



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102012011150-0 A2

(22) Data do Depósito: 11/05/2012

(43) Data da Publicação: 10/02/2016  
(RPI 2353)



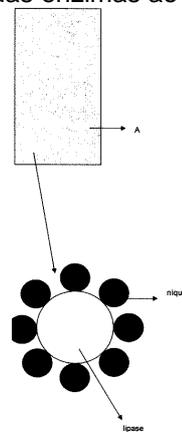
(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CATALISADOR ENZIMÁTICO E PRODUTO OBTIDO

(51) Int. Cl.: C12N 13/00; C12P 1/00

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

(72) Inventor(es): ROBERTA DA SILVA BUSSAMARA RODRIGUES, DARIO EBERHARDT, ADRIANO FRIEDRICH FEIL, PEDRO MIGOWSKI DA SILVA, JAIRTON DUPONT, SÉRGIO RIBEIRO TEIXEIRA

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CATALISADOR ENZIMÁTICO MAGNÉTICO E PRODUTO OBTIDO. É descrito um processo de obtenção de catalisador enzimático magnético que provê a produção de enzimas magnéticas recobertas com material magnético, tornando possível a produção de um catalisador enzimático com propriedades magnéticas com alta atividade, possibilitando a recuperação do biocatalisador do meio reacional através de campo magnético e manutenção da atividade catalítica por vários ciclos reacionais consecutivos, ao contrário dos processos do estado da técnica que envolvem diversas etapas de preparação dos biocatalisadores magnéticos, sendo necessária, em sua grande maioria, a funcionalização dos núcleos magnéticos com compostos que possibilitem uma eficiente imobilização das enzimas ao suporte magnético.



## PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CATALISADOR ENZIMÁTICO MAGNÉTICO E PRODUTO OBTIDO

### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve um processo de obtenção de catalisador enzimático magnético e produto obtido. Mais especificamente compreende um catalisador enzimático magnético com alta atividade, com recuperação do meio reacional através de campo magnético e manutenção da atividade catalítica por vários ciclos reacionais consecutivos.

### 10 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Enzimas são catalisadores protéicos que possuem uma série de características que as tornam mais vantajosas em um processo industrial quando comparadas à catálise química convencional (Ye, P., Jiang, J., Xu, Z-K. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 60, 62–67 (2007);  
15 Macario, A., Moliner, M., Corma, A., Giordano, G. *Microporous Mesoporous Mater.* 118, 334–340 (2009); Miletic, N., Vukovi., Z., Nastasovi, A., Loos, K. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 56, 196–201 (2009).  
Entre essas vantagens, cabe salientar o alto grau de eficiência catalítica de uma enzima, muito superior à catálise química. Ressalta-se, ainda, a alta especificidade de uma enzima na reação, o que  
20 permite não somente discriminação entre reações como também entre substratos (especificidade pelo substrato), entre partes similares de uma molécula (régio-especificidade) e entre isômeros ópticos

(estéreo-especificidade) (Ye, P., Jiang, J., Xu, Z-K. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 60, 62–67 (2007); Macario, A., Moliner, M., Corma, A., Giordano, G. *Microporous Mesoporous Mater.* 118, 334–340 (2009); Miletic, N., Vukovi., Z., Nastasovi, A., Loos, K. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 56, 196–201 (2009). Essas características das enzimas evitam a formação de subprodutos através de reações inespecíficas, aumentando o grau de pureza do produto final. Além disso, as enzimas operam em condições amenas de temperatura, pressão e pH, enquanto os catalisadores químicos muitas vezes requerem condições críticas de operação. Isto proporciona substancial economia de energia em processos industriais e conseqüentemente redução no custo de produção (Macario, A., Moliner, M., Corma, A., Giordano, G. *Microporous Mesoporous Mater.* 118, 334–340 (2009); Miletic, N., Vukovi., Z., Nastasovi, A., Loos, K. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 56, 196–201 (2009).

Até 1960, o mercado mundial de enzimas era estimado em poucos milhões de dólares anuais, porém, desde então, o mercado tem crescido sensivelmente, atingindo o patamar de US\$ 2,3 bilhões, em 2007. Estima-se ainda que a demanda mundial por enzimas alcance a taxa de crescimento de 4% ao ano, projetando um mercado de aproximadamente US\$ 2,7 bilhões em 2012 (Solazyme, *Chevron Catal. Commun.* 9, 1050. Business Communications Co, Inc, 40 Washington St, Wellesley, MA 02481, USA.

Website: <http://www.bccresearch.com> (2008).

Seguida pelas proteases e carboidrases, as lipases são consideradas o terceiro maior grupo de enzimas baseado no total de volume de vendas. O uso comercial de lipase totaliza um valor de US\$ 1 bilhão e engloba uma variedade de aplicações (Hasan, S.D.M., Melo, D.N.C., Filho, R.M. *Chem. Eng. Process.* 44, 335–343 (2005).

A utilização das lipases em aplicações industriais se tornou atrativa devido a sua atuação em reações de síntese em meio orgânicos e na catálise quiral através de reações de acil transferência, a fim de se produzir compostos enanteopuros difíceis de serem preparados através de métodos químicos convencionais (Hara, P., Hanefeld, U., Kanerva, L.T. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 50, 80-86 (2008); Othman, S.S., Basri, M., Hussein, M.Z., Rahman, M.B.A., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B., Jasmani, H. *Food Chem.* 106, 437–443 (2008); Zhou, G., Chen, Y., Yang, S. *Microporous and Mesoporous Mater.* 119, 223–229 (2009); Bussamara, R., Fuentesfria, A.M., Oliveira, E.S., Broetto, L., Simcikova, M., Valente, P., Schrank, A., Vainstein, M.H. *Bioresour. Technol.* 101: 168-275. (2010); Bussamara, R., Dall'Agnol, L., Schrank, A., Fernandes, K.F., Vainstein, M.H. *Enzyme Res.* 1-12 (2012).

Lipases (triacilglicerol acilhidrolase, EC 3.1.1.3) são enzimas que podem tanto catalisar reações de hidrólise de ésteres de ácidos graxos em mono, digliceróis e ácidos graxos livres em meios contendo

água, como realizar reações de síntese como esterificação, transesterificação, interesterificação e acidólise em meio com solventes orgânicos (Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E., Miller, R. *Lipases. Adv Colloid Interface Sci.* 147-148, 237-250 (2009);

5 Secundo, F., Miehe-Brendle, J., Chelaru, C., Ferrandi, E.E., Dumitriu, E. *Microporous Mesoporous Mater.* 109, 350–361 (2008); Vaidya, B.K., Ingavle, G.C., Ponrathnam, S., Kulkarni, B.D., Nene, S.N. *Bioresour. Technol.* 99, 3623–3629 (2008); Lu, J., Chen, Y., Wang, F., Tan, T. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 56, 122–125 (2009); Ozyilmaz, G. *J.*

10 *Mol. Catal., B Enzym.* 56, 231–236 (2009); Bussamara, R., Fuentesfria, A.M., Oliveira, E.S., Broetto, L., Simcikova, M., Valente, P., Schrank, A., Vainstein, M.H. *Bioresour. Technol.* 101: 168-275. (2010); Bussamara, R., Dall'Agnol, L., Schrank, A., Fernandes, K.F., Vainstein, M.H. *Enzyme Res.* 1-12 (2012). Apesar das vantagens apresentadas

15 pelas enzimas, elas não são plenamente utilizadas na escala industrial devido ao seu alto custo, dificuldade de separação do meio reacional e instabilidade de suas estruturas ocasionada, principalmente, pela crescente utilização desses biocatalisadores em

20 aplicações que atuam em condições desnaturantes (pHs e temperaturas extremas, forte agitação e presença de solventes orgânicos) (Tumturk, H., Karaca, N., Demirel, G., Sahin, F. *Int. J. Biol. Macromol.* 40, 281–285 (2007); Lei, L., Bai, Y., Li, Y., Yi, L., Yang, Y., Xia, C. *J Magn. Magn. Mater.* 321, 252–258 (2009); Miletic, N.,

Vukovi,, Z., Nastasovi, A., Loos, K. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 56, 196–201 (2009); Zhou, G., Chen, Y., Yang, S. *Microporous and Mesoporous Mater.* 119, 223–229 (2009).

O desenvolvimento de métodos eficientes de fixação da enzima em suportes que proporcionem maior estabilidade, melhor atividade catalítica, proteção em ambientes desnaturantes, diminuição da contaminação do produto, fácil separação e reutilização em aplicações industriais, poderá tornar possível o uso do biocatalisador em aplicações industriais (Secundo, F., Miehle-Brendle, J., Chelaru, C., Ferrandi, E.E., Dumitriu, E. *Microporous Mesoporous Mater.* 109, 350–361 (2008); Miletic, N., Vukovi,, Z., Nastasovi, A., Loos, K. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 56, 196–201 (2009); Zhou, G., Chen, Y., Yang, S. *Microporous and Mesoporous Mater.* 119, 223–229 (2009). Quanto à escolha do suporte, o uso de partículas magnéticas na imobilização de enzimas apresenta-se como uma boa alternativa. A imobilização de enzimas em partículas magnéticas apresenta como vantagem a fácil recuperação do meio reacional através da aplicação de um campo magnético externo possibilitando sua reutilização no processo e estabilização em reatores de leito fluidizado pela aplicação de um campo magnético, reduzindo com isso custos de capital e de operação (Chaubey, A., Parshad, R., Taneja, S.C., Qazi, G.N. *Process Biochem.* 44, 154-160 (2009); Jiang, Y., Guo, C., Xia, H., Mahmood, I., Liu, C., Liu, H. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 58, 103-109 (2009); Neri,

D.F.M., balcao, V.M., Dourado, F.O.Q., Oliveira, J.M.B., Carvalho Jr., L.B., Teixeira, J.A. *Reactive & Functional Polymers* 69, 246-251 (2009); Yong, Y., bai, Y., Li, Y., Lin, L., Cui, Y., Xia, C. *J Magn. Magn. Mater.* 320, 2350-2355 (2008). Devido as vantagens acima descritas, diversos processos para obtenção de catalisadores enzimáticos suportados em materiais magnéticos foram desenvolvidos.

O documento GB2034719 descreve a enzima peroxidase suportada em material magnético, sendo utilizado óxido de cromo já sintetizado. Este material paramagnético foi recoberto com um agente silano aminofuncional. Posteriormente, os grupos amino livres foram convertidos à isocianato e realizada a ligação da enzima a esses grupos funcionais. Com este processo de imobilização, foi obtida a recuperação de apenas 20,0% da atividade da enzima em comparação à obtida na sua forma livre. A invenção também descreve a enzima amiloglucosidase suportada em material magnético, sendo recuperada apenas 15,0% da atividade original. A partir do processo proposto nesta invenção, foi obtida uma eficiente deposição de níquel na enzima lipase, com recuperação de 68,0% da atividade de hidrólise e 76,0% da atividade de transesterificação em comparação à lipase livre.

O documento WO2005108302 descreve um processo de obtenção de nanocristais magnéticos a partir de bactérias. A produção de nanocristais magnéticos a partir de organismos vivos apresenta

como desvantagem a sensibilidade do microrganismo ao ambiente, provocando possíveis oscilações na reprodutibilidade do processo. Além disso, para se recuperar estes cristais deve-se romper as células, liberando com isto enzimas, proteínas e metabólitos que  
5 podem se adsorver à superfície dos nanocristais, contaminando o mesmo.

O documento US4624923 descreve um processo de formação de uma microesfera magnética para imobilização de enzimas. O material magnético foi inserido à microesferas de polialdeído, mantendo a  
10 microesfera em contato com o sal ou ácido do metal de transição até estes serem reduzidos, pelos grupos aldeídos, proporcionando a ligação do metal à microesfera. No entanto, em alguns casos, pode ser observado que o tempo de reação foi longo, necessitando a adição de agentes redutores como boroidrato de sódio. Outra desvantagem  
15 deste tipo de suporte consiste no fato de que grupos amino de enzimas, proteínas e outros compostos biológicos deverão se ligar à microesfera também. Como a mesma já possui o metal ligado, sobram poucos sítios de ligação da enzima, restringindo a quantidade de enzima ligada ao suporte.

20 O documento US20090159533 descreve um processo de imobilização de enzimas em uma partícula envolvendo um núcleo magnético (como exemplo a magnetita) com uma camada de uma substância (polímeros) contendo grupos funcionais que possibilitam a

imobilização da enzima por ligação covalente para se utilizar esta enzima na inibição da formação de biofilmes de microrganismos em sistemas de água. O método utilizado para a imobilização da enzima foi a partir de interação eletrostática. Foi adicionada à resina magnética positivamente carregada uma solução negativamente carregada e por cima uma camada de quitosana, positivamente carregada, que serviu como fornecedor de grupos funcionais para a imobilização da enzima por ligação covalente. Nesta invenção foi possível a reutilização da enzima em novos ciclos operacionais, porém a imobilização da enzima acarretou na necessidade da colocação de uma camada polimérica para ligação da enzima à partícula magnética e também, neste caso, a enzima ficou totalmente exposta ao meio reacional, ficando acessível aos efeitos nocivos dos componentes do meio, podendo vir a perder a eficiência em determinadas aplicações.

O documento WO9735964 descreve o recobrimento da partícula magnética com uma membrana orgânica, principalmente composta por fosfolipídeos, nos quais as proteínas vão se ligar. No entanto, a membrana orgânica ficou totalmente exposta ao meio reacional, estando acessível aos efeitos nocivos dos componentes do meio, podendo vir a perder a eficiência em determinadas aplicações.

O documento GB1403359 descreve a imobilização de enzimas em partículas magnéticas que funcionam como um suporte, porém por

um método mais laborioso no qual deve ser adicionado um agente sinalizante como o 3-aminopropiltriétoxisilano e glutaraldeído a fim de permitir suficiente imobilização da enzima no suporte magnético, podendo tornar este processo caro.

5 Os documentos US4343901 e GB2125018 descrevem um catalisador magnético produzido a partir de um suporte contendo um óxido inorgânico que contém no seu interior partículas de material ferromagnético, sendo este material impregnado com uma poliamina com excesso de reagente bifuncional. De igual forma, este processo  
10 se torna inviável comercialmente dado o alto custo.

O documento US20040219361 descreve um método para produzir uma partícula magnética na qual o núcleo é composto por  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e a superfície contém ouro. Este processo apresenta o inconveniente da enzima necessariamente ser recoberta com ouro  
15 para posterior ligação da enzima à partícula.

Dessa forma, a literatura técnica descreve diversos processos de imobilização de enzimas em partículas magnéticas. Entretanto, os processos descritos no estado da técnica envolvem diversas etapas de preparação dos biocatalisadores magnéticos, sendo necessária,  
20 em sua grande maioria, a funcionalização dos núcleos magnéticos com compostos que possibilitem uma eficiente imobilização das enzimas ao suporte magnético.

A presente invenção, por sua vez, possibilita a produção de

enzimas magnéticas de uma forma inovadora e simples, diferenciando-se dos processos descritos no estado da técnica por suportar o material magnético sobre as enzimas, tornando possível a produção de um catalisador enzimático com propriedades magnéticas com alta atividade, possibilitando a recuperação do biocatalisador do meio reacional através de campo magnético e manutenção da atividade catalítica por vários ciclos reacionais consecutivos

## SUMÁRIO

A invenção provê um catalisador enzimático magnético com alta atividade, possibilitando a recuperação do biocatalisador do meio reacional através de campo magnético e manutenção da atividade catalítica por vários ciclos reacionais consecutivos.

A invenção provê um processo de obtenção de catalisador enzimático magnético que provê uma alta retenção das partículas magnéticas sobre a enzima, permitindo a atuação da dita enzima no substrato e formando uma camada protetora que evita os efeitos nocivos que o meio reacional possa propiciar à enzima, permitindo a manutenção da atividade catalítica por vários ciclos reacionais consecutivos.

A invenção provê um processo de obtenção de catalisador enzimático magnético que reduz as etapas de inserção das partículas magnéticas e recobrimento do material com reagentes funcionais, proporcionando um processo mais simples e eficaz, cuja única

diferença da forma livre da enzima é a propriedade magnética, aumentando a viabilidade na comercialização deste catalisador.

A invenção provê um processo de obtenção de catalisador enzimático magnético que gera menor quantidade de resíduos quando comparado com os processos do estado da técnica, mantendo o produto livre de impurezas por ser um método extremamente limpo e utilizando pressão de trabalho em alto vácuo com a utilização de gases inertes.

A invenção provê um processo de obtenção de catalisador enzimático magnético de baixo custo e com nível de produção elevado, utilizando a técnica de pulverização catódica (sputtering à baixa pressão), utilizando o equipamento para deposição de materiais gaseificados em suportes particulados descrito no documento BRPI2012001392, do mesmo titular, que permite a realização de processos deposição de materiais metálicos, cerâmicos, poliméricos e materiais semicondutores homoganeamente sobre suportes utilizando sistemas convencionais de evaporação com controle do percentual depositado na superfície do suporte a ser usado.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A figura 1A apresenta a representação do compartimento contendo a lipase recoberta com níquel em meio aquoso (A) e a figura 1B apresenta a lipase recoberta com níquel (B) sendo atraída pelo campo magnético para sua reutilização.

A figura 2 apresenta a representação gráfica de experimento com lipase pura (círculos abertos) e lipase recoberta com níquel (círculos fechados).

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

5 O processo de obtenção de catalisador enzimático magnético propicia uma alta retenção das partículas magnéticas sobre a enzima, permitindo uma fácil recuperação do catalisador do meio reacional possibilitando a sua utilização em vários ciclos.

10 O recobrimento das enzimas pode ser realizado com qualquer material magnético, tal como níquel, ferro, ferro-níquel, cobalto ou óxido deste metal. As partículas magnéticas depositadas na enzima podem apresentar um diâmetro de 1,0 a 100,0 nm e podem ser apresentadas em vários formatos, tal como esfera, cilindro, cubo e outros.

15 As enzimas a serem utilizadas no processo objeto da presente invenção podem ser selecionadas dentre aquelas presentes ou isoladas de animais, micro-organismos e plantas, como por exemplo as lipases, proteases, amilases, celulasas, ureases, glucose isomerases, lactases, glucoamilases, histidinases, peroxidases, 20 tripsina, papaína, hexoquinases, acilase, invertase, lisozimas, pepsinas, xilanases, beta amilases, asparaginases, álcool desidrogenases, colaginases, catalases, entre outras.

O catalisador enzimático magnético objeto da presente invenção

pode ser utilizado em uma grande variedade de reações bioquímicas, substituindo as enzimas solúveis em processos onde essas já são utilizadas, como na clarificação de cerveja, na preparação da celulose, de aminoácidos opticamente ativos, na fixação de nitrogênio e de dióxido de carbono, em células combustíveis bioquímicas e outras.

O processo de obtenção de catalisador enzimático magnético utiliza o equipamento objeto da patente BRPI2012001392, que apresenta uma câmara de evaporação hermeticamente fechada dotada de válvulas de admissão de gases controlada por controladores de vazão, sensores de pressão interna e controle de vácuo e um sistema de vácuo; um sistema de agitação suportado por um eixo móvel disposto na base da câmara de evaporação, dito sistema de agitação que funciona pela ressonância das partículas através da propagação de ondas mecânicas originadas por um gerador de frequência; uma mesa oscilatória disposta sobre o sistema de agitação, um recipiente de tratamento disposto sobre o sistema de agitação; um sistema de aquecimento do recipiente de tratamento; evaporadores de evaporação física na região superior da câmara de evaporação e um gerador de função assistido por computador dotado de um programa que provê uma variação abrupta na frequência de trabalho através de um amplificador operacional de tensão e corrente variável.

Em uma primeira etapa, é realizado o cálculo da taxa e tempo de

deposição conforme a massa e volume das enzimas e a potência e frequência a ser empregada no processo. As enzimas são colocadas no interior da câmara de evaporação e entram no processo de pré-vácuo (até  $10^{-3}$  mBar), podendo permanecer por até 30 minutos. Findo  
5 o pré-vácuo, as enzimas passam para o processo de vácuo, onde as pressões podem chegar até  $10^{-11}$  mBar por até 30 minutos. Iniciado o pré-Sputtering com pressões na faixa de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  mBar.

Iniciada a deposição do material magnético, as enzimas são agitadas em uma frequência proporcional a frequência ressonante do  
10 sistema, onde seu valor pode variar de 5Hz a 1kHz e sua potência proporcional ao volume total das enzimas.

A deposição das partículas magnéticas estão compreendidas entre pressões de  $10^{-4}$  mbar a  $10^{-1}$  mbar e tensões da ordem de 250V a 1000V. Podem ser utilizados pós enzimáticos de tamanhos variados,  
15 pois o sistema permite sintonizar o nível frequência ressonante, capaz de manter o pó suspenso e girando durante o tempo de deposição. A quantidade de material magnético a ser depositada também pode ser controlada pela taxa de deposição e o tempo de deposição. Todos  
20 este parâmetros são controláveis precisamente, ampliando o uso deste sistema para qualquer tipo de pó utilizado.

**EXPERIMENTO 1:** utilizada lipase como fonte enzimática e o níquel como material magnético.

A confirmação da presença do níquel depositado na enzima

lipase deu-se medidas de magnetização à temperatura ambiente usando-se magnetômetro de gradiente de campo (AGM). A partir da análise magnética do catalisador pode-se observar conforme a figura 1 que para a lipase pura aparece como esperado, uma resposta diamagnética (círculos abertos). Por outro lado, após a deposição de níquel sobre a lipase, a curva de magnetização apresenta um comportamento ferromagnético típico, com um "loop" de histerese bem definido.

Corrigindo-se o diamagnetismo apresentado pela lipase pura, a magnetização da amostra Lipase + Níquel apresenta uma saturação ao redor de 500 (Oe), com remanência de aproximadamente 60%, valores suficientes para recuperação do catalisador, quando em solução, por um magneto externo.

A fim de se verificar a atuação deste catalisador enzimático magnético, foi medida a atividade de hidrólise desta lipase magnética comparada com a mesma quantidade da lipase livre. Como fonte de triglicerídeo empregado nas reações de hidrólise, foi utilizado o substrato sintético *p*-nitrofenilpalmitato (ácido hexadecanóico *p*-nitrofenil éster - C<sub>22</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>4</sub>).

Uma alíquota (6 mg) da lipase magnética e livre foi misturada a 0,9 mL do substrato (Winkler, U.K., Stuckmann, M. *J. Bacteriol.* 138, 663-670 (1979); Maia, M.M.D., Heasley, A., Moraes, M.M.C., Melo, E.H.M., Moraes, Jr.M.A., Ledingham, W.M., Lima Filho, H.O.J.L.

*Bioresour. Technol.* 76, 23-27 (2001)). Após 10 min de incubação a 40°C, foi realizada a leitura da absorbância a 410 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 2000), sendo utilizado como referência um controle negativo/branco contendo substrato com adição de 6 mg  
5 de níquel metálico.

Uma unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenolpalmitato por minuto nas condições descritas acima. A curva padrão foi construída com *p*-nitrofenolpalmitato dissolvido em água destilada nas  
10 concentrações de 0,1 a 1,0  $\mu$ moles/mL.

Os ensaios foram realizados em duplicata sendo calculados o desvio padrão e a média aritmética entre elas.

Foi analisado também o comportamento deste catalisador magnético frente a sua reutilização no processo de hidrólise. Para  
15 tanto, após o término de cada ensaio, o catalisador foi separado do meio reacional pela aplicação de um campo magnético, adicionado em um novo meio reacional e sua atividade determinada conforme descrito acima.

Foi verificado que a lipase magnética apresentou alta atividade  
20 de hidrólise (232 U/g), sendo recuperado 68% da atividade em relação a enzima sem as partículas magnéticas (339 U/g). Foi observado também que este método propiciou uma alta retenção das partículas magnéticas sobre a enzima, pois o catalisador foi facilmente isolado a

partir de um campo magnético e reutilizado em mais 3 ciclos sem nenhuma perda significativa da atividade (atividade relativa de 99,56% para o 1° reuso, 96,63% para o 2° reuso e 94,61% para o 3° reuso) e por mais 8 ciclos mantendo uma atividade de hidrólise acima de 50%.

5 A lipase magnética foi também empregada em reações de transesterificação do óleo de soja com metanol em sistema em batelada. Na síntese de biodiesel, os óleos vegetais e animais e em particular de soja, principal matéria-prima empregada, é constituído majoritariamente de triglicerídeos, que são derivados de ácidos graxos  
10 contendo diferentes graus de insaturação, sendo eles os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1), linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3).

Os mono-álcoois utilizados para a transesterificação são álcoois de cadeia curta, contendo de 1 a 8 átomos de carbono e no máximo  
15 um grupo hidroxila.

A atividade de transesterificação foi realizada adicionando-se 200 mg da lipase livre e da lipase magnética em uma mistura contendo 10  $\mu$ L de água, 0,05 g (0,057 mmol) de óleo de soja e 0,275 mL (0,685 mmol) de metanol. A mistura foi mantida à 55°C, sob agitação por  
20 24h. Após decantação da mistura, a fase superior contendo o éster foi retirada e analisada por HPLC.

Para análise do comportamento do catalisador enzimático magnético em repetidas reações de transesterificação, ao final da

reação de transesterificação foi aplicado um campo magnético para o isolamento do catalisador e inserção em uma nova reação.

Os produtos reacionais foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em um Shimadzu LC-20A equipado com detector de espalhamento de luz evaporativo (ELSD) e coluna Shim-Pack (C-18, 250 mm, 4,6 mm de diâmetro interno) cuja temperatura foi mantida à 35°C. O volume de injeção de amostra foi de 20  $\mu\text{L}$  e o fluxo de 1  $\text{mL}/\text{min}^{-1}$ . As amostras foram diluídas em 2-propanol:hexano (5:4, v/v). A identificação dos picos foi feita por comparação dos tempos de retenção das amostras e dos compostos padrões (triglicerídeo, diglicerídeo, monoglicerídeo e biodiesel metílico). Um gradiente ternário de 57 min. foi empregado: 30% água + 70% acetonitrila em 0 min, 100% de acetonitrila em 15 min, 50% de acetonitrila e 50% de 2-propanol:hexano (5:4, v/v) em 30 min, seguido de eluição isocrática com 50% de acetonitrila e 50% de 2-propanol:hexano (5:4, v/v) nos últimos 27 min, conforme metodologia desenvolvida por M. Holcapek, P. Jandera, J. Fischer, B. Proles, In: *Journal of Chromatography A* 58 (1999) 13.

Em relação à atividade de transesterificação, foi recuperada 79% da atividade da lipase magnética em relação à enzima sem as partículas magnéticas. Foi observado também uma alta retenção das partículas magnéticas sobre a enzima, pois foi possível isolar facilmente o catalisador a partir de um campo magnético e reutilizá-lo

em mais 3 ciclos, mantendo uma atividade de hidrólise acima de 85% (atividade relativa de 97,44% para o 1° reuso, 87,17% para o 2° reuso e 85,90% para o 3° reuso).

5 Em testes realizados com o catalisador magnético produzido através do processo descrito na presente invenção, utilizando o substrato *p*-nitrofenilpalmitato, no pH 7, temperatura de 40°C por 10 minutos, foi possível observar alta atividade de hidrólise.

Os experimentos 1 e 2 listados na tabela 1 demonstram que o catalisador enzimático magnético produzido através do processo  
10 descrito na presente invenção exibe alta atividade de hidrólise mantendo 68% da atividade comparado com o catalisador na forma livre.

Os experimentos 3 a 11 descrevem os experimentos realizados para se verificar a possibilidade de recuperação e reutilização do  
15 catalisador, com a atividade de hidrólise mantida acima de 50% durante os oito ciclos reacionais testados.

TABELA 1: Atividade de hidrólise de catalisador enzimático magnético

Experimento	Ciclo	Catalisador	Atividade de hidrólise (U/g de catalisador)	Atividade relativa (%)
1 <sup>a</sup>	-	Lipase livre	339	
2 <sup>b</sup>	1°	Lipase + Ni	232	100
3 <sup>c</sup>	2°	Lipase + Ni	230	99,56 ± 0
4 <sup>d</sup>	3°	Lipase + Ni	224	96,63 ± 1,38
5 <sup>e</sup>	4°	Lipase + Ni	220	94,61 ± 1,73
6 <sup>f</sup>	5°	Lipase + Ni	203	87,51 ± 0,37
7 <sup>g</sup>	6°	Lipase + Ni	185	79,69 ± 0,66
8 <sup>h</sup>	7°	Lipase + Ni	150	64,69 ± 3,21
9 <sup>i</sup>	8°	Lipase + Ni	139	60,02 ± 2,72
10 <sup>j</sup>	9°	Lipase + Ni	102	44,12 ± 0,96
11 <sup>k</sup>	10°	Lipase + Ni	63	27,36 ± 3,37

<sup>a</sup>reação realizada com o catalisador enzimático na sua forma livre;

<sup>b</sup>primeira reação realizada com o catalisador enzimático recoberto com níquel;

5 <sup>c</sup>reação realizada com o catalisador recuperado do Experimento 2;

<sup>d</sup>reação realizada com o catalisador recuperado do Experimento 3;

<sup>e</sup>reação realizada com o catalisador recuperado do Experimento 4;

<sup>f</sup>reação realizada com o catalisador recuperado do Experimento 5;

<sup>g</sup>reação realizada com o catalisador recuperado do Experimento 6;

<sup>h</sup>reação realizada com o catalisador recuperado do Experimento 7;

<sup>i</sup>reação realizada com o catalisador recuperado do Experimento 8;

<sup>j</sup>reação realizada com o catalisador recuperado do Experimento 9;

<sup>k</sup>reação realizada com o catalisador recuperado do Experimento 10.

5        Em testes realizados com o catalisador enzimático magnético produzido através do processo descrito na presente invenção, foi possível observar alta atividade de hidrólise, até a décima reação, utilizando como substrato o *p*-nitrofenilpalmitato à temperatura de 40°C por 10 minutos.

10       Os experimentos 12 e 13, listados na tabela 2 demonstram que o catalisador enzimático magnético produzido através do processo descrito na presente invenção exibe alta atividade de transesterificação, mantendo 79% da atividade comparado com o catalisador na forma livre.

15       Os experimentos 14 a 16 permitiram verificar a possibilidade de recuperação e reutilização do catalisador, sendo evidenciado que sua atividade de transesterificação foi mantida acima de 85% durante os 3 ciclos reacionais testados.

TABELA 2: Atividade de transesterificação de catalisador enzimático magnético

Experimento	Ciclo	Catalisador	Conversão total (%)	Atividade relativa (%)
12 <sup>a</sup>	-	Lipase livre	99	
13 <sup>b</sup>	1°	Lipase + Ni	78	100
14 <sup>c</sup>	2°	Lipase + Ni	76	97,44
15 <sup>d</sup>	3°	Lipase + Ni	68	87,17
16 <sup>e</sup>	4°	Lipase + Ni	67	85,90

<sup>a</sup>reação realizada com o catalisador enzimático na sua forma livre;

<sup>b</sup>primeira reação realizada com o catalisador enzimático recoberto com níquel;

<sup>c</sup>reação realizada com o catalisador recuperado do Experimento 13;

<sup>d</sup>reação realizada com o catalisador recuperado do Experimento 14;

<sup>e</sup>reação realizada com o catalisador recuperado do Experimento 15.

Em testes realizados com o catalisador enzimático magnético produzido através do processo descrito na presente invenção, foi possível observar atividade de transesterificação com todas as reações utilizando como matéria-prima o óleo de soja e metanol à temperatura de 55°C por 24 horas.

**REIVINDICAÇÕES:**

1. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CATALISADOR ENZIMÁTICO MAGNÉTICO caracterizado por compreender as etapas de:
  - a) definida a taxa e o tempo de deposição conforme a massa e volume das enzimas, a potência e frequência a ser empregada;
  - b) disposição das enzimas no interior da câmara de evaporação;
  - c) pré-vácuo das enzimas com pressão até  $10^{-3}$  mBar por até 30 minutos;
  - d) vácuo das enzimas a pressão de até  $10^{-11}$  mBar por até 30 minutos;
  - e) pré-sputtering com pressões na faixa de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  mBar;
  - f) deposição das partículas magnéticas na superfície das enzimas mediante agitação em uma frequência entre 5Hz a 1kHz e potência proporcional ao volume total das enzimas.
2. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CATALISADOR ENZIMÁTICO MAGNÉTICO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato das enzimas serem selecionadas dentre aquelas presentes ou isoladas de animais, micro-organismos e plantas.
3. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CATALISADOR ENZIMÁTICO MAGNÉTICO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do material magnético ser selecionado dentre níquel, ferro, ferro-níquel, cobalto ou óxido deste metal.

4. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CATALISADOR ENZIMÁTICO MAGNÉTICO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato das partículas magnéticas apresentarem um diâmetro de 1,0 a 100,0 nm.
- 5 5. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CATALISADOR ENZIMÁTICO MAGNÉTICO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da deposição das partículas magnéticas ocorrer com pressão entre  $10^{-4}$ mbar a  $10^{-1}$ mbar e tensões da ordem de 250V a 1000V.
- 10 6. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CATALISADOR ENZIMÁTICO MAGNÉTICO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de opcionalmente ser utilizado pós enzimáticos.
7. PRODUTO OBTIDO A PARTIR DO PROCESSO REIVINDICADO EM 1, caracterizado pelo fato de prover um catalisador enzimático magnético que compreende o recobrimento de enzimas ou pós enzimáticos com material magnético.
- 15 8. PRODUTO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato do catalisador enzimático magnético ser reutilizado em ciclos reacionais consecutivos.

FIGURAS

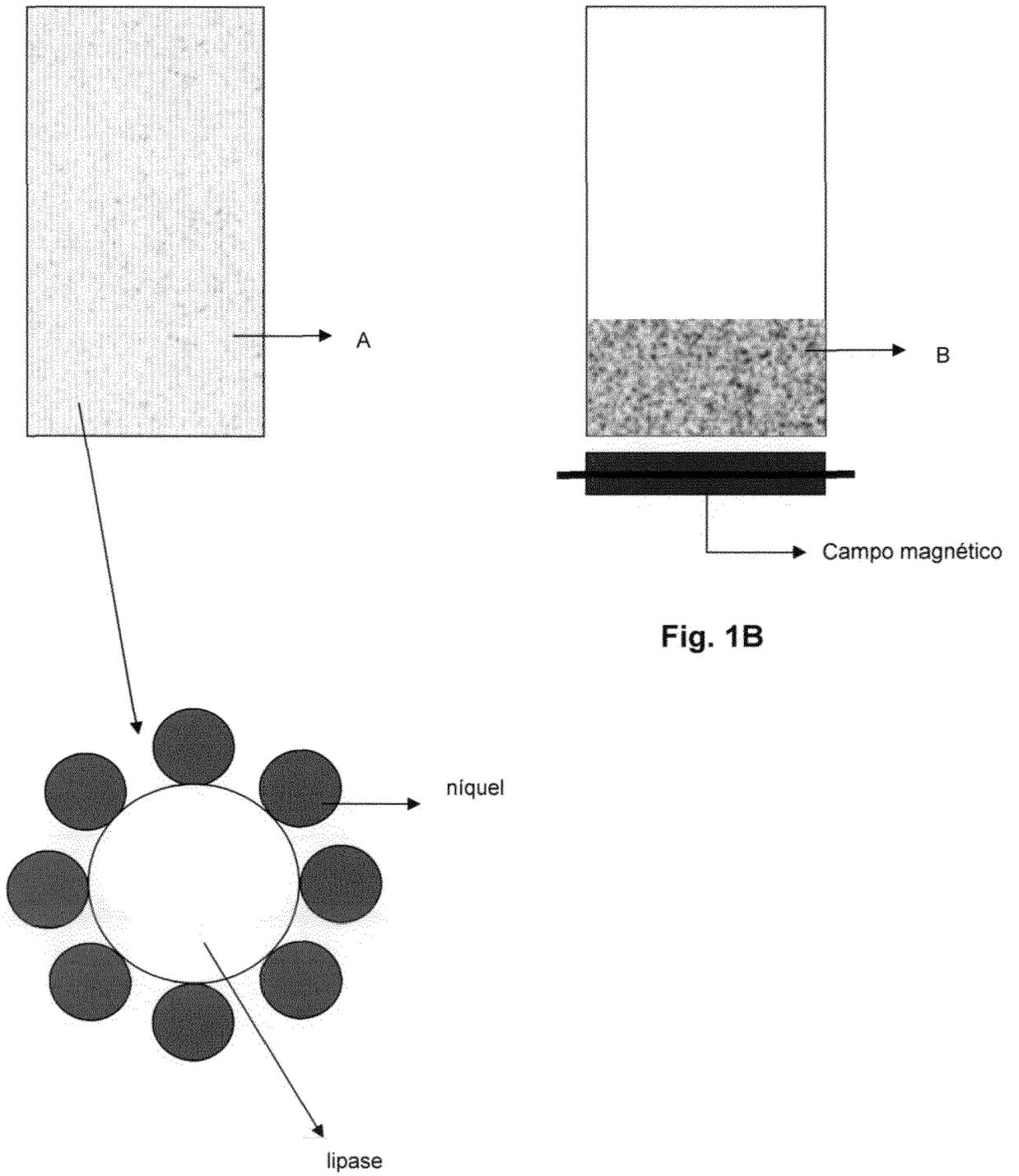


Fig. 1B

Fig. 1A

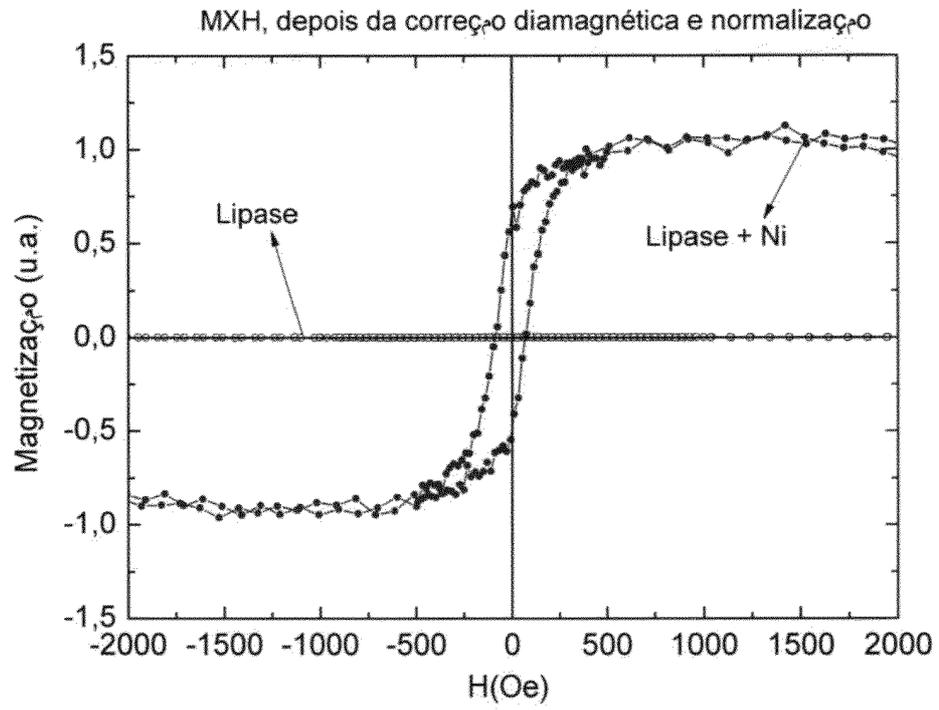


Figura 2

## RESUMO

### PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CATALISADOR ENZIMÁTICO MAGNÉTICO E PRODUTO OBTIDO

É descrito um processo de obtenção de catalisador enzimático  
5 magnético que provê a produção de enzimas magnéticas  
recobertas com material magnético, tornando possível a produção  
de um catalisador enzimático com propriedades magnéticas com  
alta atividade, possibilitando a recuperação do biocatalisador do  
meio reacional através de campo magnético e manutenção da  
10 atividade catalítica por vários ciclos reacionais consecutivos, ao  
contrário dos processos do estado da técnica que envolvem  
diversas etapas de preparação dos biocatalisadores magnéticos,  
sendo necessária, em sua grande maioria, a funcionalização dos  
núcleos magnéticos com compostos que possibilitem uma eficiente  
15 imobilização das enzimas ao suporte magnético.