
 20. Saibi, W.;Abdeljalil, S.;Masmoudi, K.;Gargouri, A. - Biocatalysts: Beautiful creatures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 426, n.º 3 (2012), p. 289-293.
 21. Cabral, J. M. S.;Aires-Barros, M. R.;Gama, M. - *Egenharia Enzimática*. Lisboa: Lidel, 2003.
 22. Aehle, W. - *Enzymes in Industry: Production and Applications*. 2nd completely rev. ed. Weinheim, 2004.
 23. Brena, B. M.;Batista-Viera, F. - Immobilization of Enzymes. In: GUI SAN, J.M. - *Immobilization of Enzymes and Cells*. United States of America: 2006, p. 15-30.
 24. Vong, T.;Schoffelen, S.;van Dongen, S. F. M.;van Beek, T. A.;Zuilhof, H.;van Hest, J. C. M. - A DNA-based strategy for dynamic positional enzyme immobilization inside fused silica microchannels. *Chemical Science*. Vol. 2, n.º 7 (2011), p. 1278-1285.
 25. Lee, C. H.;Lin, T. S.;Mou, C. Y. - Mesoporous materials for encapsulating enzymes. *Nano Today*. Vol. 4, n.º 2 (2009), p. 165-179.
 26. Górecka, E.;Jastrzebska, M. - Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology and Food Science*. Vol. 75, n.º 1 (2011), p. 65-86.
 27. Anuar, S. T.;Villegas, C.;Mugo, S. M.;Curtis, J. M. - The Development of Flow-through Bio-Catalyst Microreactors from Silica Micro Structured Fibers for Lipid Transformations. *Lipids*. Vol. 46, n.º 6 (2011), p. 545-555.
 28. Cunha, A. G.;Fernandez-Lorente, G.;Bevilaqua, J. V.;Destain, J.;Paiva, L. M. C.;Freire, D. M. G.;Fernandez-Lafuente, R.;Guisan, J. M. - Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase-a comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 146, n.º 1-3 (2008), p. 49-56.
 29. Taylor, R. F. - *Protein Immobilization: Fundamentals and Applications*. 1ª. Marcel Dekker, 1991.
 30. Tischer, W.;Wedekind, F. - Immobilized Enzymes: Methods and Applications. In: FESSNER, W.-D. [et al.] - *Biocatalysis - From Discovery to Application*. Springer Berlin Heidelberg, 1999, p. 95-126.
 31. Sheldon, R. A. - Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*. Vol. 349, n.º 8-9 (2007), p. 1289-1307.
 32. Campàs, M.;Marty, J. - Encapsulation of enzymes using polymers and sol-gel techniques. In: GUI SAN, J.M. - *Immobilization of Enzymes and Cells*. Humana press, 2006, p. 77-85.
 33. Silva, R. L. F. O. B.;Souza, R. R.;Santana, J. C. C.;Tambourgi, E. B. - Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Vol. 28, n.º 3 (2008), p. 642-648.
 34. Carvalho, C. M. L.;Cabral, J. M. S. - Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochimie*. Vol. 82, n.º 11 (2000), p. 1063-1085.
 35. Hegedus, L.;Nagy, E. - Comparison of the structure and the stability of single enzyme nanoparticles. *Hungarian journal of industrial chemistry* Vol. 37, n.º 2 (2009), p. 123-130.

36. Tanaka, Y.;Tsuruda, Y.;Nishi, M.;Kamiya, N.;Goto, M. - Exploring enzymatic catalysis at a solid surface: a case study with transglutaminase-mediated protein immobilization. *Organic & Biomolecular Chemistry*. Vol. 5, n.º 11 (2007), p. 1764-1770.
37. Wang, A.;Wang, H.;Zhu, S.;Zhou, C.;Du, Z.;Shen, S. - An efficient immobilizing technique of penicillin acylase with combining mesocellular silica foams support and p-benzoquinone cross linker. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Vol. 31, n.º 5 (2008), p. 509-517.
38. Serralha, F. N.;Lopes, J. M.;Lemos, F.;Prazeres, D. M. F.;Aires-Barros, M. R.;Cabral, J. M. S.;Ramôa Ribeiro, F. - Zeolites as supports for an enzymatic alcoholysis reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol. 4, n.º 5-6 (1998), p. 303-311.
39. de Vasconcellos, A.;Paula, A. S.;Luizon Filho, R. A.;Farias, L. A.;Gomes, E.;Aranda, D. A. G.;Nery, J. G. - Synergistic effect in the catalytic activity of lipase *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolites for the production of biodiesel. *Microporous and Mesoporous Materials*. Vol. 163, n.º 0 (2012), p. 343-355.
40. Serralha, F.;Lopes, J.;Lemos, F.;Prazeres, D.;Aires-Barros, M.;Rocha, J.;Cabral, J.;Ribeiro, F. - Titanosilicates as Supports for an Enzymatic Alcoholysis Reaction. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*. Vol. 69, n.º 2 (2000), p. 217-222.
41. Mitchell, S.;Pérez-Ramírez, J. - Mesoporous zeolites as enzyme carriers: Synthesis, characterization, and application in biocatalysis. *Catalysis Today*. Vol. 168, n.º 1 (2011), p. 28-37.
42. Secundo, F.;Miehé-Brendlé, J.;Chelaru, C.;Ferrandi, E. E.;Dumitriu, E. - Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. *Microporous and Mesoporous Materials*. Vol. 109, n.º 1-3 (2008), p. 350-361.
43. Lin, Z.;Rocha, J.;Brandao, P.;Ferreira, A.;Esculcas, A. P.;deJesus, J. D. P.;Philippou, A.;Anderson, M. W. - Synthesis and structural characterization of microporous umbite, penkvilksite, and other titanosilicates. *Journal of Physical Chemistry B*. Vol. 101, n.º 36 (1997), p. 7114-7120.
44. Galve, A.;Sieffert, D.;Vispe, E.;Téllez, C.;Coronas, J.;Staudt, C. - Copolyimide mixed matrix membranes with oriented microporous titanosilicate JDF-L1 sheet particles. *Journal of Membrane Science*. Vol. 370, n.º 1-2 (2011), p. 131-140.
45. Roberts, M. A.;Sankar, G.;Thomas, J. M.;Jones, R. H.;Du, H.;Chen, J.;Pang, W.;Xu, R. - Synthesis and structure of a layered titanosilicate catalyst with five-coordinate titanium. *Nature*. Vol. 381, n.º 6581 (1996), p. 401-404.
46. Ferdov, S.;Kolitsch, U.;Lengauer, C.;Tillmanns, E.;Lin, Z.;Ferreira, R. A. S. - Refinement of the layered titanosilicate AM-1 from single-crystal X-ray diffraction data. *Acta Crystallographica Section E-Structure Reports Online*. Vol. 63 (2007), p. I186-U20.
47. Huang, X. J.;Chen, P. C.;Huang, F.;Ou, Y.;Chen, M. R.;Xu, Z. K. - Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*. Vol. 70, n.º 3-4 (2011), p. 95-100.
48. Carneiro-Da-Cunha, M. G.;Rocha, J. M. S.;Cabral, J. M. S.;Gil, M. H.;Garcia, F. A. P. - Covalent immobilisation of lipase on different supports. *Latin American Applied Research*. Vol. 32, n.º 1 (2002), p. 69-72.
49. Donini, Í. A. N.;De Salvi, D. T. B.;Fukumoto, F. K.;Lustri, W. R.;Barud, H. S.;Marchetto, R.;Messaddeq, Y.;Ribeiro, S. J. L. - Biossintese e recentes avanços

- na produção de celulose bacteriana. *Eclética Química*. Vol. 35, n.º 4 (2010), p. 165-178.
50. Kragl, U.;Eckstein, M.;Kaftzik, N. - Enzyme catalysis in ionic liquids. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 13, n.º 6 (2002), p. 565-571.
 51. Rumbau, V.;Marcilla, R.;Ochoteco, E.;Pomposo, J. A.;Mecerreyes, D. - Ionic liquid immobilized enzyme for biocatalytic synthesis of conducting polyaniline. *Macromolecules*. Vol. 39, n.º 25 (2006), p. 8547-8549.
 52. Ansari, S. A.;Husain, Q. - Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances*. Vol. 30, n.º 3 (2012), p. 512-523.
 53. Rogers, A.;Gibon, Y. - Enzyme Kinetics: Theory and Practice. In: SCWENDER, J. - *Plant Metabolic Networks*. New York: Springer 2009, p. 71-103.
 54. Sharma, D.;Sharma, B.;Shukla, A. K. - Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review. *Biotechnology* Vol. 10 (2011), p. 23-40.
 55. Rajendran, A.;Palanisamy, A.;Thangavelu, V. - Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol. 52, n.º 1 (2009), p. 207-219.
 56. Sharma, R.;Chisti, Y.;Banerjee, U. C. - Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. Vol. 19, n.º 8 (2001), p. 627-662.
 57. Gotor-Fernández, V.;Vicente, G. - Use of Lipases in Organic Synthesis Industrial Enzymes. In: POLAINA, J.;MACCABE, A.P. -: Springer Netherlands, 2007, p. 301-315.
 58. Muller, S. S.;Frey, H. - Synthesis of Oxetane-Functional Aliphatic Polyesters via Enzymatic Polycondensation. *Macromolecular Chemistry and Physics*. Vol. 213, n.º 17 (2012), p. 1783-1790.
 59. Ciou, J.-F.;Wang, P.-Y.;Wu, A.-C.;Tsai, S.-W. - Lipase-catalyzed alcoholytic resolution of (R,S)-flurbiprofenyl azolides for preparation of (R)-NO-flurbiprofen ester prodrugs. *Process Biochemistry*. Vol. 46, n.º 4 (2011), p. 960-965.
 60. Yang, Z. Y.;Guo, Z.;Xu, X. B. - Ionic Liquid-Assisted Solubilization for Improved Enzymatic Esterification of Phenolic Acids. *Journal of the American Oil Chemists Society*. Vol. 89, n.º 6 (2012), p. 1049-1055.
 61. Lee, K. W.;Min, K.;Park, K.;Yoo, Y. J. - Development of an Amphiphilic Matrix for Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B for Biodiesel Production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. Vol. 15, n.º 4 (2010), p. 603-607.
 62. Kataoka, S.;Endo, A.;Oyama, M.;Ohmori, T. - Enzymatic reactions inside a microreactor with a mesoporous silica catalyst support layer. *Applied Catalysis a-General*. Vol. 359, n.º 1-2 (2009), p. 108-112.
 63. Kataoka, S.;Takeuchi, Y.;Harada, A.;Yamada, M.;Endo, A. - Microreactor with mesoporous silica support layer for lipase catalyzed enantioselective transesterification. *Green Chemistry*. Vol. 12, n.º 2 (2010), p. 331-337.
 64. He, P.;Greenway, G.;Haswell, S. J. - Development of a monolith based immobilized lipase micro-reactor for biocatalytic reactions in a biphasic mobile system. *Process Biochemistry*. Vol. 45, n.º 4 (2010), p. 593-597.
 65. Machsun, A. L.;Gozan, M.;Nasikin, M.;Setyahadi, S.;Yoo, Y. J. - Membrane Microreactor in Biocatalytic Transesterification of Triolein for Biodiesel Production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. Vol. 15, n.º 6 (2010), p. 911-916.

66. Perez, V. H.;Miranda, E. A.;Valenca, G. P. - Kinetics of gas-phase hydrolysis of ethyl acetate catalyzed by immobilized lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 136, n.º 1 (2007), p. 23-37.
67. Costantini, F.;Benetti, E. M.;Reinhoudt, D. N.;Huskens, J.;Vancso, G. J.;Verboom, W. - Enzyme-functionalized polymer brush films on the inner wall of silicon-glass microreactors with tunable biocatalytic activity. *Lab on a Chip*. Vol. 10, n.º 24 (2010), p. 3407-3412.
68. Matsuura, S.;Ishii, R.;Itoh, T.;Hamakawa, S.;Tsunoda, T.;Hanaoka, T.;Mizukami, F. - On-chip encapsulation of lipase using mesoporous silica: A new route to enzyme microreactors. *Materials Letters*. Vol. 63, n.º 28 (2009), p. 2445-2448.
69. Matsuura, S.;Ishii, R.;Itoh, T.;Hamakawa, S.;Tsunoda, T.;Hanaoka, T.;Mizukami, F. - Immobilization of enzyme-encapsulated nanoporous material in a microreactor and reaction analysis. *Chemical Engineering Journal*. Vol. 167, n.º 2-3 (2011), p. 744-749.
70. Urban, P. L.;Goodall, D. M.;Bergstrom, E. T.;Bruce, N. C. - On-line low-volume transesterification-based assay for immobilized lipases. *Journal of Biotechnology*. Vol. 126, n.º 4 (2006), p. 508-518.
71. Znidarsic-Plazl, P.;Plazl, I. - Modelling and experimental studies on lipase-catalyzed isoamyl acetate synthesis in a microreactor. *Process Biochemistry*. Vol. 44, n.º 10 (2009), p. 1115-1121.
72. Znidarsic-Plazl, P.;Pohar, A.;Plazl, I. - Theoretical and Experimental Studies of Enzyme-Catalyzed Isoamyl Acetate Synthesis with Ionic Liquid at the Microreactor Scale. In: PIERUCCI, S. - Icheap-9: 9th International Conference on Chemical and Process Engineering, Pts 1-3. Milano: Aidic Servizi Srl, 2009, p. 1077-1082.
73. Pohar, A.;Plazl, I.;Znidarsic-Plazl, P. - Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl acetate in an ionic liquid/n-heptane two-phase system at the microreactor scale. *Lab on a Chip*. Vol. 9, n.º 23 (2009), p. 3385-3390.
74. Trovatti, E.;Serafim, L. S.;Freire, C. S. R.;Silvestre, A. J. D.;Neto, C. P. - *Gluconacetobacter sacchari*: An efficient bacterial cellulose cell-factory. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 86, n.º 3 (2011), p. 1417-1420.
75. Sigma - Total protein Kit, Micro Lowry, Onishi & Barr Modification [em linha]. [Consult. Disponível em WWW:<URL:<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/tp0200bul.Par.0001.File.tmp/tp0200bul.pdf>>].
76. Knezevic, Z.;Obradovic, B. - Lipase immobilization in a hollow fibre membrane reactor: Kinetics characterization and application for palm oil hydrolysis. *Chemical Papers-Chemicke Zvesti*. Vol. 58, n.º 6 (2004), p. 418-423.
77. Lu, J.;Deng, L.;Nie, K.;Wang, F.;Tan, T. - Stability of Immobilized *Candida* sp. 99-125 Lipase for Biodiesel Production. *Chemical Engineering & Technology*. Vol. 35, n.º 12 (2012), p. 2120-2124.
78. Karra-Châabouni, M.;Bouaziz, I.;Boufi, S.;Botelho do Rego, A. M.;Gargouri, Y. - Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Vol. 66, n.º 2 (2008), p. 168-177.

Anexo

Anexo A - Calibração do método de Lowry modificado por Onishi e Barr

Para determinar a quantidade de enzima imobilizada pelo método de Lowry modificado por Onishi e Barr foi necessário obter uma curva de calibração. O comprimento de onda utilizado foi de 728 nm, pois era o valor para o qual a solução com uma maior concentração em proteína padrão, padrão 5, tinha um valor mais intenso de absorvência. A Tabela A.1 apresenta os valores de absorvência média de três medições, obtidos para as diferentes soluções.

Tabela A.1 - Valores de absorvência e de concentração para a curva de calibração.

Padrão	[Enzima padrão] ($\mu\text{g/mL}$) $\times 10^2$	Absorvência $\pm 0,001$	$\log([\text{Enzima Padrão}])$	$\log(\text{Absorvência})$
2	2,50	0,379	2,398	-0,422
3	5,00	0,673	2,699	-0,172
4	7,50	0,899	2,875	-0,046
5	1,00	1,262	3,000	0,1011

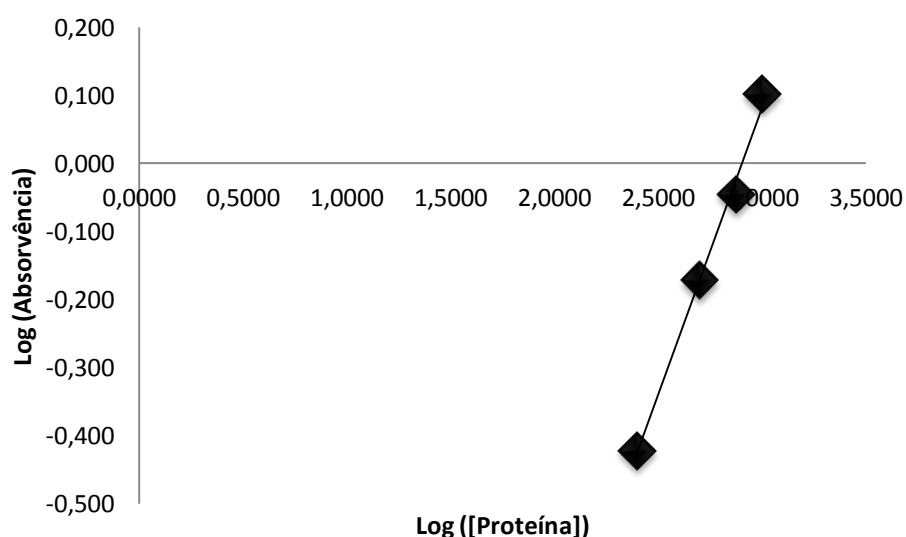


Figura A.1 - Reto padrão para a determinação da quantidade de proteína em solução.

O ajuste linear obtido foi o seguinte:

$$\log(\text{Absorv\^encia}) = (0,8456 \pm 0,0473) \times \log([\text{Prote\^ina}]) - (2,4543 \pm 0,1300) \quad (8)$$

$$R^2=0,9938$$

A partir dos resultados obtidos pelo ajuste linear, obt\^em-se os valores de concentra\~ao de enzima em solu\~ao. De seguida, para determinar a quantidade de enzima imobilizada basta subtrair \`a quantidade de enzima inicial a quantidade de enzima em solu\~ao.

Anexo B- Curva de calibração do p-NP

Para a determinação da curva de calibração que relaciona o valor de absorvência e de concentração do p-nitrofenol, seguiu-se o procedimento mencionado na seção 2.4. Uma característica interessante da solução de p-nitrofenol comprada para este ensaio, é que esta solução é dissolvida em água e depois o seu pH é acertado com ácido clorídrico para um valor entre 3.5 e 3.7. Através de uma pesquisa sobre o p-nitrofenol, este, consoante o pH, pode emitir cor. Para um pH ácido a sua solução é incolor ou amarela pálida, mas quando o pH é superior a 7 este emite uma cor amarela muito intensa, e em solução este fica na sua forma de sal.

Como a solução que foi utilizada era ácida, e a solução tampão utilizada inicialmente, tinha uma concentração muito baixa, e não era suficiente para elevar o pH da solução para valores de pH iguais ou superiores a 7. Neste caso o que ocorria é que a solução não emitia cor a 410 nm. A Tabela B.1 mostra a variação da absorvência média de 4 ensaios, nesta situação, em que a solução tampão tinha uma concentração de 0.1 mM.

Tabela B.1 - Valores de absorvência para a solução de p-Nitrofenol a diferentes concentrações.

Solução	C (mM)	V _{pNP} (mL)	V _s (mL)	Absorvência ± 0,001
1	7,00	1,75	0,75	0,134
2	5,00	1,25	1,25	0,096
3	3,00	0,75	1,75	0,078
4	1,00	0,25	2,25	0,208

Analisados os dados apresentados na Tabela B.1, verificou-se que para concentrações mais elevadas, a absorvência tem um comportamento esperado, ou seja diminui com a diminuição da concentração. Contudo quando as concentrações são mais baixas, a absorvência começa a aumentar em vez de diminuir, ou seja, o pH está a mudar de básico para ácido e o p-nitrofenol passa a sal. Isto acontece porque a quantidade de solução tampão é superior em soluções mais diluídas.

Para a solução deste problema, aumentou-se a concentração da solução tampão e utilizaram-se concentrações de p-nitrofenol muito mais baixas, como está apresentado na Tabela B.2.

Tabela B.2 - Valores de pH e absorvência para soluções de diferentes concentrações de p-nitrofenol para a determinação da curva de calibração do p-NP.

Solução	C (mM)	V _{p-NP} (mL)	V _s (mL)	Absorvência ±0,001	pH
1	0,10	0,10	9,90	0,865	7,15
2	0,07	0,07	9,95	0,585	7,62
3	0,05	0,05	9,98	0,393	7,22
4	0,03	0,03	9,99	0,220	7,20
5	0,02	0,02	9,97	0,162	7,30
6	0,01	0,01	9,93	0,077	7,60

Curva de calibração

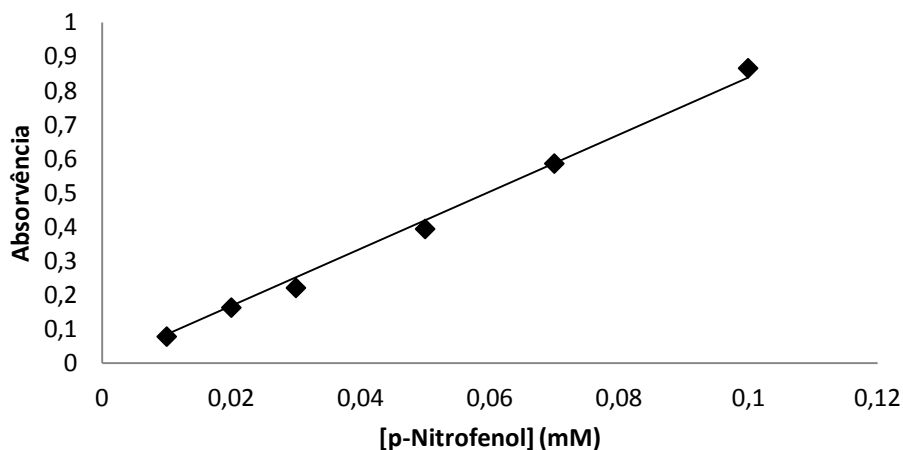


Figura B.1 - Relação entre a absorvência e a concentração de p-nitrofenol.

O ajuste linear obtido foi o seguinte:

$$\text{Absorvência} = (8,389 \pm 0,315) \times [p - NP] \quad (9)$$

$$R^2=0,994$$

Pela lei de Lambert-Beer obtém-se uma relação linear entre a absorvência e a concentração de p-NP, mas neste caso só é aplicável a relação linear, pois obteve-se

valores de absorvência inferiores a 1^3 . O declive da reta representa o produto entre a absorvidade molar, ϵ , e o comprimento de travessia da luz, l , que neste caso é 1 cm.

De seguida apresentam-se os cálculos necessários para se obter o valor da absorvidade molar e o respetivo erro associado.

$$\epsilon \times l = 8,389 \text{ mM}^{-1} \Leftrightarrow \epsilon = \frac{8,389 \text{ dm}^3}{\text{mmol}} \times \frac{1}{10 \times 10^{-2} \text{ dm}} \times \frac{1000 \text{ mol}}{1 \text{ mmol}} \times \frac{1 \text{ m}^2}{10^2 \text{ dm}^2} = 838,88 \text{ m}^2/\text{mol}$$

$$\Delta \epsilon = \frac{0,3148 \text{ mM}^{-1}}{10,0 \times 10^{-2} \text{ dm}} + \left| -\frac{8,389 \text{ mM}^{-1}}{(10 \times 10^{-2})^2 \text{ dm}^2} \right| \times 0,005 \text{ dm} = \frac{7,34 \text{ dm}^2}{\text{mol}} \times \frac{1 \text{ m}^2}{10^2 \text{ dm}^2} \times \frac{1000 \text{ mmol}}{1 \text{ mol}} \Leftrightarrow$$

$$\Delta \epsilon = 73,424 \text{ m}^2/\text{mol}$$

Como tal o valor para a absorvidade molar obtido foi $838,88 \pm 7,34 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$.

³ Bonicamp, J. M.; Martin, K. L.; McBride, G. R.; Clark, R. W. - Beer's Law Is Not a Straight Line: Amplification of Errors by Transformation. The Chemical Educator. Vol. 4, n.º 3 (1999), p. 81-88.

Anexo C – Cálculo do erro associado à atividade e à atividade específica da CAL B

O exemplo de cálculo utilizado é para o caso da imobilização por adsorção em AM-1. Em que o ajuste linear obtido foi o seguinte:

$$[p - NP] = (1,50 \pm 0,120) \times 10^{-3} \times t + (1,59 \pm 0,274) \times 10^{-2} \quad (13)$$

$$R^2=0,9874$$

O declive da reta corresponde à velocidade inicial da reação enzimática e o seu valor foi de $(1,50 \pm 0,120) \times 10^{-3}$ mM/min. Os erros associados aos parâmetros de ajuste da reta, declive (m) e ordenada na origem (b), para todos os casos, foram calculados pelas seguintes equações:

$$\Delta m = |m| \times \sqrt{\frac{\left(\frac{1}{R^2} - 1\right)}{N - 2}} \quad (17) \quad \text{e} \quad \Delta b = \Delta m \times \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N}} \quad (18)$$

Depois de determinado o erro associado aos parâmetros de ajuste da reta, determinou-se a atividade da CAL B, onde basta aplicar diretamente a equação (10). Para a determinação da atividade específica da CAL B, esse cálculo já não é direto, pois antes é necessário determinar a massa de enzima que está imobilizada.

Exemplo de cálculo da massa de enzima imobilizada e o respetivo erro associado para a quantidade de enzima imobilizada por adsorção ao AM-1.

$$m_{\text{inicial}} = [\text{Enzima}]_0 \times V_{\text{Solução}} = 7968,0 \mu\text{g} / \text{mL} \times 5 \text{mL} = 39840 \mu\text{g}_{\text{Enzima}}$$

$$\Delta m_{\text{inicial}} = V_{\text{Solução}} \times \Delta[\text{Enzima}]_0 + [\text{Enzima}]_0 \times \Delta V_{\text{Solução}} = 5 \times 154,344 + 7968 \times 0,015 =$$

$$= \pm 891,24 \mu\text{g}_{\text{Enzima}}$$

$$m_{\text{Enzima em Solução}} = [\text{Enzima em Solução}] \times V_{\text{Solução}} = 4058,873 \times 5 = 20294,365 \mu\text{g}_{\text{Enzima}}$$

$$\Delta m_{\text{Enzima em Solução}} = V_{\text{Solução}} \times \Delta[\text{Enzima em Solução}] + [\text{Enzima em Solução}] \times \Delta V_{\text{Solução}}$$

$$= 5 \times 231,063 + 20294,365 \times 0,015 = \pm 1459,730 \mu\text{g}_{\text{Enzima}}$$

$$m_{\text{Enzima Imobilizada}} = m_{\text{inicial}} - m_{\text{Enzima em Solução}} = 19545,635 \mu\text{g} = 19,546 \text{mg}$$

$$\Delta m_{\text{EnzimaImobilizada}} = \Delta m_{\text{inicial}} - \Delta m_{\text{Enzima em Solução}} = 891,24 + 1459,730 = 2350,97 \mu\text{g} = 2,351 \text{mg}$$

A massa de CAL B imobilizada por adsorção foi de $19,5 \pm 2,35$ mg. Em seguida, basta aplicar a equação (11) e obtém-se a atividade específica da CAL B imobilizada.

Anexo D – Utilização de fibra ótica como suporte de imobilização

A imobilização de CAL B na fibra ótica não foi bem-sucedida, e os resultados obtidos para a quantidade de enzima imobilizada por ligação covalente encontram-se na Tabela D.1.

Tabela D.1 - Quantidade de enzima imobilizada por ligação covalente na fibra ótica.

Tempo de Imobilização (h)	Absorvência $\pm 0,001$	[Enzima em solução] (mg/mL)	[Enzima Imobilizada] ($\mu\text{g/mL}$)	ηI (%)
0,0	0,310	8,00	1,90	0,02
2,0	0,312	8,06	0,00	0,00
4,0	0,309	7,97	32,4	0,41
6,0	0,315	8,15	0,00	0,00
8,0	0,309	7,97	32,4	0,41
24,0	0,311	8,03	0,00	0,00

Nota: A concentração da solução inicial de CAL B foi de 8,00 mg/mL.

A partir dos resultados apresentados na Tabela D.1, verificou-se que a CAL B não estava a ser imobilizada na fibra ótica.

Para perceber estes resultados realizaram-se análises termogravimétrica (TGA) de SEM e análise química por EDS (Espectroscopia de dispersão de energia). A TGA à fibra ótica foi realizada com amostras de 13,34 g. As amostras foram aquecidas com uma velocidade de $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ desde a temperatura ambiente até $930\text{ }^{\circ}\text{C}$ num fluxo de azoto de $20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Os resultados obtidos pela análise termogravimétrica apresentam-se na Figura 22.

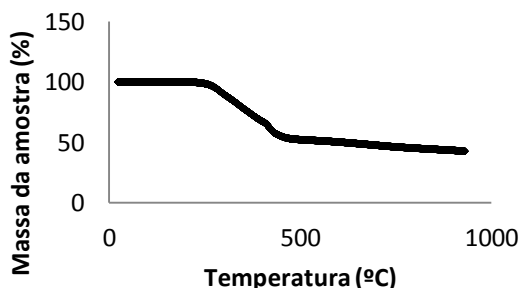


Figura D.1 - Curva da análise termogravimétrica à fibra ótica numa atmosfera de azoto e uma velocidade de aquecimento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

A partir dos resultados apresentados na Figura D.1, verificou-se que a amostra perdeu cerca de 50% da massa até aos 500°C. Este resultado mostra que ao contrário do que seria de esperar a fibra ótica utilizada deveria ter um uma camada polimérica a proteger a parte da sílica. De acordo com Ek *et al.* (2001) uma amostra de sílica deve perder cerca de 10% da sua massa tal como se apresenta na Figura 23⁴. Além disso a curva termogravimétrica obtida tem uma variação distinta da obtida na literatura, não se observando o primeiro degrau correspondente à perda de água adsorvida à amostra, que normalmente se ocorre entre 200 a 400°C, nem o segundo degrau mais amplo que corresponde a condensação lenta dos grupos silanol presentes na sílica.

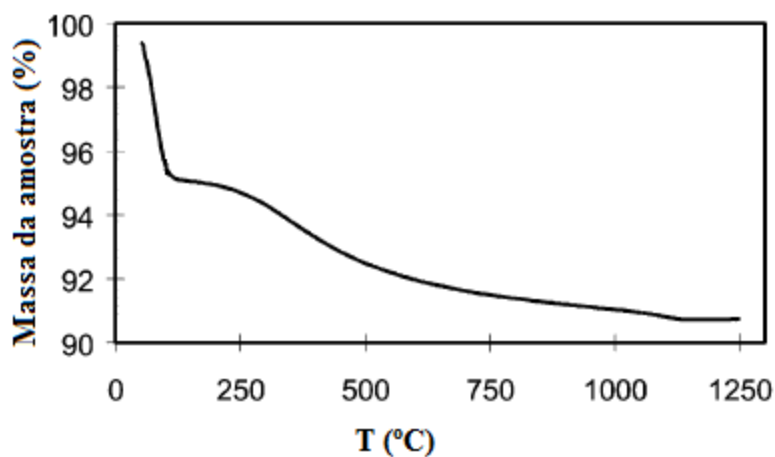


Figura D.2 - Curva da análise termogravimétrica à sílica numa atmosfera de árgon e uma velocidade de aquecimento de 5°C/min.⁴

A análise química por EDS confirmou que a fibra ótica utilizada não era constituída por sílica.

⁴ Ek, S.;Root, A.;Peussa, M.;Niinistö, L. - Determination of the hydroxyl group content in silica by thermogravimetry and a comparison with 1H MAS NMR results. *Thermochimica Acta*. Vol. 379, n.º 1-2 (2001), p. 201-212.

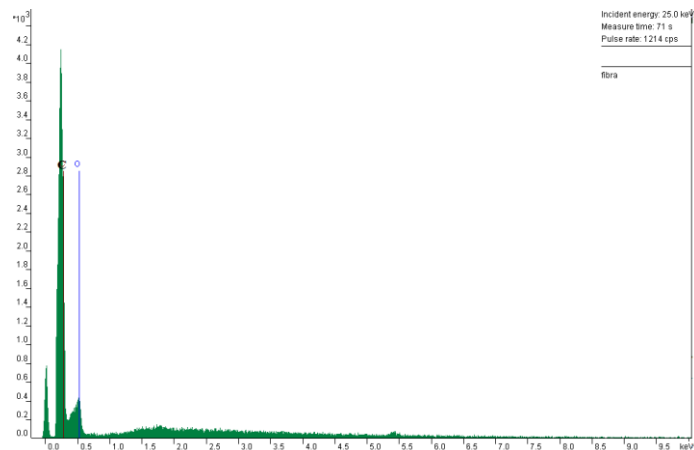


Figura D.3 - Análise química por EDS à fibra ótica.

Os dados representados na Figura D.3, mostraram que a composição da fibra ótica era essencialmente carbono e não sílica porque o pico com maior intensidade corresponde ao carbono.

A partir da Figura D.4, verificou-se que a fibra ótica utilizada é constituída por um núcleo e uma camada externa. A imobilização não foi bem-sucedida neste suporte, por isso não se apresentou imagens SEM depois da imobilização.

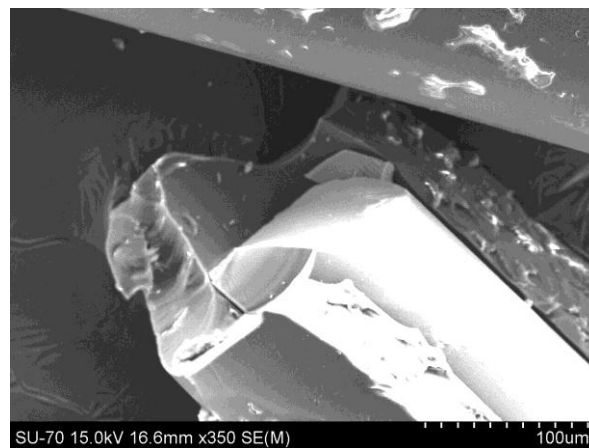


Figura D.4 - Análise SEM à fibra ótica.

As análises termogravimétrica e química por EDS mostraram que a fibra ótica era composta essencialmente por carbono. Como o procedimento foi preparado para a fibra ótica de sílica a imobilização não foi concluída com sucesso.