Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Kelly Cristina Nascimento Rodrigues Pedro

Avaliação da imobilização de preparações enzimáticas contendo lipases e seu emprego em reações de síntese de biodiesel

Rio de Janeiro

2018

Kelly Cristina Nascimento Rodrigues Pedro

Avaliação da imobilização de preparações enzimáticas contendo lipases e seu emprego em reações de síntese de biodiesel

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Orientadoras: Profª. Marta Antunes Pereira Langone

Profª. Cristiane Assumpção Henriques

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

P372 Pedro, Kelly Cristina Nascimento Rodrigues.
Avaliação da imobilização de preparações enzimáticas contendo lipases e seu emprego em reações de síntese de biodiesel/ Kelly Cristina Nascimento Rodrigues Pedro. - 2018.
189 f.

Orientador: Marta Antunes Pereira Langone.
Orientador: Cristiane Assumpção Henriques.

.

Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Biodiesel - Teses. 2. Lipase – Teses. 3. Esterificação (Química) - Teses. I. Langone, Marta Antunes Pereira. II. Henriques, Cristiane Assumpção. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU 662.756.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação.

_____ _____

Assinatura Data

Kelly Cristina Nascimento Rodrigues Pedro

Avaliação da imobilização de preparações enzimáticas contendo lipases e seu emprego em reações de síntese de biodiesel

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Aprovado em 24 de agosto de 2018.

Banca Examinadora:

Profª. Drª Marta Antunes Pereira Langone (Orientadora)
Instituto de Química - UERJ

Profª. Drª Cristiane Assumpção Henriques (Orientadora)
Instituto de Química - UERJ

Prof. Dr. Antônio Carlos Augusto da Costa
Instituto de Química – UERJ

Drª Eliane Pereira Cipolatti
Instituto de Química – UFRJ

Drª Ivone Sampaio Pereira Campisano
Escola de Química - UFRJ

Profª. Drª Márcia Monteiro Machado Gonçalves
Instituto de Química - UERJ

Drª Verônica Regina de Oliveira Lopes
Escola de Química – UFRJ

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

As mulheres da minha vida: minha mãe, Célia Maria Nascimento dos Santos, pelo amor e dedicação incondicionais e minha avó Laurita Maria do Nascimento, que não se encontra mais presente entre nós, sempre me incentivou a não desistir dos meus sonhos. Um exemplo de vida, dedicação e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tudo que tem feito em minha vida, pelo amor incondicional e amparo nos momentos de tristeza.

A minha mãe Célia Maria, pelo amor, carinho, compreensão, incentivo e apoio incondicional durante toda a jornada.

Ao meu irmão Kleber que mesmo sem entender o que acontecia sempre me apoiou e incentivou.

Ao meu marido Diego, pelo carinho, compreensão, paciência e amor a mim dedicados, um verdadeiro companheiro.

As minhas orientadoras, Marta Antunes Pereira Langone e Cristiane Assumpção Henriques, pela paciência, carinho e compreensão, verdadeiros exemplos de competência e experiência, sempre me encorajaram e incentivaram ao longo de todas as etapas do trabalho, desde as aulas até a orientação, meu muito obrigada.

Aos meus familiares, que sempre me incentivaram, compreenderam a minha ausência em várias situações. Obrigado por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus amigos da época da graduação Bruno Gabriel, Fábio, Ivone e Marcos pelo incentivo e pelas palavras amigas em todos os momentos. Obrigada pela amizade.

A minha amiga Camila, pelas palavras encorajadoras e atenção. Muito obrigada pela sua amizade.

A Erika Aguieiras que me ajudou no início do trabalho com ideias e sugestões. Muito obrigada pelas palavras de incentivo, sempre simpática e disposta a ajudar.

A minha mais nova amiga Eliane, pela ajuda com palavras de incentivo e com seu vasto conhecimento acerca da imobilização de enzimas. Um verdadeiro anjo que Deus colocou no meu caminho.

A minha mais nova amiga Rayssa, pela ajuda na parte experimental do trabalho, pelas palavaras de incentivo, alto-astral, uma verdadeira simpatia.

A Luana Fé pela ajuda e palavras de apoio. Sempre simpática e disposta a ajudar.

Aos novos amigos que o LTE me proporcionou Carla, Danielle, Jéssica, Sabrina, Rodrigo, Verônica, Shayanne e Erika, muito obrigada pelas palavras de incentivo, carinho e força. Que nossa amizade dure muitos anos.

A Denise Cândido e Arnaldo muito obrigada pelo carinho, amizade e palavras de incentivo.

Aos secretários da Pós Graduação Marco Antonio da Rocha Coelho e Renata Ximenes pela atenção, incentivo e amizade.

Aos estagiários e ex-estagiários do LTE, Pedro, Igor, Ray-Anna, Fernanda e Leonardo pela ajuda no desenvolvimento da parte experimental, por proporcionarem um ambiente de trabalho alegre e descontraído, pelo apoio e palavras encorajadoras nos momentos de angústia, meu muito obrigada.

Ao técnico do LTE, Otávio.

As professoras Evelin Manoel e Denise Freire por permitirem que a uma parte dos experimentos fosse realizada em seus laboratórios. Muito obrigada pelo acolhimento.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da UERJ pelo apoio e disseminação do conhecimento.

A CAPES pelo apoio financeiro.

E a todos que não foram citados nominalmente, mas que de forma direta ou indireta contribuíram para a elaboração deste trabalho, obrigada.

O seu maior adversário é você mesmo. Prefiro me arriscar fazendo algo que gosto perdidamente do que me sentir perdido por não fazer o que amo.

Rocky Balboa.

RESUMO

PEDRO, Kelly Cristina Nascimento Rodrigues. *Avaliação da imobilização de preparações enzimáticas contendo lipases e seu emprego em reações de síntese de biodiesel*, 2018. 189 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Neste trabalho foi avaliada a imobilização das lipases comerciais CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L, todas da Novozymes Latin America Ltda., e do extrato enzimático aquoso bruto de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em suportes micro- e mesoporosos e seu posterior emprego em reações de síntese de biodiesel. Os efeitos do tipo de lipase, temperatura e teor enzimático foram estudados nas reações de esterificação do ácido oleico e transesterificação do óleo de soja com etanol empregando as preparações enzimáticas em sua forma aquosa. As maiores conversões na esterificação do ácido oleico com o etanol foram 62,3% e 74,2% obtidas a 30°C e empregando 30% $v.v^{-1}$ das lipases CALB e Palatase 20000L, respectivamente. Nas reações de síntese de biodiesel a partir da transesterificação do óleo de soja com etanol o maior rendimento alcançado foi de 97,3% empregando 30ºC e 10% $v.v^{-1}$ de Lipolase 100L. Na imobilização das preparações enzimáticas foram investigados os efeitos do tipo de suporte, da concentração da solução tampão fosfato de sódio, da solução enzimática e do tipo de sistema reacional. As maiores eficiências de imobilização para as lipases CALB (91,4%), Lipolase 100L (99,9%) e o extrato enzimático aquoso bruto de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (62,9%) foram obtidas quando o suporte Siral 40 foi empregado, enquanto que para a Palatase 20000L, o melhor suporte foi a Siral 20 (97,6%). O emprego da solução tampão 100 mM reduziu a eficiência de imobilização das preparações enzimáticas. Independente do tipo de reator empregado foi possível obter eficiências de imobilização superiores a 40%. Os biocatalisadores heterogêneos foram testados na reação de síntese de oleato de etila e verificou-se um aumento da estabilidade térmica do biocatalisador imobilizado em relação à sua forma aquosa. Para a CALB imobilizada em Siral 40, uma conversão de 61,7% foi obtida a 60°C. CALB e Lipolase 100L imobilizadas em Siral 40 e Palatase 20000L imobilizada em Siral 20 puderam ser reutilizadas mantendo cerca de 30% da conversão inicial após 3 bateladas. Os biocatalisadores heterogêneos não mostraram atividade na reação de transesterificação do óleo de soja. O emprego da Palatase 20000L tanto na sua forma aquosa como imobilizada possibilitou que conversões de cerca de 80% fossem alcançadas. Deste modo, este biocatalisador poderia ser utilizado para remoção de ácidos graxos em etapas preliminares de adequação da matéria-prima ácida (óleos ácidos) para síntese de biodiesel.

Palavras-chave: Lipases. Imobilização. Sólidos inorgânicos. Esterificação.

ABSTRACT

PEDRO, Kelly Cristina Nascimento Rodrigues. *Evaluation of the immobilization of enzymatic preparations containing lipases and their use in reactions of biodiesel synthesis*, 2018. 189 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

In this work the immobilization of commercial lipases CALB, Palatase 20000 L and Lipolase 100L all from Novozymes Latin America Ltda., and the crude aqueous enzyme extract of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 on micro- and mesoporous materials and their subsequent use in synthesis reactions of biodiesel. The effects of lipase source, temperature and enzymatic content were studied in the esterification reactions of oleic acid and transesterification of soybean oil with ethanol using the enzymatic preparations in their aqueous form. The highest conversions in the esterification of oleic acid with ethanol were 62.3% and 74.2% obtained at 30°C and employing 30% $v.v^{-1}$ of CALB and Palatase 20000L, respectively. In the reactions of biodiesel synthesis from the transesterification of soybean oil with etanol the highest yield was 97.3% using 30°C and 10% $v.v^{-1}$ of Lipolase 100L. In the immobilization of enzyme preparations the effects of the type of support, sodium phosphate buffer solution concentration, enzyme concentration and the type of reaction system were investigated. The highest immobilization efficiencies for CALB (91.4%), Lipolase 100L (99.9%) and the crude aqueous enzyme extract of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (62.9%) were obtained when the Siral 40 support was employed, while for Palatase 20000L, the best support was Siral 20 (97.6%). The use of the 100 mM phosphate buffer decreased the immobilization efficiency of the enzyme preparations. Regardless of the type of reactor employed, it was possible to obtain immobilization efficiencies above 40%. Heterogeneous biocatalystswere tested in the reaction of ethyl oleate synthesis and an increase in the thermal stability of the immobilized biocatalyst was observed relative to its aqueous form.For CALB immobilized in Siral 40, conversion of 61.7% was obtained at 60°C. CALB and Lipolase 100L immobilized on Siral 40 and Palatase 20000L immobilized on Siral 20 could be reused while maintaining about 30% of the initial conversion after 3 batchings. Heterogeneous biocatalysts showed no activity in the transesterification reaction of soybean oil. The use of Palatase 20000L in both its aqueous and immobilized form enabled conversions of about 80% to be achieved. Thus, this biocatalyst could be used for the removal of fatty acids in preliminary stages of suitability of the acidic raw material (acid oils) for synthesis of biodiesel.

Keywords: Lipases. Immobilization. Inorganic solids. Esterification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de biodiesel[1]- B100 por estado e produtor[2] – 2006-2017 (m³).....30
Figura 2 - Perfil nacional de matérias-primas consumidas para produção de biodiesel[1].....30
Figura 3 - Reação geral de transesterificação.....40
Figura 4- Reação de esterificação do ácido graxo com álcool.....44
Figura 5 - Reações catalisadas por lipases.....50
Figura 6 - Representação do padrão de conformação comum da α/β hidrolase..... 51
Figura 7 - Estrutura da lipase de *Rhizomucor miehei*..... 52
Figura 8 - Estrutura da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em suas formas fechada e aberta. 52
Figura 9 - Mecanismo da hidrólise enzimática de um éster.....54
Figura 10 - Notação de Cleland empregada para descrever o mecanismo Ping Pong bi bi com dois substratos..... 55
Figura 11 - Representação da lipase B de *Candida antarctica* na forma de fita e superfície...57
Figura 12 - Sítio ativo da CALB 58
Figura 13 - Estrutura tridimensional da lipase de *Rhizomucor miehei* na conformação aberta (a) e conformação fechada (b)..... 60
Figura 14 - Representação gráfica tridimensional da estrutura da lipase *Thermomyces lanuginosus*..... 62
Figura 15 - Estrutura da lipase de *Yarrowia lipolytica* onde são descritas a tampa, as estruturas proteicas e os resíduos que constituem a tríade catalítica.....64
Figura 16 - Lipase de *Yarrowia lipolytica* nas suas conformações aberta (a) e fechada (b).....64
Figura 17 - Tipos de imobilização de enzimas..... 68
Figura 18 - Características importantes da enzima e do suporte que devem ser observadas no processo de imobilização de enzimas..... 69
Figura 19 - Imobilização de lipases por adsorção hidrofóbica.....72
Figura 20 - Estrutura dos tetraedros AlO_4^- e SiO_4^- nas zeólitas..... 75
Figura 21 - Vista da abertura da abertura dos canais retilíneos da ZSM-5.....78
Figura 22 - Estrutura tridimensional de poros na zeólita ZSM-5..... 78
Figura 23 - Estrutura do material mesoporoso MCM-41.....80
Figura 24 - Placa agitadora de rolos.....97
Figura 25 - Incubadora com agitação orbital.....97
Figura 26 - Sistema reacional com reator batelada.....103
Figura 27 - Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 10% $v.v^{-1}$da lipase comercial líquida CALB..... .111
Figura 28 - Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 10% $v.v^{-1}$da lipase comercial líquida Palatase 20000L.....112
Figura 29 - Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 10% $v.v^{-1}$da lipase comercial líquida Lipolase 100L..... 113
Figura 30 - Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 20% $v.v^{-1}$da lipase líquida de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.....114

Figura 31 - Avaliação da concentração enzimática (5, 10, 20, 30 e 40% $v.v^{-1}$) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30°C e a lipase comercial líquida CALB..... 115
Figura 32 - Avaliação da concentração enzimática (5, 10, 20, 30 e 40% $v.v^{-1}$) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30°C e a lipase comercial líquida Palatase 20000L.....116
Figura 33 - Avaliação da concentração enzimática (5, 10, 20, 30 e 40% $v.v^{-1}$) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30°C e a lipase comercial líquida Lipolase 100L..... 116
Figura 34 - Avaliação da concentração enzimática (5, 10, 20, 30 e 40% $v.v^{-1}$) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30°C e a lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.....117
Figura 35 - Efeito da temperatura na reação de transesterificação do óleo de soja com o etanol, empregando razão molar óleo de soja: etanol 1:3, adição escalonada do etanol (1/3 do volume total adicionado nos tempos 0, 0,5, 1 h) e 1000 U de atividade de esterificação das lipases comerciais líquidas ([a] Palatase 20000L e [b] Lipolase 100L).....119
Figura 36 - Efeito da concentração enzimática (% $v.v^{-1}$) na reação de transesterificação do óleo de soja com o etanol, empregando razão molar óleo de soja: etanol 1:3, adição escalonada do etanol (1/3 do volume total adicionado nos tempos 0, 0,5, 1 h), a 30°C ([a] Palatase 20000L e [b] Lipolase 100L)..... 121
Figura 37 - Efeito da acidez na reação de transesterificação do óleo de soja com o etanol, empregando razão molar óleo: etanol 1:3, ácido oleico:etanol 1:1, adição escalonada do etanol (1/3 do volume total adicionado nos tempos 0, 0,5, 1 h), a 30°C e 10% $v.v^{-1}$ das lipases comerciais líquidas ([a] CALB, [b] Palatase 20000L e [c] Lipolase 100L).....123
Figura 38 - Conversão do ácido oleico obtida nas reações de transesterificação do óleo ácido (IAs 8,5; 50 e 90) empregando as lipases comerciais CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L, após 4 h. Condições reacionais: 30°C, 10% $v.v^{-1}$ de lipase, razão molar óleo: etanol 1:3, ácido oleico:etanol 1:1, adição escalonada do etanol (1/3 do volume total adicionado nos tempos 0, 0,5, 1 h).....125
Figura 39 - Distribuição de diâmetro de poros dos suportes mesoporosos 127
Figura 40 - Efeito do tipo de suporte na eficiência de imobilização das lipases comerciais líquidas ([a] CALB, [b] Palatase 20000L e [c] Lipolase 100L), empregando 10 mL da solução enzimática (diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0) com 1 g de suporte, a temperatura ambiente (25±1°C).....129
Figura 41 - Efeito do tipo de suporte na eficiência de imobilização da lipase de*Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, empregando 10 mL da solução enzimática (diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0) com 1 g de suporte, a temperatura ambiente (25±1°C). 132
Figura 42 - Efeito da concentração do tampão fosfato pH 7 (5 mM e100 mM) na eficiência de imobilização das lipases comerciais líquidas (CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L) e lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, empregando 10 mL da solução enzimática (diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio pH 7,0) com 1 g de Siral 40, a temperatura ambiente (25±1°C).....135
Figura 43 - Efeito do pH da solução do tampão fosfato 5 mM (pH 7 ou 11) na eficiência de imobilização das lipases comerciais líquidas (CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L) e lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, empregando 10 mL da solução enzimática (diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio) com 1 g de Siral 40, a temperatura ambiente (25±1°C)..... 136

Figura 44 - Efeito do tipo de agitação na eficiência de imobilização das lipases comerciais líquidas (CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L) e lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, empregando 10 mL da solução enzimática (diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0) com 1 g de suporte.....137
Figura 45 - Efeito da concentração de proteína na eficiência de imobilização das lipases comerciais líquidas ([a] CALB, [b] Palatase 20000L e [c] Lipolase 100L), empregando 10 mL da solução enzimática (diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0) com 1 g de suporte (Siral 40 (para as lipases CALB e Lipolase 100L) e Siral 20 (para a Palatase 20000L)), a temperatura ambiente (25±1°C).....139
Figura 46 - Quantidade de proteína adsorvida pelo suporte na imobilizaçãodas lipases comerciais líquidas ([a] CALB, [b] Palatase 20000L e [c] Lipolase 100L), empregando 10 mL da solução enzimática (diluída em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0) com 1 g de suporte (Siral 40 (para as lipases CALB e Lipolase 100L) e Siral 20 (para a Palatase 20000L)), a temperatura ambiente (25±1°C).....140
Figura 47 - Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 20% $m.m^{-1}$da lipase CALB imobilizada em Siral 40..... 142
Figura 48 - Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 20% $m.m^{-1}$da lipase Palatase 20000L imobilizada em Siral 20..... 143
Figura 49 - Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 20% $m.m^{-1}$da lipase Lipolase 100L imobilizada em Siral 40.....143
Figura 50 - Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 20% $m.m^{-1}$da lipase *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 imobilizada em Siral 40.....145
Figura 51 - Avaliação da concentração enzimática (3, 10 e 20% $m.m^{-1}$) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30°C e a lipase CALB imobilizada em Siral 40.....147
Figura 52 - Avaliação da concentração enzimática (3, 10 e 20% $m.m^{-1}$) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30°C e a lipase Palatase 20000L imobilizada em Siral 20.....148
Figura 53 - Avaliação da concentração enzimática (3, 10 e 20% $m.m^{-1}$) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30°C e a lipase Lipolase 100L imobilizada em Siral 40.....148
Figura 54 - Avaliação da concentração enzimática (3, 10 e 20% $m.m^{-1}$) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30°C e a lipase *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 imobilizada em Siral 40.....149
Figura 55 - Avaliação da reutilização do biocatalisador na conversão de ácido oleico na reação de esterificação com o etanol, empregando razão molar etanol:ácido oleico =1, 20% $m.m^{-1}$ das lipases imobilizadas CALB, Palatase 20000L, Lipolase 100L e *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, após 30 min a 30°C.....150
Figura 56 - Espectro FTIR do ácido oleico, do etanol, suporte Siral 40, da lipase CALB em sua forma livre e imobilizada na Siral 40, após ser utilizada na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol e do meio reacional após a retirada da enzima imobilizada 154
Figura 57 - Espectro FTIR do ácido oleico, do etanol, do suporte Siral 20, da lipase Palatase 20000L em sua forma livre e imobilizada na Siral 20, após ser utilizada na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol e do meio reacional após a retirada da enzima imobilizada..... 154

Figura 58- Espectro FTIR do ácido oleico, do etanol, do suporte Siral 40, da lipase Lipolase 100L em sua forma livre e imobilizada na Siral 40, após ser utilizada na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol e do meio reacional após a retirada da enzima imobilizada.....155
Figura 59 - Espectro FTIR do ácido oleico, do etanol, do suporte Siral 40, da lipase *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em sua forma livre e imobilizada na Siral 40, após ser utilizada na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol e do meio reacional após a retirada da enzima imobilizada..... 155
Figura 60 - Efeito da concentração enzimática na reação de transesterificação do óleo de soja com o etanol, empregando razão molar óleo de soja: etanol 1:3, adição escalonada do etanol (1/3 do volume total adicionado nos tempos 0, 0,5, 1 h), a 30°C e as lipases CALB imobilizada em Siral 40, Palatase 20000L imobilizada em Siral 20 e Lipolase 100L imobilizada em Siral 40.....158
Figura 61 - Curva padrão de p-nitrofenol para dosagem de atividade de lipase 188
Figura 62 - Curva padrão de BSA para dosagem de proteína.....189

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção de biodiesel em alguns países no período de 2012 a 2016.....29
Tabela 2 - Comparação das matérias-primas selecionadas usadas para a produção de biodiesel.....32
Tabela 3 – Teor de ácidos graxos constituintes do óleo extraído de algumas espécies de oleaginosas brasileiras.....34
Tabela 4 – Produtividade e acidez de alguns óleos produzidos por plantas cultivadas no Brasil com potencial para produção de biodiesel 35
Tabela 5 – Comparação dos métodos químico e enzimático para a produção de biodiesel....39
Tabela 6 – Reações de transesterificação empregando enzimas imobilizadas.....41
Tabela 7 – Reações de esterificação empregando enzimas imobilizadas.....45
Tabela 8 – Comparação geral entre as diferentes técnicas de imobilização de enzimas.....69
Tabela 9 – Algumas lipases comerciais imobilizadas usadas para a produção de biodiesel...71
Tabela 10 – Classificação das zeólitas de acordo com o diâmetro de poros.....76
Tabela 11 – Características químicas típicas e propriedades físicas dos Sirais.....81
Tabela 12 – Preço das lipases comerciais líquidas e imobilizadas.....86
Tabela 13 – Preço de alguns suportes empregados na imobilização de lipases.....87
Tabela 14 – Teor proteico e atividade enzimática das lipases testadas.....110
Tabela 15– Atividade enzimática das lipases comercias imobilizadas.....110
Tabela 16– Caracterização textural dos suportes empregados na imobilização das lipases comerciais líquidas.....126
Tabela 17– pH final da solução após a adição do suporte ao tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7. 128
Tabela 18 – Rendimento de imobilização para os melhores suportes. 133
Tabela 19 – Atividades retidas para as lipases imobilizadas nos melhores suportes.....134
Tabela 20 – Atribuições das bandas obervadas nos espectros do ácido oleico, do etanol, do meio reacional, dos suportes Siral 20 e Siral 40 e das enzimas estudadas..... 157

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACS	Advanced Chemicals Supplier
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível
ASAP	Accelerated Surface Area and Porosity
ATR	Atenuated Total Reflectance
BET	Brunauer Emmett Teller
BJH	Barrett Joyner e Halenda
CENPES	Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello
DRX	Difratometria de Raios X
EDS	Espectroscopia por energia dispersiva
EIA	Energy Information Administration
FAU	Faujasita
FRX	Espectrometria de fluorescência de raios X
FTIR	Fourier-Transform Infrared Spectroscopy
IA	Índice de Acidez
MCM	Mobil Composition of Mater
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MME	Ministério das Minas e Energia
PBR	Packed Bed Reactor
PEL	Preparado Enzimático Líquido
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
SAR	Razão SiO_2/Al_2O_3
TAG	Triacilglicerol
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstron
Al	Alumínio
Asp	Ácido aspártico
ºC	Grau Celsius
cm	Centímetro
Da	Dalton
Fe	Ferro
g	Grama
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
h	Hora
ha	Hectare
His	Histidina
k	Kilo
kg	Quilograma
L	Litro
M	Mega
m	Massa
m	Metro
m^2	Metro quadrado
m^3	Metro cúbico
µ	Micro
µL	Microlitro
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmols	Mili mols
nm	Nanômetro
Pa	Pascal
pH	Potencial hidrogeniônico

pI	Ponto isoelétrico
rpm	Rotação por minuto
Ser	Serina
Si	Silício
t	Tonelada
Trp	Triptofano
V	Volt
v	Volume
W	Watts
>	Maior que
<	Menor que
%	Porcentagem

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	22
1	**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**	27
1.1	**Biodiesel**	27
1.1.1	Produção de biodiesel	28
1.1.2	Matérias-primas para a produção de biodiesel	31
1.1.2.1	Matérias-primas ácidas para a produção de biodiesel	33
1.1.2.2	Tratamentos das matérias-primas ácidas empregadas na produção de biodiesel	36
1.2	**Produção de biodiesel**	38
1.2.1	Transesterificação	39
1.2.2	Esterificação	43
1.3	**Lipases**	46
1.3.1	Fontes de lípases	47
1.3.2	Propriedades	48
1.3.3	Reações catalisadas por lípases	50
1.3.4	Estrutura	51
1.3.5	Mecanismo catalítico	53
1.3.6	Cinética	55
1.3.7	Lipases empregadas para síntese de biodiesel	56
1.3.7.1	Lipase de Candida antarctica do tipo B (CALB)	56
1.3.7.2	Lipase de Rhizomucor miehei	59
1.3.7.3	Lipase de Thermomyces lanuginosus	61
1.3.7.4	Lipase de Yarrowia lipolytica	62
1.4	**Imobilização de enzimas**	65
1.4.1	Métodos de imobilização	67
1.4.2	Suportes para imobilização de enzimas	73
1.4.2.1	Zeólitas	75
1.4.2.1.1	ZSM-5	77
1.4.2.2	Sílicas mesoporosas	78
1.4.2.2.1	MCM-41	79
1.4.2.3	Sílicas aluminas	80
1.4.2.4	Emprego de zeólitas, peneiras moleculares e sirais como suporte para imobilização de lípases	81

2 **Materiais e Métodos**..... 88

2.1 **Materiais**..... 88

2.1.1 Reagentes..... 88

2.1.2 Equipamentos..... 88

2.1.3 Enzimas..... 89

2.1.4 Suportes..... 90

2.2 **Métodos**..... 90

2.2.1 Caracterização dos suportes..... 90

2.2.1.1 Espectrometria de fluorescência de raios X (FRX)..... 90

2.2.1.2 Difratometria de raios X (DRX)..... 91

2.2.1.3 Análise textural..... 91

2.2.1.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)..... 91

2.2.2 Determinação da atividade enzimática de esterificação..... 92

2.2.3 Determinação do índice de acidez..... 94

2.2.4 Imobilização das preparações enzimáticas contendo lípases..... 95

2.2.4.1 Efeito do tipo de suporte..... 95

2.2.4.2 Efeito da concentração da solução tampão fosfato..... 96

2.2.4.3 Efeito do pH da solução tampão fosfato de sódio..... 96

2.2.4.4 Efeito do tipo de sistema reacional..... 97

2.2.4.5 Efeito do teor proteico..... 98

2.2.5 Determinação da atividade hidrolítica..... 98

2.2.6 Determinação da concentração de proteínas..... 99

2.2.7 Cálculo da eficiência de imobilização..... 100

2.2.8 Cálculo do rendimento de imobilização..... 100

2.2.9 Cálculo da retenção de atividade..... 101

2.2.10 Cálculo da quantidade de proteína adsorvida ao suporte..... 101

2.2.11 Síntese de oleato de etila..... 102

2.2.11.1 Efeito da temperatura..... 103

2.2.11.2 Efeito da concentração de enzima..... 104

2.2.11.3 Reutilização da enzima imobilizada..... 104

2.2.11.4 Determinação da conversãode ácido oleico por volumetria de neutralização. 104

2.2.12 Caracterização das lipases líquidas e do meio reacional obtido após a síntese de oleato de etila empregando as lipases imobilizadas..... 105

2.2.13 Síntese de biodiesel..... 105

2.2.13.1 Efeito da temperatura..... 106
2.2.13.2 Efeito da concentração de enzima..... 106
2.2.13.3 Efeito do índice de acidez..... 107
2.2.13.4 Análise cromatográfica..... 107
3 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**..... 109
3.1 **Caracterização das lípases**..... 109
3.2 **Reações de síntese de oleato de etila**..... 110
3.2.1 Efeito da temperatura..... 111
3.2.2 Efeito da concentração enzimática..... 115
3.3 **Reações de transesterificação**..... 117
3.3.1 Efeito da temperatura..... 118
3.3.2 Efeito da concentração enzimática..... 120
3.3.3 Efeito da acidez..... 122
3.4 **Imobilização por adsorção**..... 125
3.4.1 Tipo de suporte..... 125
3.4.1.1 Rendimento de imobilização..... 133
3.4.1.2 Atividade retida..... 134
3.4.2 Efeito da concentração e do pH da solução tampão fosfato empregada naimobilização..... 134
..
3.4.3 Efeito do tipo de sistema reacional empregado na imobilização..... 137
3.4.4 Efeito da concentração de proteína da preparação enzimática empregada na imobilização..... 138
3.5 **Reações de síntese de oleato de etila empregando as preparações enzimáticas imobilizadas**..... 141
3.5.1 Efeito da temperatura..... 141
3.5.2 Efeito da concentração enzimática..... 146
3.5.3 Reutilização do biocatalisador..... 150
3.5.3.1 Espectroscopia no infravermelho..... 153
3.6 **Reações de transesterificação empregando as preparações enzimáticas imobilizadas**..... 157
CONCLUSÕES..... 160
SUGESTÕES..... 162
REFERÊNCIAS..... 163
APÊNDICE A Curva padrão para determinação da atividade hidrolítica... 188
APÊNDICE B Curva padrão para determinação da concentração de proteína..... 189

INTRODUÇÃO

Para atender a crescente demanda por energia de forma sustentável, cresce a motivação pelo desenvolvimento de tecnologias que utilizem fontes de energia renováveis e que possam substituir os combustíveis fósseis. Neste contexto, os biocombustíveis emergem como uma fonte alternativa de energia, e de modo especial ressalta-se o papel do biodiesel (ATABANI et al., 2014; AGHBASHLO et al., 2016; HOSSEINPOUR et al., 2016).

O biodiesel pode ser obtido a partir da transesterificação de óleos vegetais e da esterificação de ácidos graxos com álcoois de cadeia curta (BRAHMKHATRI e PATEL, 2011; TALEBIAN-KIAKALAIEH, AMI e MAZAHERI, 2013; YIN et al., 2013).

A rota convencional de produção de biodiesel consiste na transesterificação de óleos vegetais com metanol ou etanol utilizando catalisadores homogêneos alcalinos (NaOH ou KOH), com geração de glicerol como coproduto (JEGANNATHAN, ENG-SENG e RAVINDRA, 2011). Existe uma restrição quanto à matéria-prima empregada na rota convencional, uma vez que esta deve ser essencialmente anidra e possuir um teor de ácidos graxos livres menor que 0,5% $m.m^{-1}$. A presença de ácidos graxos livres promove a reação de neutralização com o catalisador básico, que ocasiona a formação de sabão e pode ocasionar a perda de catalisador (GHALY et al., 2010; PATEL, BRAHMKHATRI e SINGH, 2013), além de aumentar a viscosidade. O aumento da viscosidade dificulta o processo de separação do biodiesel ao final da reação, reduz o rendimento e gera um elevado volume de efluentes (GHALY et al., 2010; PATEL, BRAHMKHATRI e SINGH, 2013).

A utilização de óleos refinados como matéria-prima na síntese de biodiesel é responsável por cerca de 60-75% do custo total do processo de produção desse biocombustível (TAKASE et al., 2015). Por outro lado, se a matéria-prima possuir um teor de ácidos graxos livres maior do que o especificado, é necessária a remoção dos mesmos, empregando uma etapa preliminar de esterificação, normalmente catalisada por ácidos, que também acarreta em um aumento do custo do processo (GOG et al., 2012; CHRISTOPHER, KUMAR e ZAMBARE).

A síntese de biodiesel a partir de matérias-primas com elevado teor de ácidos graxos livres empregando lipases (triacilglicerol éster hidrolases - EC 3.1.1.3) apresenta algumas vantagens em relação ao processo químico convencional. Matérias-primas com alto teor de ácidos graxos livres como o óleo de fritura, os óleos não comestíveis e as gorduras animais

têm menor custo do que os óleos vegetais refinados (BERCHMANS e HIRATA, 2008; GOYAL, SHARMA e JAIN, 2012).

As lipases são capazes de catalisar tanto as reações de transesterificação dos triacilgliceróis, como de esterificação dos ácidos graxos livres presentes na matéria-prima ácida. Desta forma, seu uso como catalisador evitaria etapas preliminares de remoção dos ácidos graxos livres, necessárias para a produção de biodiesel a partir de óleos ácidos usando a catálise alcalina (CESARINI, DIAZ e NIELSEN, 2013; CESARINI et al., 2014; CHRISTOPHER, KUMAR e ZAMBARE, 2014; AGUIEIRAS, CAVALCANTI-OLIVEIRA e FREIRE, 2015; CESARINI et al., 2015).

As reações catalisadas por lipases podem ser conduzidas em condições brandas de temperatura e pressão, é gerado um menor volume de produtos secundários e efluentes, já que as enzimas são catalisadores altamente seletivos (ROBLES-MEDINAet al., 2009; LEE et al., 2011; GULDHE et al., 2015). Quanto à recuperação dos produtos, esta é mais fácil, independente do teor de água e de ácidos graxos livres presentes (LEE et al., 2011; GULDHE et al., 2015). A produção de biodiesel utilizando lipases emprega quantidades estequiométricas de álcool em relação à quantidade de óleo, o que proporciona economia no reagente e nos custos de energia.

Entretanto, uma das principais desvantagens do processo enzimático é o custo do biocatalisador. Geralmente, a síntese de biodiesel é estudada empregando lipases comerciais imobilizadas (BAJAJ et al., 2010; TAN et al., 2010; GOG et al., 2012; AARTHY et al., 2014; AMINI et al., 2017), que apresentam um custo significativo para o produto final.

No entanto, preparações enzimáticas líquidas contendo lipases também podem ser usadas para síntese de biodiesel e apresentam menor custo em relação às suas correspondentes preparações imobilizadas. Uma vez que se tratam de extratos enzimáticos brutos, onde não há custo com purificação. Além disso, o processo é conduzido em uma única fase (processo homogêneo), evitando problemas de transferência de massa. As lipases comerciais líquidas podem ser removidas do meio reacional junto com o glicerol e a água e, deste modo, podem ser separadas e reutilizadas (NIELSEN e RANCKE, 2011).

Dentre as estratégias que têm sido estudadas para obtenção de biocatalisadores de menor custo para síntese de biodiesel, destacam-se a imobilização de lipases comerciais em diferentes suportes (MENDES et al., 2011a; JACOBY et al., 2013; POPPE et al., 2013; VASCONCELLOS et al., 2015; ZHAO et al., 2015; LIN et al., 2014; BABAKI et al., 2016; TACIAS-PASCACIO, et al., 2017), ou mesmo a produção dessas enzimas a partir de microrganismos não convencionais (OLIVEIRA et al., 2006), visando obter lipases com

propriedades (atividade, seletividade, estabilidade) mais adequadas ao processo. Neste caso, citam-se as lipases produzidas por *Yarrowia lipolytica*, que apresentam atividade catalítica em reações de esterificação e de transesterificação (LIN et al., 2014; MENG et al, 2011).

Enzimas imobilizadas podem ser utilizadas em processos contínuos (HALIM et al., 2009; WANG et al., 2011a; MATTE et al., 2016) e são facilmente recuperadas do meio reacional para serem reutilizadas. A imobilização de enzimas pode ser realizada utilizando vários métodos. Dentre todas as técnicas de imobilização disponíveis, a adsorção é o método mais simples, de fácil operação, de baixo custo, sendo o mais empregado industrialmente e pode resultar em uma elevada atividade catalítica (SUN et al., 2010; ZHANG et al., 2012; GAO et al., 2013). Além disso, a enzima não precisa ser quimicamente modificada para ser imobilizada, o que poderia provocar sua desnaturação, e possibilita o emprego de preparações enzimáticas brutas (HANEFELD, GARDOSSI e MAGNER, 2009).

A escolha do suporte, além do método de imobilização, é essencial para o desenvolvimento de biocatalisadores eficientes industrialmente. Dentre os suportes citados na literatura destacam-se: sílica, poliuretano, poliestireno, PHBV, polipropileno, POS-PVA, nanopartículas de Fe_3O_4, alumina, zeólitas, dentre outros (BON, FERRARA e CORVO, 2008). Uma condição essencial para a escolha do suporte é a necessidade do mesmo ter área específica elevada. Isto pode ser alcançado com materiais de pequeno tamanho de partícula, embora possa dificultar a sua separação, ou com materiais altamente porosos, com poros de dimensões suficientemente grandes, que não limitem a difusão dos substratos (HANEFELD, GARDOSSI e MAGNER, 2009).

Sílica-aluminas, tais como as da série Siral e a peneira molecular MCM-41, possuem elevado potencial de aplicação como suportes para imobilização de enzimas devido à elevada estabilidade térmica e mecânica e a possibilidade de modificação da superfície por meio da utilização de um aditivo, e desta forma influenciar na área superficial, porosidade, disponibilidade de grupamentos funcionais. Alguns suportes inorgânicos utilizados na imobilização de lipases são: sílica mesoporosa (GUSTAFSSON et al., 2012; WANG et al., 2012; YU et al. 2013); sílica mesoporosa amorfa (WANG et al., 2011b); sílica mesoporosa comercial (CANILHO et al., 2013); celite (ALLOUE et al., 2008); hidrotalcita (YAGIZ, KAZAN e AKIN, 2007); zeólitas comerciais: 13-X, 5A, FM-8 e AW-300 (YAGIZ, KAZAN e AKIN, 2007); ZSM-5 (MITCHELL e PÉREZ-RAMIREZ, 2011); MCM-36 (DUMITRIU et al., 2003); MCM-22 (DUMITRIU et al., 2003; CALGAROTO et al., 2011); MCM-41 (MACARIO et al., 2002; MACARIO et al., 2005; MACARIO et al., 2009; MITCHELL e PÉREZ-RAMIREZ, 2011; LIN et al., 2014); SBA-15 (CAI et al., 2016; SALIS et al., 2010;

ZOU et al., 2010) e nanopartícula de Fe_3O_4 (MEHRASBI et al., 2017; ANDRADE et al., 2010).

Não existe um método ou suporte mais adequado, sendo necessária a avaliação de diferentes estratégias de imobilização para obtenção de um biocatalisador altamente ativo e estável para um dado processo (RODRIGUES et al., 2013).

Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo principal o estudo da imobilização das lipases comerciais líquidas CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L (*Novozymes Latin America Ltda*) e do extrato enzimático de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em materiais microporosos (zeólitas HZSM-5 com SAR 25 e 280) e mesoporosos (Siral 10, 20 e 40 e MCM-41) e seu emprego em reações de esterificação e de transesterificação para síntese de biodiesel, visando obter um biocatalisador eficiente e de menor custo.

Dentre os objetivos específicos destacam-se:

- Caracterização das lipases líquidas (atividade e concentração de proteína);

- Caracterização dos suportes de imobilização (composição química, natureza das fases presentes e características texturais);

- Avaliação das lipases comerciais líquidas (CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L) e da preparação enzimática líquida de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 na síntese de oleato de etila, a partir da esterificação de ácido oleico e etanol, avaliando os efeitos da temperatura e da concentração de enzima;

- Avaliação das lipases comerciais líquidas (CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L) e da preparação enzimática líquida de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 na síntese de biodiesel, a partir da transesterificação de óleo de soja com etanol, avaliando os efeitos da temperatura, da concentração de enzima e da acidez do óleo;

- Estudo do processo de imobilização, pelo método de adsorção, das lipases comerciais líquidas (CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L) e da preparação enzimática líquida de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em diferentes suportes inorgânicos: materiais microporosos (zeólitas HZSM-5 com SAR 25 e 280) e mesoporosos (Siral 10, 20 e 40 e MCM-41);

- Avaliação dos efeitos da concentração (5 mM e 100 mM) e do pH da solução tampão fosfato (pH 7 e pH 11), do tipo de sistema reacional (placa agitadora de rolos e incubadora com agitação orbital) e da concentração de proteína da preparação enzimática empregadano processo de imobilização das lipases comerciais líquidas CALB, Palatase 20000L e Lipolase

e do extrato enzimático de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 no melhor suporte determinado pelos ensaios anteriores;

- Determinação da performance do melhor biocatalisador imobilizado obtido em reações de síntese de oleato de etila, a partir da esterificação de ácido oleico e etanol, avaliando os efeitos da temperatura e da concentração de enzima imobilizada;

- Reutilização do biocatalisador imobilizado em reações de síntese de oleato de etila;

- Determinação da performance do biocatalisador imobilizado obtido em reações de transesterificação de óleo de soja com etanol, avaliando o efeito da concentração de enzima imobilizada.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Existem várias razões para a introdução do biodiesel como uma alternativa aos combustíveis fósseis derivados do petróleo, dentre elas a diminuição na emissão de certos poluentes (monóxido de carbono (CO), material particulado (MP), óxido de enxofre (SOx), dos hidrocarbonetos totais (HC) e de grande parte dos hidrocarbonetos tóxicos que apresentam potencial cancerígeno), bem como seu potencial renovável.

Nesta revisão bibliográfica serão abordados os fatores relevantes para a produção de biodiesel como a escolha da matéria-prima empregada e sua composição, os diferentes processos de produção empregados, ressaltando o processo enzimático utilizando lipases, assim como o processo de imobilização destes biocatalisadores.

1.1 Biodiesel

O biodiesel é um combustível renovável, que pode ser obtido a partir de vários resíduos agroindustriais, é biodegradável e não tóxico (HUANG et al., 2015).

A Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira. Biodiesel foi a denominação aplicada a qualquer combustível alternativo de natureza renovável que possa oferecer vantagens socioambientais ao ser empregado na substituição total ou parcial do diesel de petróleo, em motores de ignição por compressão interna (motores do ciclo Diesel). Esta definição, bastante ampla, incluía diversas opções tecnológicas, como o uso de óleos vegetais *in natura*; misturas binárias óleo/diesel, álcool/diesel e ésteres/diesel; micro emulsões; hidrocarbonetos derivados da pirólise de biomassa vegetal como o bagaço de cana-de-açúcar; óleos vegetais craqueados (ou derivados do craqueamento termocatalítico); e misturas ternárias álcool/diesel/co-solventes.

No entanto, segundo a Resolução da Agência Nacional do Petróleo (ANP) Nº 30, de 23/06/2016, o único tipo de biodiesel regulamentado no território brasileiro corresponde ao combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de materiais graxos, de origem vegetal ou animal, e que atenda a especificação contida no Regulamento Técnico nº 3/2014, parte

integrante da Resolução ANP nº 45 de 25 de agosto de 2014, ou outra que venha substituí-la (ANP, 2016).

O biodiesel pode ser usado puro ou em mistura com o óleo diesel em qualquer proporção. Mundialmente passou-se a adotar uma nomenclatura apropriada para sinalizar a concentração de biodiesel na mistura com o diesel, o biodiesel BXX, onde XX é a porcentagem em volume do biodiesel na mistura. Sendo assim, o biodiesel no mercado de combustíveis pode ser consumido: puro (B100), mistura (B20), ou em proporção baixa como aditivo de 1% a 5% (B1 a B5).

A Lei n° 13.263, de 23 de Março de 2016, alterou a Lei n° 13.033, de 24 de Setembro de 2014 determinando um cronograma de aumento do teor de biodiesel a partir de 2017.

O óleo diesel comercializado em todo o Brasil a partir de Março de 2018 contém 10% de biodiesel (B10). A expectativa é que demanda do biodiesel cresça em 1 bilhão de litros neste ano. A estimativa de consumo é de 5,3 bilhões de litros em 2018 (MME, 2018).

A iniciativa também abre espaço para a redução das importações de óleo diesel, agrega valor na agroindústria do biodiesel, com relação direta com outras agroindústrias (grãos, oleaginosas, carnes) e induz a melhora da pauta de exportação do agronegócio (produtos processados ao invés de *in natura*) (MME, 2018).

A contínua elevação do percentual de adição de biodiesel ao diesel demonstra o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) e da experiência acumulada pelo Brasil na produção e no uso em larga escala de biocombustíveis.

Segundo a Agência Embrapa de Informação Tecnológica, a disponibilidade de matéria-prima para a produção do biodiesel brasileiro é ampla, uma vez que o clima quente em diversas regiões do país é propício para o cultivo de mamona, dendê (palma), de babaçu, de amendoim, de pinhão manso, de girassol, de algodão e de soja.

1.1.1 Produção de biodiesel

O biodiesel surgiu como uma alternativa aos combustíveis fósseis e seu caráter renovável o torna uma fonte importante de energia a longo prazo. Países como Argentina, Brasil, Estados Unidos, Malásia, Alemanha, França e Itália produzem o biodiesel comercialmente, incentivando cada vez mais o desenvolvimento do processo em escala industrial. Na Alemanha o biodiesel é produzido a partir da canola (colza), que possui uma

capacidade de produção de cerca de 1 milhão de toneladas por ano, já na Malásia este é produzido a partir do óleo de polpa de dendê, com uma capacidade de produção equivalente a 500 mil toneladas por ano. Na Tabela 1 é apresentada a produção de biodiesel (1000 barris por dia) em vários países, no período de 2012 a 2016.

Tabela 1 - Produção de biodiesel em alguns países no período de 2012 a 2016.

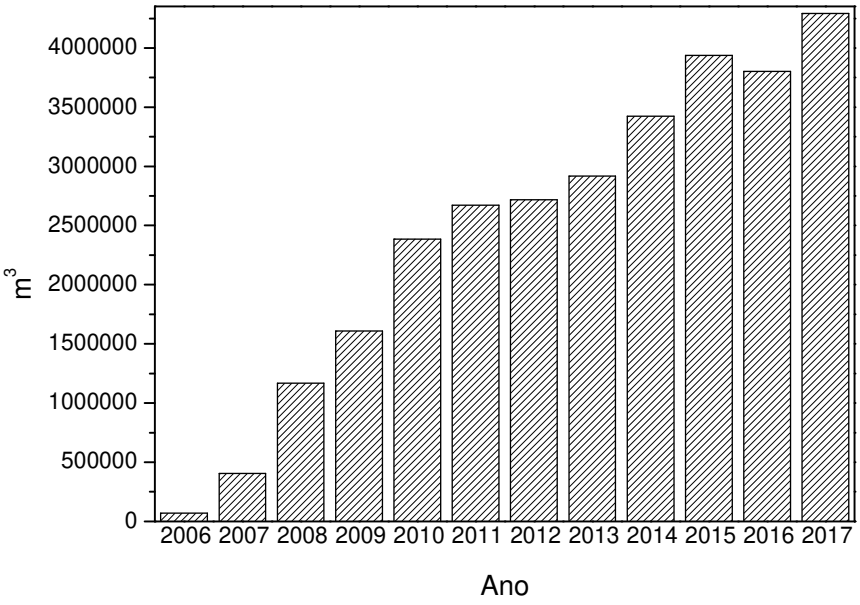
País	**Ano (mil barris/dia)**				
	2012	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**
Estados Unidos	71	97	92	92	104
Alemanha	54	55	61	59	60
Argentina	49	40	52	37	48
Brasil	47	50	59	68	66
Indonésia	38	48	52	20	63
França	41	40	41	41	33
China	16	19	20	9,4	8,6
Tailândia	16	19	20	22	21
Itália	7,1	8	9,7	8,9	6,5
Polônia	12	13	14	15	15
Bélgica	8,1	11	11	8,4	12
Espanha	10	14	20	20	23
Coréia do Sul	6,9	8,1	8,2	9,3	9,2
Holanda	13	17	20	19	12
Portugal	6,2	6	6,3	6,5	5,9
Malásia	4,7	8,7	4	7,8	7,2
Índia	2,1	2,2	2,3	2,4	2,6

Fonte: Energy Information Administration (EIA), 2018.

No Brasil atualmente existem 51 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP para operação no país, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 22.066 $m^3.dia^{-1}$ (ANP, 2018). Há ainda duas novas plantas de biodiesel autorizadas para construção e três plantas de biodiesel autorizadas para aumento da capacidade de produção. Com a finalização das obras e posterior autorização para operação, a capacidade total de produção de biodiesel autorizada poderá ser aumentada em 2.305 m^3dia^{-1}, o que representa um acréscimo de 10,19% na capacidade atual (ANP, 2018).

A produção de biodiesel até Dezembro de 2017 foi próxima a 4,3 milhões de m^3 (ANP, 2018). A Figura 1 ilustra esta produção de biodiesel no período de 2006 até 2017.

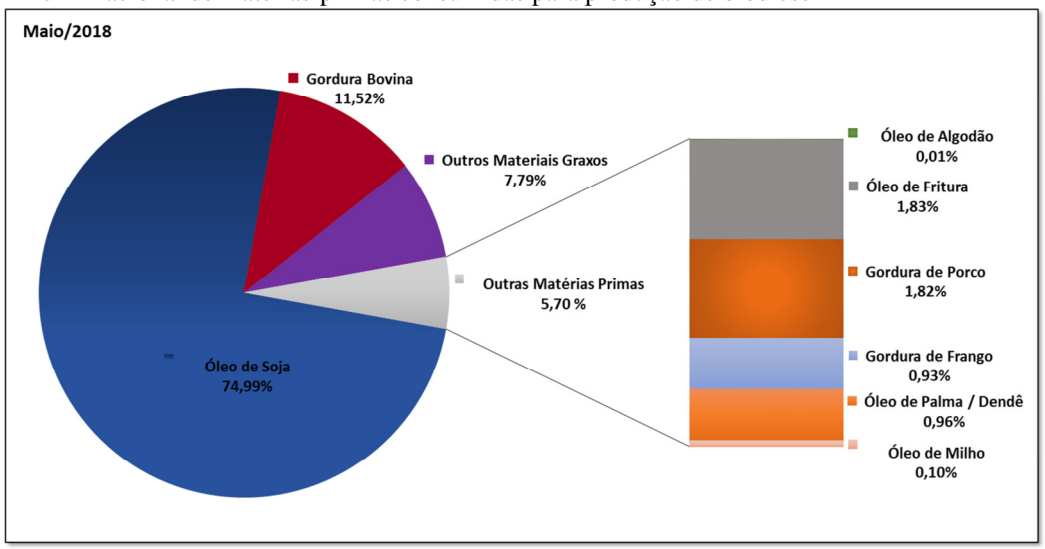
Figura 1 **-** Produção de biodiesel[1] - B100 por estado e produtor[2] - 2006-2017 (m^3)



Nota: [1] Biodiesel (B100), especificado conforme Resolução ANP n° 45/2014.
[2] Unidades produtoras autorizadas pela ANP.
Fonte: ANP elaboração do autor (2018).

Na Figura 2 é apresentado o perfil nacional de matérias-primas empregadas na síntese de biodiesel.

Figura 2 **–** Perfil nacional de matérias-primas consumidas para produção de biodiesel[1]



Nota:[1] O percentual de matéria-prima apresentado se refere ao total de matéria-prima processada e foi extraído do Sistema de Movimentação de Produtos da ANP, última atualização em 06/07/2018.
[2] Outros materiais graxos = mistura de matérias-primas tradicionais em tanque e reprocessamento de subprodutos gerados na produção de biodiesel.
Fonte: ANP (2018).

Pode-se observar que a maior parte da matéria-prima utilizada para a produção do biodiesel ainda é o óleo de soja, seguida pela gordura bovina e outros materiais graxos.

1.1.2 Matérias-primas para produção de biodiesel

Sabe-se que a escolha da matéria-prima empregada para a síntese de biodiesel baseia-se essencialmente no preço e na disponibilidade. A matéria-prima representa cerca de 60-75% do custo total do processo de produção e engloba gastos com energia, trabalho direto, depreciação de equipamentos, despesas gerais, matérias-primas químicas e matérias-primas oleaginosas (TAKASE et al., 2015; JUAN et al., 2011).

As matérias-primas que podem ser utilizadas para a produção de biodiesel são as fontes lipídicas, principalmente os óleos vegetais que podem ser comestíveis ou não, gorduras animais, óleos e gorduras residuais, subprodutos do refino dos óleos comestíveis e, mais recentemente, os óleos produzidos por algas (NAUTIYAL, SUBRAMANIAN e DASTIDAR, 2014) e cianobactérias (KARATAY e DONMEZ, 2011).

De acordo com o tipo de matéria-prima o biodiesel pode ser dividido em três gerações.

A primeira geração do biodiesel é obtida a partir do emprego de gorduras animais e óleos vegetais comestíveis provenientes de palma (*Opuntia ficus-indica*), girassol (*Helianthus annuus*),soja (*Glycine max*), canola (*Brassica napus*), farelo de arroz (*Orysa sativa*) e amendoim (*Arachis hypogaea*) (AARTHY et al., 2014; TAKASE et al., 2015). No Brasil as espécies empregadas para a produção do biodiesel de primeira geração são: o amendoim (*Arachis hypogaea*), o babaçu (*Attalea speciosa*), o dendê (*Elaeis guineensis*), o girassol (*Helianthus annuus*), a mamona (*Ricinus communis*), o pinhão manso (*Jatropha curcas*) e a soja (*Glycine max*). A soja contribui com a maior parcela da produção de biodiesel no Brasil 68% (ANP, 2016). Mas o emprego do óleo vegetal comestível na síntese de biodiesel ocasiona uma competição com o mercado de grãos, além de ser mais caro (AARTHY et al., 2014; SITEPU et al., 2014), gera uma concorrência com a indústria alimentícia e pode acarretar problemas ambientais, como a perda dos nutrientes do solo, o desmatamento e o uso de grande parte das terras aráveis (ATABANI et al., 2012).

A segunda geração do biodiesel emprega como matérias-primas óleos não comestíveis, resíduos provenientes do refino de óleos comestíveis que incluem sabões, sedimentos de óleo, óleos ácidos, branqueadores, destilado de desodorização de óleos

refinados (ECHIM et al., 2009 e CVETKOVIC et al., 2016), óleos de cozinha usados e resíduos de gorduras animais como banha de porco, sebo bovino, gorduras de aves e óleo de peixe. O uso destas matérias-primas mais baratas contribui para a redução dos custos de produção do biodiesel (LEE e LAVOIE, 2013).

Óleos não comestíveis apresentam como desvantagem um elevado teor de ácidos graxos livres, o que aumenta o custo de produção do biocombustível (LEUNG, WU e LEUNG, 2010).

Baseado no teor de ácidos graxos livres os óleos de cozinha usados e gorduras animais usadas são classificados em dois grupos. Gordura amarela (teor de ácidos graxos livres < 15%), que é uma matéria-prima de baixo custo para a produção de biodiesel (CANAKCI e VAN GERPEN, 2001), enquanto a gordura marrom (teor de ácidos graxos livres > 15% e água), é menos adequada para a produção de biodiesel (MANDOLESI de ARAÚJO et al., 2013). No entanto, por serem altamente impuros e possuírem elevados teores de ácidos graxos livres, os óleos de cozinha usados geralmente devem ser filtrados, purificados e pré-esterificados antes de serem utilizados como matéria-prima na produção de biodiesel.

Microalgas heterotróficas e micro-organismos fotossintéticos que absorvem nutrientes orgânicos para produzir principalmente lipídios, podem ser utilizados na produção de biodiesel, e estão relacionados ao biodiesel de terceira geração. Atualmente, a produção de biodiesel a partir da biomassa de microalgas é uma das fontes de energia neutras em carbono mais promissoras (SPOLAORE et al., 2006).

Na Tabela 2 é apresentada uma comparação entre os tipos de matéria-prima empregados na produção de biodiesel.

Tabela 2 – Comparação das matérias-primas selecionadas usadas para a produção de biodiesel

Geração do biodiesel	Cultura	Teor de óleo (%)	Rendimento do óleo ($L.ha^{-1}.ano^{-1}$)	Área de cultivo ($m^2.kg^{-1}$biodiesel)
Primeira	de soja	18	446-636	18
	de girassol	40	952-1070	11
	de canola	41	974-1090	12
Segunda	de pinhão manso	20-60	1892	15
	de castor	48	1307-1413	9
Terceira	de biomassa (microalga)	30-70	58,7-136,9	0,1-0,2

Fonte: Adaptado de MILANO et al. 2016.

1.1.2.1 Matérias-primas ácidas para produção de biodiesel

O uso de matéria-prima de menor custo, como, por exemplo, resíduos do óleo de fritura, óleos não comestíveis, gordura de animais, entre outras, pode reduzir os custos de produção e os problemas ambientais, possibilitando que a produção de biodiesel seja comercialmente mais competitiva com o diesel (CHRISTOPHER et al., 2014).

O emprego dos óleos vegetais não comestíveis e dos óleos comestíveis residuais emerge como alternativas para diminuir os custos da produção de biodiesel, uma vez que estes não competem com a indústria alimentícia, permitem o emprego de plantas oleaginosas regionais de alta produtividade e também agregam valor aos resíduos de óleos comestíveis (AARTHY et al., 2014; AGUIEIRAS, CAVALCANTI-OLIVEIRA e FREIRE, 2015; SITEPU et al., 2014).

Óleos vegetais não comestíveis obtidos de pinhão manso (*Jatropha curcas*), karanja (*Pongamiapinata*), mahua (*Madhuca indica*), polanga (*Caophyllum inophyllum*), borracha (*Ficus elastica*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), mamona (*Ricinus communis*), macaúba (*Acrocomia aculeata*) e babaçu (*Attalea speciosa)* são mais baratos (com exceção do óleo obtido da mamona) que os óleos comestíveis e potencialmente disponíveis para a produção de biodiesel. Porém, alguns desses óleos, como o de macaúba, o de pinhão manso e o de mahua, possuem um alto teor de água e de ácidos graxos livres, o que dificulta o emprego do processo convencional de produção de biodiesel a partir da transesterificação do óleo vegetal com alcoóis de cadeia curta empregando a catálise alcalina (MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2007; TALUKDER et al., 2009).

Esses óleos são constituídos por triacilgliceróis (TAG), os quais possuem resíduos de ácidos graxos de cadeias de 8 a 24 átomos de carbono, com ou sem insaturação. A Tabela 3 apresenta o percentual dos ácidos graxos presentes em algumas espécies de oleaginosas brasileiras que podem ser utilizadas na produção do biodiesel.

Tabela 3 - Teor de ácidos graxos constituintes do óleo extraído de algumas espécies de oleaginosas brasileiras

Ácidos Graxos	**Teor de óleo (%)**						
	Babaçu	Canola	Palma	Girassol	Jatropha	Soja	Amendoim
Ácido caprílico (C8:0)	5	-	-	-	-	-	-
Ácido cáprico (C10:0)	6	-	0,48	-	-	-	-
Ácido láurico (C12:0)	44	-	2,13	-	-	-	-
Ácido mirístico (C14:0)	17	0,2	6,16	-	-	-	-
Ácido Pentadecílico (C15:0)	-	-	1,72	-	-	-	-
Ácido palmítico (C16:0)	8	2,5-6,5	22,1	6	18,08	11,64	6,14
Ácido palmitoleico (C16:1)	-	0,6	0,25	-	1,03	-	-
Ácido margárico (C17:0)	-	-	1,91	-	-	-	-
Ácido esteárico (C18:0)	4,5	0,8-3	4,32	4,4	7,34	2,89	1,56
Ácido oleico (C18:1)	14	53-70	37,2	20,5	38,81	24,36	51,26
Ácido linoleico (C18:2)	2	15-30	20,6	65,8	34,65	53,83	35,59
Ácido linolênico (C18:3)	-	5-13	0,47	0,1	-	8,02	-
Ácido araquídico (C20:0)	-	0,1-1,2	-	0,3	-	-	2,54
Ácido eicosenóico (C20:1)	-	0,1-4,3	-	-	-	-	-
Ácido araquidônico (C20:4)	-	-	0,22	-	-	-	-
Ácido behênico (C20:1)	-	0,6	-	1,1	-	-	0,97
Ácido erúcico (C22:1)	-	2,0	-	-	-	-	-
Ácido Lignocérico (C24:0)	-	-	-	20,21	-	-	1,94

Fonte: CREMONEZ et al., 2015.

A produtividade e o teor de ácidos graxos livres em óleos provenientes de algumas oleaginosas cultivadas no Brasil, assim como em óleos residuais de fritura, são apresentados na Tabela 4. Dados do óleo de soja também foram adicionados à tabela, já que esta é a matéria-prima mais empregada no processo convencional de produção de biodiesel.

Tabela 4 – Produtividade e acidez de alguns óleos produzidos por plantas cultivadas no Brasil com potencial para produção de biodiesel

Planta	**Nome**	**Teor de ácido graxo livre (% m.m^{-1})**	**Produtividade (Kg $_{óleo}$.ha^{-1}.ano^{-1})***	**Autor**
Pinhão-manso	*Jatropha curcas*	18,05	2000 – 3000	CORRO et al. (2014); KOH e GHAZI (2011)
Macaúba	*Acrocomia aculeata*	37,4 – 65,4	4800	NAVARRO-DÍAZ et al. (2014); EMBRAPA (2014)
Castanhola	*Terminalia catappa L.*	5	Dado não obtido	IHA et al. (2014)
Andiroba	*Carapa guianensis*	18	Dado não obtido	IHA et al. (2014)
Dendê	*Elaeis guineenses*	16,91	3000-6000	NDUWAYEZU et al. (2015); KUSS et al., (2015)
Monguba	*Pachira glabra Aublet*	39,2	Dado não obtido	JORGE e LUZIA (2012)
Tabaco	*Nicotiana tabacum L.*	35	Dado não obtido	VELJKOVIć et al. (2006)
Seringueira	*Hevea brasiliensis*	17	Dado não obtido	GIMBUN et al. (2012)
Óleo residual de fritura	Depende da planta de origem	65,9	-	CAI et al. (2015)
		20	-	WANG et al. (2014)
		2,10	-	BOFFITO et al. (2013)
Óleo de soja refinado	*Glycine max*	0,33	200-400	SANTOS et al. (2013); KUSS et al. (2015)

*Kg $_{óleo}$.ha^{-1}.ano^{-1} = quilograma de óleo por hectare por ano
Fonte: SOARES, 2015.

O óleo de soja refinado é a matéria-prima mais empregada no processo convencional de biodiesel, pois possui o menor teor de ácido graxo livre dentre as matérias-primas apresentadas na Tabela 4, o que favorece seu emprego no processo convencional de produção de biodiesel que utiliza a catálise alcalina.

1.1.2.2 Tratamentos das matérias-primas ácidas empregadas na produção de biodiesel

Embora as matérias-primas de segunda geração para a produção de biodiesel apresentem baixo custo, possuem um teor elevado de ácidos graxos livres e água, que é uma desvantagem, pois não permite o seu emprego de forma direta no processo convencional de síntese de biodiesel. Além disso, ocasionam a formação de sabão, que diminui o rendimento da reação. Desse modo, torna-se necessária a adição de uma etapa de pré-tratamento a fim de reduzir o teor de acidez da matéria-prima que será empregada no processo produtivo convencional (AGUIEIRAS, CAVALCANTI-OLIVEIRA e FREIRE, 2015; LEUNG, WU e LEUNG, 2010). A escolha do método que será empregado como pré-etapa na redução do teor de acidez da matéria-prima depende da porcentagem de ácidos graxos livres presentes no referido material.

Quando as matérias-primas possuem até 5% $m.m^{-1}$ de ácidos graxos livres emprega-se o método da neutralização. A adição de uma base (KOH ou NaOH) ao óleo, permite que ocorra uma reação de neutralização entre os ácidos graxos livres e a base, gerando como produtos sabão e água. Os ácidos graxos livres precipitados na forma de sabão são removidos de forma mecânica. Como desvantagem do emprego deste método pode-se citar a queda do rendimento do processo, devido à perda do óleo tratado. Esta perda ocorre de duas formas: pela hidrólise dos triglicerídeos do óleo na presença da água e da base contidas no meio e pela agregação de parte do óleo na região central (apolar) das micelas de sabão formadas (SHRESTHA e GERPEN, 2010; ŠÁNEK et al., 2015).

Para matérias-primas com teor de ácido graxo livre entre 5-10% $m.m^{-1}$, é utilizada a destilação por arraste de vapor, onde o óleo ou gordura é aquecido normalmente sob vácuo, a cerca de 290°C, ocasionando a formação de uma fase vapor que contém os ácidos graxos livres, o que possibilita a separação destes do óleo (SHRESTHA e GERPEN, 2010). Contudo, a desvantagem deste método é o alto consumo de energia, devido à condução do processo em elevadas temperaturas. As temperaturas elevadas podem ocasionar a degradação do óleo, gerando uma perda durante o processo (TAFESH e BASHEER, 2013). Cabe ressaltar que o ácido graxo livre separado não é convertido em biodiesel (BHOSLE e SUBRAMANIAN, 2005).

Existe também a possibilidade do emprego da extração por solvente, uma vez que existe uma diferença de solubilidade entre os ácidos graxos livres e os triglicerídeos presentes na matéria-prima ácida. Emprega-se uma quantidade elevada de solvente, e os solventes mais

utilizados na condução do processo são álcoois de cadeia curta, como metanol, etanol e n-propanol. O emprego de uma elevada quantidade de solvente poderia ser uma desvantagem deste método, contudo, o solvente pode ser recuperado por destilação ou evaporação. Este processo possui um custo operacional menor, já que pode ser conduzido à pressão e à temperatura ambiente (HIRATA et al., 2013). Logo após o solvente ser adicionado, percebe-se a formação de duas fases, uma superior que é formada pelo álcool e pelos ácidos graxos solúveis e uma inferior, formada pelos triglicerídeos neutros. Como a solubilidade dos triglicerídeos em álcool é baixa, a separação dos componentes não é completa, porém a solubilidade aumenta de forma proporcional ao teor de ácidos graxos livres (MARIANO et al., 2011). Uma otimização no processo de separação dos ácidos graxos livres pode ocorrer se uma extração em múltiplos estágios for empregada (LU et al., 2010).

A glicerólise ocasiona a redução do teor de acidez de matérias-primas ácidas através da reação dos ácidos graxos livres com a glicerina, que ocasiona a formação de água, monoglicerídeos e uma pequena quantidade de diglicerídeos. Os catalisadores que podem ser empregados para esta reação são lipases, cloreto de zinco ou zinco metálico. A reação com cloreto de zinco ou zinco metálico geralmente é conduzida a 200-220°C na presença de gás inerte ou sob vácuo, assim a água formada pode ser removida, o que garante o deslocamento do equilíbrio no sentido de formação do produto. Um maior rendimento em biodiesel é obtido, já que os ácidos graxos livres, além de separados, são transformados em glicerídeos, que posteriormente podem ser convertidos em biodiesel empregando a catálise alcalina. Porém, este processo apresenta uma velocidade de reação lenta e elevada temperatura de operação, que pode causar reações de decomposição e oxidação dos componentes do óleo, acarretando na formação de um produto de cor escura e odor forte. Ao final da reação, a glicerina que não reagiu tem que ser separada por decantação (TAFESH e BASHEER, 2013; FELIZARDOet al., 2011; SHRESTHA e GERPEN, 2010).

Para matérias-primas com teor de ácidos graxos livre acima de 10%, a pré-etapa empregada é a esterificação catalisada por ácidos (KNOTHE et al., 2006). O método consiste na reação dos ácidos graxos livres com o álcool de cadeia curta, empregando um catalisador ácido, que pode ser homogêneo ou heterogêneo. O catalisador mais utilizado é o ácido sulfúrico, por ser barato, de fácil obtenção e por promover a conversão de ácidos graxos livres com taxas elevadas (GAN et al., 2012). A desvantagem é que ao término da reação é necessária a remoção do ácido que não reagiu e é preciso purificar o produto formado (BORGES e DÍAZ, 2012). Uma simplificação do processo nas etapas posteriores pode ser obtida quando catalisadores sólidos ácidossão empregados, já que estes podem ser separados

do produto através de filtração. Entretanto, sabe-se que o emprego destes catalisadores ácidos pode ocasionar corrosão nos equipamentos, além da necessidade de utilização de pressões e temperaturas elevadas (BORGES e DÍAZ, 2012).

Também é possível empregar a catálise enzimática como forma de reduzir o teor de ácidos graxos livres presente na matéria-prima. Neste processo os catalisadores empregados são as lipases. Como vantagens do emprego destes biocatalisadores pode-se citar: elevada especificidade, o que minimiza as reações secundárias, e condições reacionais brandas de temperatura e de pressão. O emprego da catálise enzimática gera menor custo com energia e com o tratamento de resíduos.

1.2 Produção enzimática de biodiesel

O processo tradicional de produção de biodiesel emprega a transesterificação de óleos vegetais refinados com álcoois de cadeia curta (metanol ou etanol) na presença de um catalisador básico homogêneo, como hidróxido de sódio ou potássio. Geralmente, catalisadores básicos são mais ativos na transesterificação quando comparado a catalisadores ácidos para óleos com elevada pureza e baixo teor de ácidos graxos (LEE et al., 2014).

Desse modo a matéria-prima empregada no processo deve ser essencialmente anidra e possuir um teor de ácidos graxos livres menor que 1,0% $m.m^{-1}$ (SARAF e THOMAS, 2007).

Devido a todas as dificuldades técnicas associadas à transesterificação química de óleos ácidos, o emprego da catálise enzimática utilizando lipases surge como uma alternativa. As lipases catalisam simultaneamente as reações de esterificação e de transesterificação em meio não aquoso, o que permite o emprego de óleos vegetais com alto índice de acidez.

Na Tabela 5 é apresentada uma comparação entre o processo químico e o processo enzimático.

Tabela 5- Comparação dos métodos químico e enzimático para a produção de biodiesel

Parâmetro	Método químico		Método enzimático
	Processo ácido	Processo básico	
Rendimento em biodiesel	>90%	>96%	>96%
Teor de ácidos graxos livres no substrato	Convertido em biodiesel	Formação de sabão	Convertido em biodiesel
Água no substrato	Interfere na reação	Interfere na reação	Não influencia
Purificação dos ésteres metílicos	Lavagem repetida	Lavagem repetida	Nenhuma
Recuperação do glicerol	Complexa, glicerol de baixa pureza	Complexa, glicerol de baixa pureza	Simples, glicerol de alta pureza
Taxa de reação	Baixa	Alta	Baixa
Temperatura de reação	>100°C	60-80°C	20-50°C
Recuperação do catalisador	Difícil, o catalisador acaba em subproduto	Difícil	Fácil
Reuso do catalisador	Não é reutilizável	Parcialmente perdido nas etapas de pós-processamento	Reutilizável
Custo do catalisador	Baixo	Baixo	Alto
Geração de águas residuais	Alta	Alta	Baixa

Fonte: GOG et al., 2012 e ROBLES-MEDINA et al., 2009.

Observando a Tabela 5 é possível notar as vantagens do emprego dos processos enzimáticos frente aos processos químicos tradicionais. Uma vez que os processos enzimáticos são relativamente simples, fáceis de controlar e mais eficientes no ponto de vista energético quando comparados aos processos químicos tradicionais (OLIVEIRA e MANTOVANI, 2009).

O emprego de lipases como catalisadores na síntese de biodiesel é de notável interesse, uma vez que permite o emprego de matérias-primas mais baratas, com alto teor de água e de ácidos graxos livres, em razão das lipases catalisarem simultaneamente a esterificação dos ácidos graxos livres presentes no óleo e a transesterificação dos triglicerídeos, e que requer um processamento à jusante um pouco mais simples para a purificação do produto formado (AGUIEIRAS, CAVALCANTI-OLIVEIRA e FREIRE, 2015).

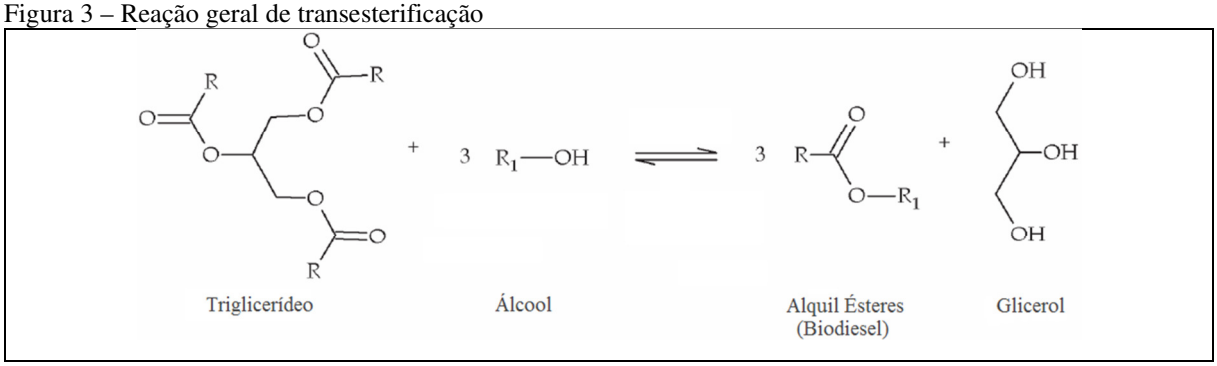
1.2.1 Transesterificação

A transesterificação de triglicerídeos com álcool (etanol, metanol) gera como produto principal ésteres de ácidos graxos e glicerol como subproduto. A primeira etapa da reação é a conversão dos triglicerídeos em diglicerídeos, que é seguida da conversão dos diglicerídeos

em monoglicerídeos e dos monoglicerídeos em glicerol, rendendo uma molécula de éster para cada glicerídeo em cada etapa (ABBASZAADEH et al., 2012).

Na Figura 3, pode-se observar a estequiometria da reação de transesterificação, que requer 3 mols de álcool para 1 mol de triglicerídeo, produzindo 3 mols de ésteres de ácidos graxos e 1 mol de glicerol. O excesso de álcool favorece a formação do éster (biodiesel) através do deslocamento do equilíbrio da reação.

Figura 3 – Reação geral de transesterificação



Legenda: R e R_1 referem-se a cadeias alquílicas com diferentes comprimentos e/ou grau de insaturação.
Fonte: Adaptado de FELTES et al., 2011.

No processo tradicional de produção de biodiesel o teor de glicerol após a purificação pode ser de até 15%, o que não é comercialmente favorável, no entanto, esse teorde glicerol é muito maior na transesterificação empregando enzimas (VAN GERPEN, 2005).

Na via enzimática empregando lipases imobilizadas, a recuperação do glicerol é mais simples, a enzima imobilizada é removida por filtração, permitindo a obtenção de glicerol com elevado grau de pureza e maior valor de mercado. Além disso, a enzima imobilizada pode ser reutilizada.

Haja vista as informações apresentadas na Tabela 5 e a fácil separação da enzima imobilizada, a lipase desponta como uma alternativa ao uso dos catalisadores tradicionais. Na Tabela 6 são apresentados vários estudos empregando reações de transesterificação com lipases imobilizadas, sendo as mais empregadas aquelas provenientes de *Candida antarctica* (Novozym 435), *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM).

Tabela 6 – Reações de transesterificação empregando lipases imobilizadas (continua)

Matéria-prima	Enzima	Condições	Observações	Referência
Óleo de mamona	Novozym 435 (20% $m.m^{-1}$) Lipozyme IM (20% $m.m^{-1}$)	Para Novozym 435: T= 65°C; razão molar óleo:etanol de 1:10 Para Lipozyme IM: T= 65°C; razão molar óleo:etanol de 1:3	Rendimento para a Novozym 435 após 6 h de reação: 81,4%. Rendimento para a Lipozyme IM após 8 h de reação: 98%.	OLIVEIRA et al., 2004.
Óleo de soja	Lipozyme RM IM (7% $m.m^{-1}$)	T = 50°C; razão molar etanol:óleo de soja de 3, com adição do etanol de forma escalonada em 3 etapas	Rendimento após 4 h de reação: 55%.	BERNARDES et al., 2007.
Óleo de soja	Lipozyme TL IM (10% $m.m^{-1}$) Novozym 435 (10% $m.m^{-1}$)	Para Lipozyme TL IM: T = 25°C; razão molar etanol:ácido graxo residual de 2. Para Novozym 435: T = 25°C; razão molar etanol:ácido graxo residual de 1:10.	Rendimento para a Lipozyme TL IM após 24 h de reação: 81%. Rendimento para a Novozym 435 após 24 h de reação: 86%.	HERNÁNDEZ-MARTIN e OTERO, 2007.
Óleo de colza	Novozym 435 (5% $m.m^{-1}$)	T= 40°C; solvente: *terc*-butanol; 1% ($m.m^{-1}$) de água; razão molar metanol:óleo de 3:1.	Rendimento após 24 h de reação: 76,1%.	JEONG e PARK, 2008.
Óleo de palma bruto	Lipozyme TL IM (3% $m.m^{-1}$)	T = 50°C; razão molar etanol:óleo de 3:1, com adição do etanol de forma escalonada.	Rendimento após 4 h de reação: 25,2%	MATASSOLI et al., 2009.
Desodorizado de óleo de soja	Novozym 435 (3% $m.m^{-1}$)	T = 50°C; razão molar ácido graxo: etanol de 1:1, adição do etanol de forma escalonada em 2 etapas.	Rendimento após 1,5 h de reação: 83,5%.	SOUZA et al., 2009.
Banha de porco	Novozym 435 (1,96% $m.m^{-1}$) Lipozyme TL IM (2,04% $m.m^{-1}$)	T = 50°C; 0,55 $v.v^{-1}$ de *terc*-butanol/óleo, razão molar metanol/óleo de 5,12.	Rendimento após 20 h de reação: 97,2%.	HUANG, ZHENG e YAN, 2010.
Óleo de *Stillingia*	Novozym 435 (1,96% $m.m^{-1}$) Lipozyme TL IM (2,04% $m.m^{-1}$)	T = 40°C; mistura ($v.v^{-1}$) de co-solvente 60% de acetonitrila e 40% de *terc*-butanol, razão molar metanol/óleo de 6,4: com *terc*-butanol/óleo, razão molar metanol/óleo de 5,12; 5,5% ($m.m^{-1}$) de peneira molecular e agitação: 200 rpm.	Rendimento após 20 h de reação: 96,38%.	LI, ZHENG e YAN, 2010.

Tabela 6 - Reações de transesterificação empregando lipases imobilizadas (continuação)

Matéria-prima	Enzima	Condições	Observações	Referência
Óleo de soja	Lipozyme TL IM (15% $m.m^{-1}$)	T = 30°C; razão molar etanol:óleo de 7,5:1; razão molar *n*-hexano como co-solvente; 4% $m.m^{-1}$ de água.	Rendimento após 10 h de reação: 100%.	RODRIGUES et al., 2010.
Óleo de palma bruto	Lipozyme TL IM (7,5% $m.m^{-1}$)	T = 40°C; solvente: *terc*-butanol*;* agitação: 150 rpm. Meio reacional composto pela mistura das proporções 0,37, 0,10 e 0,53 de óleo de palma bruto, metanol e terc-butanol.	Rendimento após 4 h de reação: 95,15%.	SIM et al., 2010.
Óleo de soja	Novozym 435 (6% $m.m^{-1}$)	T = 40°C; potencia ultrassonica de 50%; agitação: 50 rpm; 0,5% ($m.m^{-1}$) de água, relação alcool *tert*-amílico/volume de óleo de 1:1, razão molar metanol/óleo de 6: 1	Rendimento após 4 h de reação: 96%.	YU et al., 2010.
Óleo de soja	Novozym 435 (coluna empacotada com 1,7 g)	T = 52,1°C; co-solvente: tert-butanol; razão molar de substrato (metanol: óleo de soja) de 1:4 e vazão de 0,1 $mL.min^{-1}$.	Rendimento: 83%.	CHEN et al., 2011.
Óleo de soja	*Yarrowia lipolytica* (100 U)	T = 40°C; 1 g de óleo e 30-60% ($v.v^{-1}$) de água.	Conversão após 3 h: 85%.	MENG et al., 2011.
Óleo de soja	Lipozyme RM IM (5% $m.m^{-1}$) Lipozyme TL IM (20% $m.m^{-1}$)	T = 30°C; razão molar etanol:óleo de 7,5:1; 4% ($m.m^{-1}$) de água e agitação: 200 rpm.	Rendimento após 10 h: 90%.	RODRIGUES e AYUB, 2011.
Óleo de palma	Novozym 435 (0,6 g)	T = 50°C; razão molar metanol:óleo de palma de 1:1.	Rendimento após 8 h: 96%.	TALUKDER et al., 2011.
Gordura animal	Novozym 435 (3,27 g)	T = 50°C; razão molar metanol:gordura animal de 10:1; vazão: 0,5 $mL.min^{-1}$ e pressão: 200 bar.	Rendimento após 24 h: 53,3%.	AL-ZUHAIR et al., 2012.
Óleo de soja	Lipozyme RM IM (12,9% $m.m^{-1}$) Novozym 435 (27% $m.m^{-1}$)	Para Lipozyme RM IM: T = 57°C; potência de ultrassom: 100 W e razão óleo:etanol de 1:3. Para Novozym 435: T = 63°C; potência de ultrassom: 40 W e razão óleo:etanol de 1:3.	Rendimento para a Lipozyme RM IM após 4 h de reação: 86%. Rendimento para a Novozym 435 após 4 h de reação: 57%.	BATISTELLA et al., 2012

Tabela 6 - Reações de transesterificação empregando lipases imobilizadas (conclusão)

Matéria-prima	Enzima	Condições	Observações	Referência
Óleo de cozinha	Novozym 435 (60% do volume do reator)	T = 30°C; meio reacional: 1000 g de óleo de cozinha para 0,5 mol de metanol; vazão: 600 mL. h^{-1}.	Rendimento após 290 min: 94,3%.	HAMA et al., 2013.
Óleo de milho	Novozym 435 (15% $m.m^{-1}$)	T = 60°C, meio supercrítico com dióxido de carbono, pressão: 10 MPa.	Rendimento após 4 h de reação: 81,3%.	CIFTCI e TEMELLI, 2013.
Óleo de soja	Novozym 435 (5% $m.m^{-1}$)	T = 40°C; razão molar óleo:álcool de 1:3; proporções molares de metanol na mistura com o etanol foram de 0, 20, 40, 60, 80 e 100%.	Rendimento após 10 h de reação: 100%.	ZHAO et al., 2014.
Azeite Óleo de palma	Para o azeite: Lipozyme RM IM (1,25% $m.m^{-1}$) Lipozyme TL IM (2,9% $m.m^{-1}$) Novozym 435 (5,85% $m.m^{-1}$) Para o óleo de palma: Lipozyme RM IM (4,75% $m.m^{-1}$) Lipozyme TL IM (5,25% $m.m^{-1}$)	T = 40°C; agitação: 150 rpm; razão molar etanol:óleo de 6:1.	Rendimento para etanólise do azeite após 18 h de reação: superior a 95%. Rendimento para etanólise do óleo de palma após 18 h de reação: 80%.	POPPE et al., 2015.

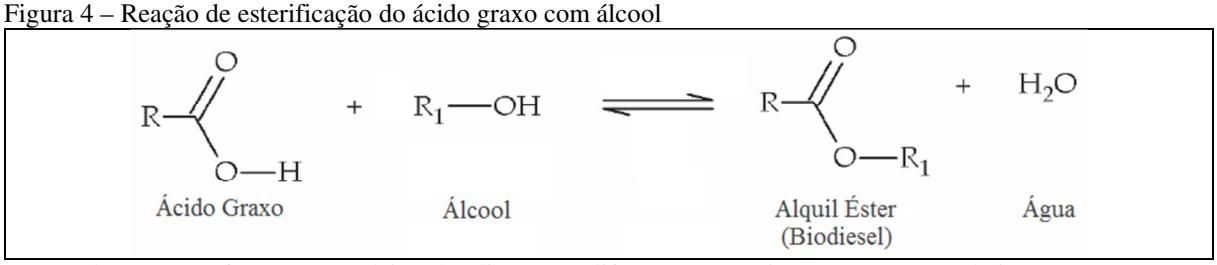
Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

1.2.2 Esterificação

Outra forma de obtenção do biodiesel é a esterificação que consiste na reação de um ácido graxo livre com um álcool gerando como produtos éster e água (SHARMA e KANWAR, 2014). Esta reação pode ser empregada como uma etapa de pré-tratamento na produção de biodiesel, quando o óleo vegetal ou gordura empregada possui elevado índice de acidez. No caso em que as matérias-primas apresentam teores de ácidos graxos livres superiores a 10% a esterificação é conduzida empregando um álcool de cadeia curta (KNOTHE et al., 2006; GAN et al., 2012). Este pré-tratamento permite evitar a formação de

sabões, que ocasiona uma redução do rendimento em biodiesel. A Figura 4 apresenta a representação da reação de esterificação.

Figura 4 – Reação de esterificação do ácido graxo com álcool



Legenda: R e R_1 referem-se a cadeias alquílicas com diferentes comprimentos e/ou grau de insaturação.
Fonte: Adaptado de FELTES *et al.*, 2011.

O emprego da esterificação utilizando lipases imobilizadas apresenta vantagens frente a catálise ácida uma vez que não é necessário que os equipamentos sejam resistentes a corrosão. Além disso, não são necessárias temperaturas e pressões elevadas na condução do processo (ROBLES-MEDINA et al., 2009).

A utilização de lipases permite que altas taxas de conversão sejam alcançadas em condições brandas de operação; a geração de produtos com elevado grau de pureza e uma menor geração de resíduos por serem catalisadores altamente seletivos; quando utilizadas em sua forma imobilizada podem ser facilmente separadas do meio reacional ao final da reação, podendo ser reutilizadas e aplicadas em processos contínuos. Além do mais, enzimas são biodegradáveis e menos tóxicas que os catalisadores químicos. Como desvantagens do emprego de lipases pode-se citar a sua sensibilidade às variáveis do processo, como temperatura, concentração do álcool e água no meio, além de possuir custo elevado (CHRISTOPHER, HEMANATHAN e ZAMBARE, 2014; AGUIEIRAS, CAVALCANTI-OLIVEIRA e FREIRE, 2015).

As reações de esterificação de ácidos graxos e álcoois são catalisadas por lipases em meios não aquosos ou micro aquosos. Na Tabela 7 são apresentados os diversos estudos que vem sendo realizados empregando os biocatalisadores comerciais: Lipozyme RM IM (lipase de *Rhizomucor miehei*), Lipozyme TL IM (lipase de *Thermomyces lanuginosus*) e Novozym 435 (lipase B de *Candida antarctica*).

Tabela 7 - Reações de esterificação empregando lipases imobilizadas (continua)

Matéria-prima	Enzima	Condições	Observações	Referência
Borra do óleo de palma	Novozym 435 (4% m.m^{-1})	T = 40°C; razão estequiométrica entr a borra do óleo de palma e o metanol.	Conversão após 2 h de reação: 95,2%.	TALUKDER et al., 2009.
Borra do óleo de palma	Novozym 435 (3% m.m^{-1}) Lipozyme RM IM (3% m.m^{-1}) Lipozyme TL IM (3% m.m^{-1})	T = 60°C emeio reacional: 8 g de borra de palma e 2 g de álcool (metanol e etanol).	Conversão para a Novozym 435 após 2,5 h de reação: para o metanol: 95% e para o etanol: 91%. Conversão para a Lipozyme RM IM após 2,5 h de reação: para o metanol: 52,3% e para o etanol: 53,4%. Conversãopara a Lipozyme TL IM após 2,5 h de reação: para o metanol: 28,8% e para o etanol: 33,1%.	CORRÊA et al., 2011.
Ácido oleico	Novozym 435 (10% m.m^{-1}) Lipozyme RM IM (10% m.m^{-1}) Lipozyme TL IM (10% m.m^{-1})	T = 40°C; razão molar ácido oleico:etanol de 1:1; ciclohexano como solvente (5 mL) e radiação de micro-ondas (600 rpm).	Conversão para a Novozym 435 após 1 h de reação: 89%. Conversão para a Lipozyme RM IM após 1 h de reação: 79%. Conversão para a Lipozyme TL IM após 1 h de reação: 23%.	COSTA et al., 2011.
Ácido oleico	Novozym 435 (1e 5% m.m^{-1})	T = 32°C; meio reacional: 0,5 g de ácido oleico para 1,5 mL de álcool (metanol, etanol, *n*-propanol e *n*-butanol) e agitação: 130 rpm.	Conversão após 24 h de reação empregando 1% (m.m^{-1}) de enzima: para o etanol: 93,1%, para o *n*-propanol e 91,1%. Conversão após 24 h de reação empregando 5% (m.m^{-1}) de enzima: para o metanol: 90,8%, para o *n*-butanol e 91%.	ROSSET et al., 2013

Tabela 7 - Reações de esterificação empregando lipases imobilizadas (conclusão)

Matéria-prima	Enzima	Condições	Observações	Referência
Ácido oleico	Lipozyme RM IM (0,1 g)	T = 40°C e concentração da carga de 1:1 molar ácido oleico:etanol.	Conversão após 26,6 min de reação: 68,5%.	SOARES, 2015.
Ácido oleico	Preparado enzimático sólido (PES) de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (30% $m.m^{-1}$)	T = 30°C; razão estequiométrica para ácido oleico:etanol, com adição única do etanol.	Conversão após 24 h de reação: 85%.	SILVA, 2016.
Óleo de peixe	Novozym 435 (razão mássica enzima/óleo = 0,01)	T = 40°C; razão mássica etanol/ácidos graxos livres de 3,24.	Conversão após 2 h de reação: 71%.	MATA et al., 2017.
Ácido oleico	Lipozyme 435 (5% $m.m^{-1}$)	T = 30 °C; razão molar metanol/ácidos graxos livres de 1.	Conversão após 60 min de reação: 97,22%.	TEIXEIRA et al., 2017.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

1.3 Lipases

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas pertencentes à classe das hidrolases, que tem como função natural a hidrólise e reesterificação de triglicerídeos (BUCHOLZ, KASCHE e BORNSCHEUER, 2005). São mais ativas em substratos insolúveis, principalmente triglicerídeos de cadeia longa, com mais de 10 átomos de carbono (MORAIS JÚNIOR et al., 2016; RIBEIRO et al., 2011).

As lipases são provavelmente as hidrolases mais frequentemente usadas em síntese orgânica (BUCHHOLZ, KASCHE e BORNSCHEUER, 2005). Dentre as várias aplicações industriais das lipases destacam-se seu emprego em detergentes, na modificação de óleos e gorduras, alimentos, fabricação de aromas, fabricação de queijo, biorremediação, cosméticos, biossensores e biocombustíveis (SALIHU e ALAM, 2015).

As lipases são muito estudadas para a esterificação dos ácidos graxos livres e a transesterificação dos triglicerídeos presentes em matérias-primas para a produção do biodiesel (POPPEet al., 2015).

1.3.1 Fontes de lipases

As lipases são encontradas de forma abundante na natureza, podem ser obtidas a partir de fontes animais (pancreática, hepática e gástrica), microbianas (leveduras, fungos e bactérias) ou de origem vegetal (por exemplo: soja, centeio, algodão) (PATIL, CHOPDA e MAHAJAN, 2011).

As lipases oriundas de fontes microbianas são as mais utilizadas industrialmente, pois como vantagens, frente às lipases de origem animal ou vegetal, apresentam menor tempo de geração, alta conversão de substrato em produto, elevado rendimento de enzimas, simplicidade de manipulação genética e das condições de cultivo, grande versatilidade frente às condições do ambiente. A versatilidade diz respeito às seguintes condições: atividade em uma ampla faixa de pH, estabilidade em elevadas temperaturas, seletividade em misturas racêmicas e facilidade de produção em grandes quantidades devido à ausência de influência de flutuações sazonais e rápido crescimento dos micro-organismos em meios relativamente baratos(LUKOVIĆ, KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ e BEZBRADICA, 2011; RIBEIRO et al., 2011; YÜCEL, TERZIOĞLU e ÖZÇIMEN, 2012; MORAIS JÚNIOR et al., 2016).

Lipases podem ser intracelulares e extracelulares. No caso das lipases extracelulares, a enzima pode ser recuperada do meio de cultura e, então, purificada, enquanto a lipase intracelular permanece dentro da célula ou na parede celular e precisa de um processo de lise para ser liberado no meio (GOG et al., 2012).

As lipases podem ser produzidas por fermentação a partir de vários micro-organismos, dos quais se destacam os seguintes gêneros:

- Bactérias: *Bacillus, Staphylococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Micrococcus, Propionibacterium, Burkholderia, Pseudomonas, Chromobacterium, Acinetobacer e Aeromonas;*
- Fungos filamentosos*: Rhizopus, Aspergillus, Penicillium, Mucor, Geotrichum, Beauveria, Humicola, Rhizomucor, Fusarium, Acremonium, Alternaria, Eurotrium;*
- Leveduras: *Candida, Yarrowia, Rhodotorula, Pichia, Saccharomyces, Toulospora e Trichosporon.*

Esses micro-organismos têm sido selecionados em efluentes industriais, fábricas de processamento de óleo vegetal, indústrias de laticínios, solos contaminados com óleo, óleos de sementes e alimentos em decomposição (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

As lipases empregadas na produção de biodiesel são obtidas, essencialmente, por leveduras como a lipase B da *Candida antarctica* (CALB) e as lipases de *Candida rugosa* (CRL), *Candida antarctica A* (CALA) e *Candida sp. 99-125*; ou por fungos filamentosos como a lipase de *Rhizomucor miehei* (RML), *Rhizopus oryzae* (ROL) e *Thermomyces lanuginosos* (TLL) (SHARMA e KANWAR, 2014; AGUIEIRAS, CAVALCANTI-OLIVEIRA e FREIRE, 2015).

1.3.2 Propriedades das lipases

A massa molecular das lipases pode variar entre 20 a 75 kDa. A atividade ótima é observada na faixa de pH entre 4 a 9 e em temperatura entre a ambiente até 70°C, mas com atividade ótima na faixa entre 30 e 50°C. A estabilidade térmica das lipases varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que apresentam maior estabilidade térmica (CASTRO et al., 2004).

A principal característica das lipases é a seletividade. Por isso, o emprego das lipases como catalisadores apresenta vantagens, quando comparado ao uso de catalisadores químicos, pois estas apresentam elevada seletividade,tanto para o tipo de reação que catalisam, quanto para os substratos que atuam. Esta seletividade pode ser classificada em regiosseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade (BORDES et al., 2010).

A regiosseletividadeé a preferência pela quebra ou formação da ligação éster nos triglicerídeos em uma determinada posição dentre todas as possiblidades, isto é, a habilidade de distinguir a ligação química em diferentes regiões do substrato e reagir apenas com algumas delas. A regiosseletividade das lipases neste tipo de reações se subdivide em: 1,3 específicas ou não específicas (SHARMA e KANWAR, 2014).

As lipases podem ser classificadas de acordo com a sua especificidade pelo substrato em relação aos triglicerídeos em:

Lipases sn 1,3 regioespecíficas: hidrolisam apenasas ligações éster primárias do triglicerídeo, formando sn 2-monoglicerídeos.A hidrólise total pode ocorrer se a reação for por tempo prolongado, considerando-se que o 2-monoacilglicerol ou 1,2 (2,3)- diacilglicerol

formados, ambos quimicamente instáveis, podem ser isomerizados espontaneamente para as posições 1 ou 3. As lipases de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae, Yarrowia lipolytica*, *Rhizopus niveus*, *Penicillium roquefortii* pertencem a esta categoria. A lipase pancreática é uma típica lipase sn-1,3 específica e algumas lipases vegetais (de colza, de mostarda e de lupino (também denominado de tremoço, a lipase é extraída de sua semente)) têm demonstrado possuir este tipo de especificidade (GUPTA, GUPTA e RATHI, 2004; ANTCZAK et al., 2009; KAPOOR e GUPTA, 2012).

Lipases sn não-específicas: As lipases clivam aleatoriamente todos os três ácidos graxos de um triglicerídeo. Pertencem a esta categoria as lipases produzidas por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum*, *Thermomyces lanuginosus* e *Pseudomonas sp., Penicilium cyclopium*, *Corynebacterium acnes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Candida cylindracea* e a *Candida antarctica* (ANTCZAK et al., 2009; KAPOOR e GUPTA, 2012).

Algumas lipases também apresentam seletividade em relação à saturação e ao tamanho da cadeia do ácido graxo (quimioseletividade). A lipase B de *Geotrichum candidum* hidrolisa preferencialmente grupos acila de cadeia longa, que contenham dupla ligação cis na posição 9, tais como o ácido oleico (MACRAE e HAMMOND, 1985; BUCHHOLZ, KASCHE e BORNSCHEUER, 2005).

As lipases podem apresentar seletividade em relação ao álcool ou ao ácido graxo, na síntese enzimática do biodiesel. Um exemplo é o emprego da lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) na esterificação dos ácidos graxos saturados (palmítico e esteárico) e do ácido graxo insaturado (ácido oleico) para a síntese de biodiesel. Neste caso a lipase mostrou preferência pelo ácido graxo insaturado (AGUIEIRAS, SOUZA e LANGONE, 2013).

Além disso, as lipases podem apresentar ainda estereoespecificidade, isto é, a capacidade de discriminar os enantiômeros de uma mistura racêmica, ou seja, atuar principalmente sobre um tipo de estereoisômero. Por isso são amplamente empregadas na síntese de aminas, de álcoois e de ácidos carboxílicos e de ésteres opticamente puros, que serão utilizados na fabricação de produtos farmacêuticos, agroquímicos, fragrâncias e nutrientes, bem como a resolução de racematos (MIRANDA, MIRANDA e SOUZA, 2015). As lipases de *Burkholderia cepacia*, *Pseudozyma antarctica*, *Candida rugosa* e *Rhizopus delemar* possuem esta especificidade (QUEIROZ, 2002).

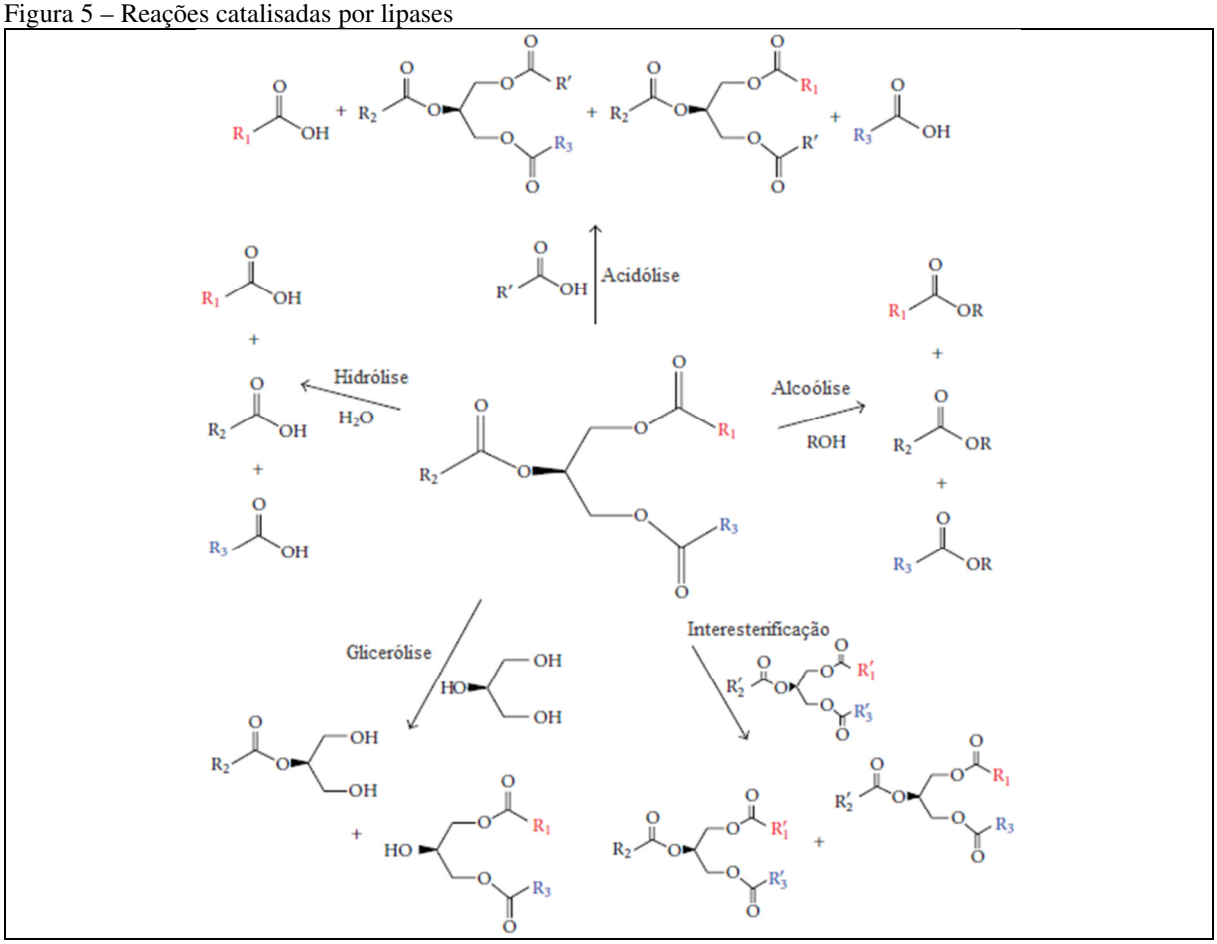
1.3.3 Reações catalisadas por lipases

Conforme descrito anteriormente, as lipases pertencem ao grupo das hidrolases, logo a sua função natural é catalisar a hidrólise total ou parcial de triglicerídeos formando diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol (POURZOLFAGHAR et al., 2016; BUCHHOLZ, KASCHE e BORNSCHEUER, 2005).

Em meio micro aquoso essas enzimas catalisam a reação reversa, reação de esterificação, bem como reações de alcoólise, interesterificação, aminólise e acidólise. Estas reações também podem ocorrer na presença de solventes orgânicos com elevada enantio-, quimio- e regioseletividade e alta especificidade (BORDES et al., 2010; AGUIEIRAS, CAVALCANTI-OLIVEIRA e FREIRE, 2015; POURZOLFAGHAR et al., 2016).

A Figura 5 ilustra reações catalisadas por lipases.

Figura 5 – Reações catalisadas por lipases

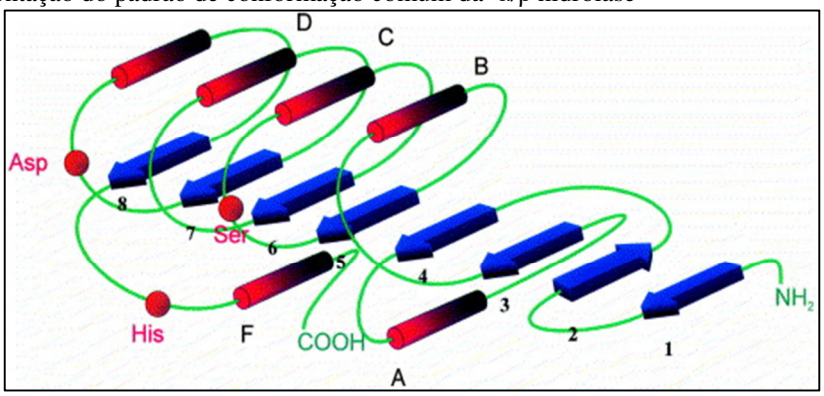


Fonte: Adaptado de RIBEIRO et al., 2011.

1.3.4 Estrutura

Lipases apresentam os mais variados tamanhos e pesos moleculares, exibindo diferentes combinações de aminoácidos em sua estrutura primária. Apresentam um padrão de conformação comum, denominado α/β-hidrolase (GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011). A representação deste padrão de conformação comum é ilustrada na Figura 6. A estrutura α/β hidrolase é composta por um núcleo central constituído por uma folha β, que contém oito diferentes fitas β (1-8) mais ou menos paralelas, sinalizadas pelas setas em azul, circundadas em ambos os lados por α hélices (A-F), sinalizadas pelas colunas em vermelho. A região aminoterminal é marcada por NH_2 no início da cadeia e a região carboxiterminal por COOH no final da cadeia (FAROBIE, YANAGIDA e MATSUMUR, 2014).

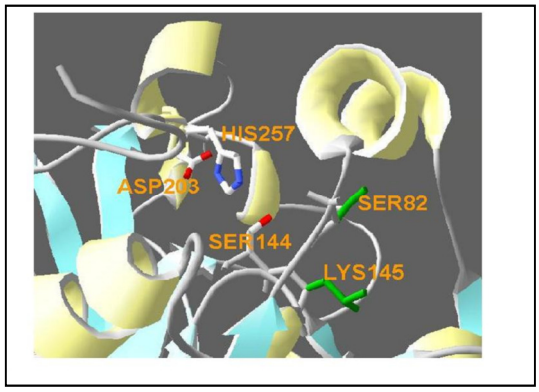
Figura 6 - Representação do padrão de conformação comum da α/β hidrolase



Fonte: BORNSCHUEUER et al., 2002.

O sítio ativo da lipases é formado por uma tríade catalítica composta pelos resíduos de aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico (ou glutâmico) (RAHMAN, SALLEH e BASRI, 2006; BORNSCHEUER, 2002). O sítio ativo da enzima é onde os substratos interagem diretamente para originar os produtos reacionais, ou seja, é onde a reação propriamente dita ocorre. Na maioria das lipases o sítio catalítico (formado pela tríade catalítica contém o resíduo nucleofílico serina (em Gly-X-Ser-X-Gly), que normalmente está protegido por um oligopeptídeo hidrofóbico, denominado de tampa ou "*lid*" (na qual o resíduo de aminoácido histidina da tríade está inserido) (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004; PAIVA, BALCÃO e MALCATA, 2000). A Figura 7 ilustra essa estrutura.

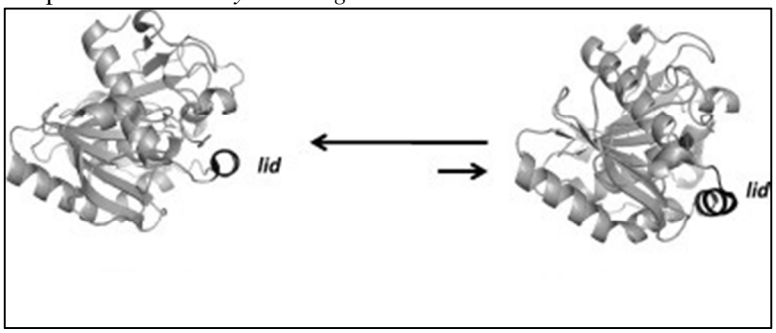
Figura 7 - Estrutura da lipase de *Rhizomucor miehei*



Fonte: Protein Data Bank.

A função da tampa hidrofóbica é permitir o acesso do substrato ao sítio catalítico através do fenômeno de ativação interfacial. A interação entre a tampa hidrofóbica e uma interface lipídeo/água provoca uma alteração conformacional na estrutura da enzima, que por sua vez promove a abertura da tampa, e, consequentemente, a exposição do sítio ativo (ALOULOU et al., 2006; VERGER, 1997; DODSON, LAWSON; WINKLER, 1992). Na conformação em que o sítio ativo da enzima está fechado pela tampa, que cobre a entrada do sítio ativo deixando-o completamente isolado do meio da reação, a lipase é considerada inativa. Já a segunda conformação ocorre quando há ligação do substrato na superfície da enzima. Neste caso, a tampa desloca-se alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, deixando o sítio ativo acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica, que facilita a ligação da lipase à interface hidrofóbica (conformação ativa). Este fenômeno é nomeado como ativação interfacial (BUCHHOLZ, KASCHE e BORNSCHEUER, 2005). A representação da estrutura ativa e inativa da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, é apresentada na Figura 8.

Figura 8 - Estrutura da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em suas formas fechada e aberta.



(a) (b)

Legenda: (a) forma fechada e (b) forma aberta.
A estrutura 3D foi obtida do Protein Data Bank (PDB) usando Pymol vs. 0,99.
Fonte: FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010.

Por isso, as lipases atuam preferencialmente em interfaces água-óleo, ou água-solvente orgânico, e a ativação interfacial relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis, atuando preferencialmente em substratos emulsionados. Devido a esta grande superfície hidrofóbica apresentada em sua conformação ativa, estas enzimas apresentam afinidade por qualquer tipo de superfície hidrofóbica (SHARMA et al., 2001).

Quanto ao movimento da tampa, além da desobstrução espacial e da formação da superfície hidrofóbica, este movimento é fundamental para que um dos resíduos responsáveis pela formação da cavidade do oxiânion adquira uma conformação favorável para estabilização do intermediário tetraédrico.

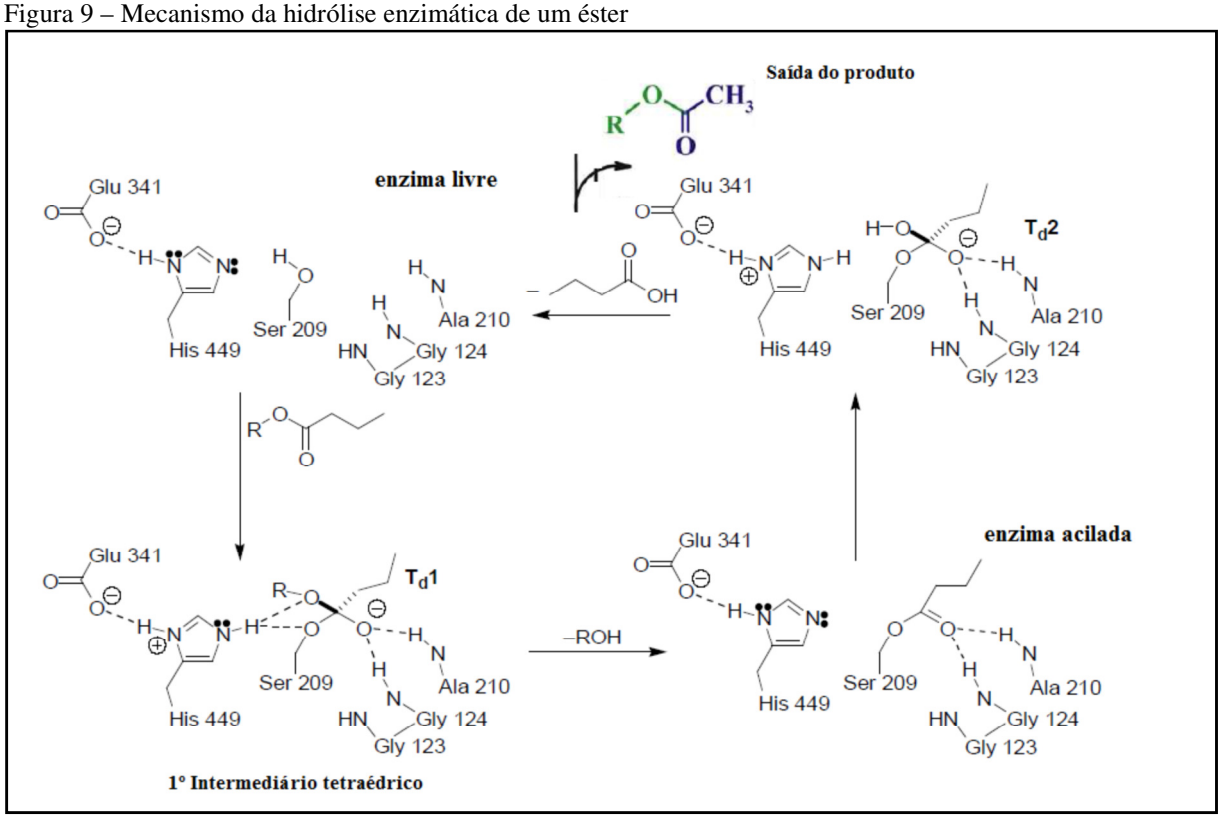
Pode-se observar que algumas lipases, como as obtidas de *Pseudomonas aeruginosa*, de *Burkholderia glumae* e de *Candida antarctica B*, não exibem ativação interfacial ainda que apresentem uma "tampa" cobrindo seus sítios ativos e outras enzimas como a cutinase proveniente do *Bacillus subtilis* e a lipase pancreática do porquinho-da-índia mostram ativação interfacial e não apresentam estrutura tipo "tampa". Desta forma, o efeito da ativação interfacial não está necessariamente relacionado com o movimento da tampa das lipases (JAEGER e REETZ, 1998; JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999).

1.3.5 Mecanismo catalítico

O mecanismo catalítico de reações de hidrólise ou de síntese de ésteres catalisadas pelas lipases é baseado no mecanismo proposto para proteases, devido à semelhança estrutural entre o sítio ativo dessas enzimas (presença da tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu) (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999). O centro ativo fica oculto pela tampa polipeptídica na forma inativa da enzima, o que o torna inacessível às moléculas do substrato que estejam isoladas em meio aquoso. A ativação da enzima, como mencionado anteriormente, ocorre quando há contato com uma interface, e então, há a abertura dessa tampa polipeptídica. Essa abertura consiste na reestruturação conformacional da lipase que cria uma região eletrofílica ("cavidade do oxiânion") em torno do resíduo serina: a tampa helicoidal vira-se para trás encobrindo seu lado hidrofílico em uma cavidade polar, antes preenchida por moléculas de água, e expondo totalmente o lado hidrofóbico da tampa. Essa exposição faz com que a superfície apolar em torno do sítio catalítico seja expandida. A cavidade do oxiânion é responsável pela estabilização de cargas negativas geradas durante o ataque nucleofílico na

ligação carbonila do substrato, portanto estabiliza o estado de transição durante a catálise (PAIVA, BALCÃO e MALCATA, 2000). Na Figura 9 está ilustrado o mecanismo da hidrólise de um éster.

Figura 9 – Mecanismo da hidrólise enzimática de um éster



Legenda: T_d1 e T_d2 representam o primeiro e o segundo intermediários tetraédricos.
Fonte: Adaptado de BORNSCHEUER e KAZSLAUSKAS, 2006 e SIMAS et al., 2011.

A primeira etapa é a ativação do grupo hidroxila do resíduo de aminoácido serina a partir da ligação hidrogênio com a histidina vizinha. Na segunda etapa, que ocorre como consequência da reação, o resíduo de aminoácido serina liberaum próton, que é aceito no anel imidazólico da histidina. Após este processo ocorre interação do terceiro resíduo de aminoácido, o aspartato (ou glutamato), o qual estabiliza a carga positiva formada na histidina. Assim ocorrerá um ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do primeiro substrato. Em uma reação de hidrólise, o ataque nucleofílico será do carbono da carbonila de um éster, quebrando a ligação π do grupo C=O, ocasionando na formação do complexo do primeiro intermediário tetraédrico. O complexo do primeiro intermediário tetraédrico formado é estabilizado por ligações de hidrogênio com os grupos amida dos resíduos da cavidade do oxiânion. O intermediário tetraédrico é desfeito, pelo retorno da

ligação π (C=O) e quebra da ligação éster. O primeiro produto, álcool, produzido na reação de clivagem é liberado.

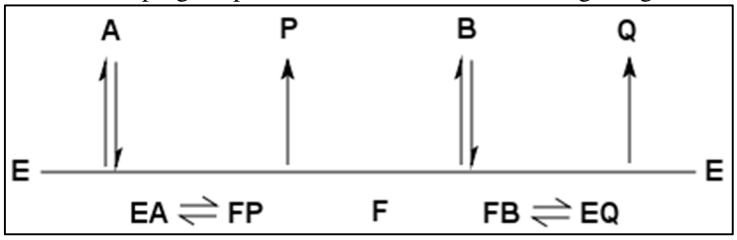
Após a liberação do primeiro produto (-ROH) ocorrerá à formação do intermediário covalente (enzima acilada), onde o componente ácido do substrato encontra-se esterificado com o resíduo serina da enzima. O segundo substrato, molécula de água ou álcool, que se aproxima é ativada pelo resíduo histidina vizinho e o íon hidroxila resultante promove o ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila formando o complexo do segundo intermediário tetraédrico. O retorno da ligação π (C=O), desfaz o complexo do segundo intermediário tetraédrico e finalmente ocorre a liberação do segundo produto, ácido carboxílico ou éster, e da enzima livre.

1.3.6 Cinética

O mecanismo cinético Ping-Pong Bi-Bi é o modelo empregado usualmente para descrever as reações de esterificação e de transesterificação catalisadas por lipases, em meios orgânicos, em que a reação ocorre através da formação de um complexo acil-enzima (LOPRESTO et al., 2014; AZÓCAR et al., 2014). O mecanismo inclui duas formas diferentes para a enzima estável, e dois complexos centrais, onde a adição de cada substrato é seguida pela liberação de produto (SEGEL, 1993).

Para representar este mecanismo é utilizada a notação de Cleland, conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 10 – Notação de Cleland empregada para descrever o mecanismo Ping Pong Bi-Bi com dois substratos



Fonte: FREY e ABLES, 2007.

Na primeira etapa o substrato (A) se liga ao sítio ativo da enzima (E) dando origem ao complexo enzima-substrato (EA), que ao reagir se converte no complexo (FP) e libera o primeiro produto (P) e a enzima acilada (F). Já na segunda etapa, o segundo substrato (B) se

liga com a enzima acilada (F) produzindo um complexo enzima-substrato (FB), que se transforma no complexo (EQ) após reação, dando origem ao produto (Q) e a enzima regenerada (E).

1.3.7 Lipases empregadas para a síntese de biodiesel

Os principais biocatalisadores empregados para produção de biodiesel são Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM (HERNÁNDEZ-MARTÍN e OTERO, 2008; BAJAJ et al., 2010; TAN et al., 2010; STOYTCHEVA et al., 2011; GOG et al., 2012; AARTHY et al., 2014; AMINI et al., 2016).

Neste trabalho foram estudadas quatro lipases microbianas: lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB), lipase de *Rhizomucor miehei*, lipase de *Thermomyces lanuginosus* e lipase de *Yarrowia lipolytica.* Essas enzimas têm sido utilizadas em trabalhos descritos na literatura para síntese de biodiesel (RODRIGUES e FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2010; MACEIRAS et al., 2011; MENDES et al., 2011a; MENG et al., 2011; ROSSET et al., 2011; VASCONCELLOS et al., 2012; JACOBY et al., 2013; MARTINS et al., 2013; VASCONCELLOS et al., 2015; BABAKI et al., 2016; FIRDAUS et al., 2016; ILMI et al., 2016; MUKHERJEE e GUPTA, 2016; SILVA, 2016; TACIAS-PASCACIO et al., 2017). Um breve resumo das principais características dessas lipases é descrito a seguir.

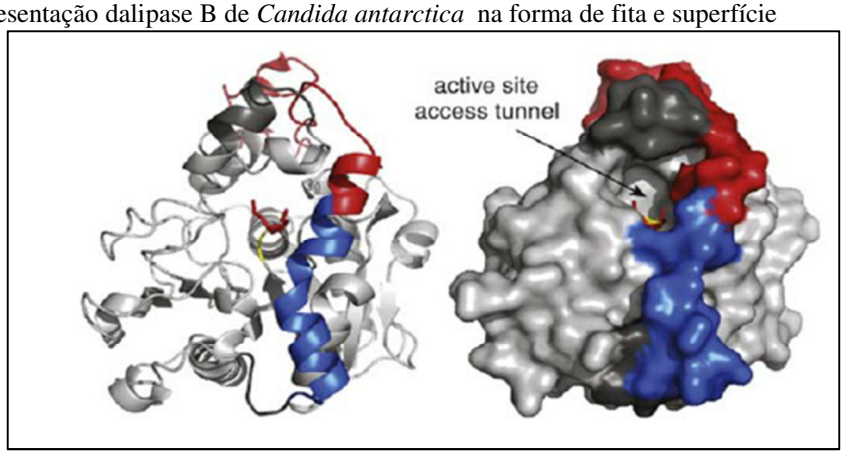
1.3.7.1 Lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB)

A levedura *Candida antarctica* pode produzir duas lipases diferentes denominadas de A e B e estas possuem diferentes características, como pontos isoelétricos (pI), seletividades e massas molares. A lipase CALB pertence a família das α/β hidrolases, possui 317 resíduos de aminoácidos e conserva uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos serina, ácido aspártico e histidina (Ser105-His224-Asp187) (LUTZ, 2004).

A lipase CALB possui um peso molecular de 33 kDa e ponto isoelétrico (pI) 6,0 (UPPENBERG et al. 1994). Possui pH ótimo entre 7 e 8 (PETERSEN, FOJAN e PETERSEN, 2001), diâmetro esférico médio de 39,2 Å (DUMITRIU et al., 2003) e

demonstra ser bastante estereoespecífica em hidrólises e sínteses orgânicas (UPPENBERG et al., 1994). A cavidade de ligação para o substrato (o sítio ativo) consiste em uma cavidade para ligações acila e outra porção para ligações com álcoois. Diferentemente das outras lipases que possuem uma tampa maior na entrada do sítio ativo, a CALB possui uma tampa menor, o que não prejudica a entrada de substratos e saída de produto (UPPENBERG et al. 1994). Na Figura 11 é apresentada a estrutura tridimensional da lipase B de *Candida antarctica.*

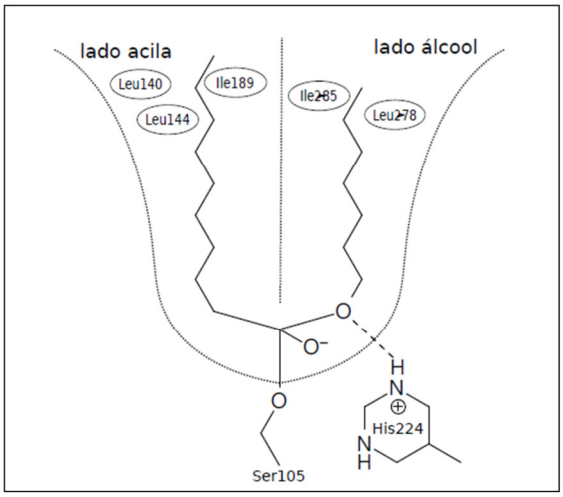
Figura 11 - Representação dalipase B de *Candida antarctica* na forma de fita e superfície



Fonte: QIAN et al., 2009.

Esta lipase possui a cavidade ligante do substrato elíptica, com o formato de um funil íngreme de 9,5 x 4,5 Å (TRODLER; PLEISS, 2008) conforme descrito na Figura 12. As paredes do canal são bastante hidrofóbicas, contudo, na parte superior do sítio ativo há apenas uma pequena área hidrofóbica, o que favorece a não formação de bioagregados por esta enzima (UPPENBERG et al. 1994; TRODLER; PLEISS, 2008). Na Figura 12 é ilustrado o sítio ativo da lipase CALB.

Figura 12 – Sítio Ativo da CALB



Legenda: O sítio ativo pode ser dividido em duas partes, um lado para ligações acila e o outro para ligações álcoois. Essa restrição é necessária devido à transferência de um próton entre o oxigênio do álcool e a histidina do sítio ativo durante a catálise.
Fonte: SOUZA, 2013.

A lipase B de *Candida antarctica* possui alta atividade para ácidos graxos de cadeias curta e média e baixa atividade para cadeias longas (PLEISS, FISCHER e SCHMID, 1998). Esta lipase é bastante estereoseletiva para álcoois secundários (UPPENBERG et al., 1995). A lipase B de *Candida antarctica* não sofre o fenômeno de ativação interfacial (JAEGER e REETZ, 1998), por isso quando imobilizada em suportes hidrofóbicos não apresenta hiperativação da enzima imobilizada.

Blanco et al. (2004) imobilizaram a lipase CALB em sílica hidrofobizada com grupos octil e observaram que as interações hidrofóbicas entre a enzima imobilizada e o suporte afetaram negativamente a estrutura terciária da CALB, promovendo uma queda na atividade da enzima. Esta observação fornece indícios de que o emprego de suportes altamente hidrofóbicos pode de certa forma, reduzir a eficiência de imobilização da CALB.

Como apresenta uma vasta gama de especificidade para substratos, alta atividade para várias reações sob condições brandas, resistência a solventes orgânicos, estabilidade térmica, atuação em uma ampla faixa de pH e elevada estereoespecificidade (MCCABE, RODGER e TAYLOR, 2005; RODRIGUES et al., 2008; DENG et al. 2011), tem sido empregada em vários setores industriais, tais como na indústria de aromas em especial na produção de ésteres (LOZANO et al., 2002; BRÍGIDA et al., 2008), na esterificação de açúcares (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2003), na produção de compostos opticamente ativos na indústria farmacêutica (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2001; STRAATHOF, PANKE e SCHMID, 2002), na síntese de alimentos e fármacos (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004) e na

produção de biodiesel. Contudo, existem limitações ao emprego deste biocatalisador devido à estabilidade, a dificuldades na recuperação e ao seu no reuso.

A lipase B de *Candida antarctica* é comercializada pela Novozymes Latin America Ltda, sendo obtida através da fermentação do micro-organismo geneticamente modificado *Aspergillus niger* que possui um gene que codifica uma lipase de *Candida antarctica.* A sua forma líquida é denominada Lipozyme CALB L, um líquido de coloração marrom com densidade aproximada de 1,20 mg mL^{-1}. Já a sua forma imobilizada é denominada Novozym 435. O método de imobilização desta lipase é a adsorção e seu suporte é uma resina macroporosa de divinilbenzeno reticulada com polimetilmetacrilato (Lewatit VP OC 1600 (Lanxess)), diâmetro de poro médio de 15 nm, área específica (BET) de aproximadamente 130 m^2g^{-1}, volume de poro de aproximadamente 0,5 cm^3g^{-1}. O diâmetro das partículas desta enzima imobilizada é de 0,3 a 0,9 mm e o teor de água presente nesta lipase é 1 a 2% ($m.m^{-1}$). A lipase exibe especificidade para as posições 1 e 3, porém age também como uma lipase não específica (Oils e Fats / 2001-06950-03, Product Sheet, Novozymes).

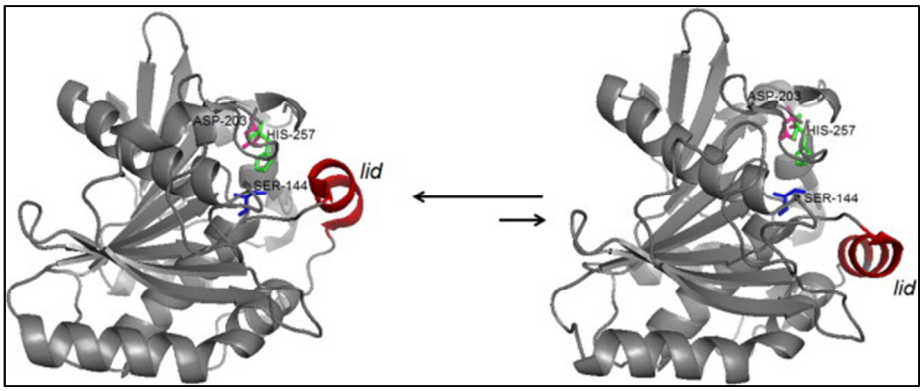
1.3.7.2 Lipase de *Rhizomucor miehei*

A lipase de *Rhizomucor miehei* é extracelular de origem fúngica formada por uma única cadeia polipeptídica constituída por 269 aminoácidos, massa molecular de 29 kDa e um ponto isoelétrico (pI) de 3,8 (RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; OLIVEIRA, 2012). A faixa de pH ótimo para a atividade hidrolítica é entre 7 e 8 (HERRGARD, GIBAS e SUBRAMANIAM, 2000). Possui diâmetro médio esférico de 41 Å (MACARIO et al., 2005).

A lipase de *Rhizomucor miehei* possui uma estrutura com conformação em α/β hidrolase composta de uma sequência específica de α hélices e folhas β pregueadas. A lipase de *Rhizomucor miehei* hidrolisa as ligações éster, por meio da tríade catalítica (sítio ativo), formada por um resíduo de serina (Ser 144) nucleofílico ativado por uma ligação de hidrogênio, em contato permanente com uma histidina (His 257) e um aspartato (Asp 203) (BRADY et al., 1990; SCHMID e VERGER, 1998). Os resíduos serina 82 e leucina 145 constituem a cavidade do oxiânion (NORIN et al., 1994). A região da "*lid*" é constituída de resíduos de aminoácidos que vão desde a posição 85 até 91 (BRZOZOWSKI et al., 1991). Na

Figura 13, a lipase de *Rhizomucor miehei* é descrita em duas conformações: conformação fechada (a) e conformação aberta (b).

Figura 13 - Estrutura tridimensional da lipase de *Rhizomucor miehei* na conformação aberta (a) e conformação fechada (b).



(a) Conformação fechada (b) Conformação aberta

Fonte: Adaptado de POPPE et al., 2015.

Nota-se que em ambientes aquosos sem o substrato natural, a tampa cobre o sítio catalítico, levando à conformação fechada da lipase, onde a mesma é inativa. Já na presença de substratos hidrofóbicos, as lipases são adsorvidas na interface hidrofóbica, o que promove mudanças na estrutura da enzima, ocasionando uma conformação aberta, onde a enzima está ativa. Nesta conformação o movimento da "*lid*" facilita o acesso ao sítio ativo, bem como expõe uma extensa zona hidrofóbica que interage com a interface lipídica (DEREWENDA et al., 1992).

A lipase de *Rhizomucor miehei* é comercializada pela Novozymes Latin America Ltda, sendoobtida por fermentação com o micro-organismo geneticamente modificado *Aspergillus oryzae* que possui um gene que codifica uma lipase de *Rhizomucor miehei.* A sua forma líquida é denominada Palatase 20000L. Já a sua forma imobilizada é denominada Lipozyme RM-IM. O método de imobilização desta lipase é pela adsorção da enzima no suporte, que é uma resina de troca iônica fracamente básica, granular e altamente porosa com matriz de fenol-formaldeído policondensado (Duolite A568 (Rohm and Haas)). O diâmetro das partículas desta enzima imobilizada é de 0,2 a 0,6 mm e o teor de água presente nesta lipase é de 2 a 3% ($m.m^{-1}$). A lipase Lipozyme RM IM apresenta especificidade para as posições 1 e 3 (Oils e Fats / 2000-10503-04, Product Sheet, Novozymes).

No que abrange a hidrólise de óleos, a Lipozyme RM IM é 1,3-regiosespecífica, isto é, catalisa preferencialmente a hidrólise nas posições 1 e 3 da ligação éster dos triglicerídeos (SHARMA e KANWAR, 2014). Comparada a outras lipases, apresenta grande estabilidade

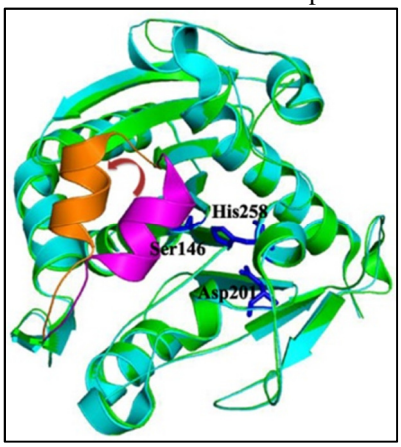
em meio anidro, sendo assim muito empregada em reações de esterificação de diversos ésteres de uso industrial (RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

1.3.7.3 Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* é uma proteína de cadeia simples formada por 269 aminoácidos, massa molecular de 31,7 kDa e ponto isoelétrico de 4,4 (JHA et al., 1999). Esta lipase é bastante estável, mantém atividade na faixa de 55-60°C (FERNANDES et al., 2004), com o máximo de atividade no pH em torno de 9 (RODRIGUES et al., 2009).

Possui forma aproximadamente esférica, com diâmetro médio de 53,2 Å (LAGE et al., 2016) e contém uma estrutura com conformação de folha β central de oito cadeias predominantemente paralela com cinco α hélices interligadas. A tampa é um loop de superfície móvel alfa-helicoidal constituído pelos aminoácidos 86-93, que cobre o sítio ativo (DEREWENDA et al., 1994). De acordo com estudos cristalográficos de raios-X, esta tampa também é altamente móvel nos cristais. O sítio ativo inclui a típica tríade catalítica Ser-His-Asp. Um dos quatro resíduos Trp (triptofano) da *Thermomyces lanuginosus*, Trp89, está localizado na tampa. Este resíduo é de extrema importância para que a hidrólise seja eficiente (HOLMQUIST et al., 1995). A ativação interfacial da lipase de *Thermomyces lanuginosus* é controlada atraves dos resíduos catiônicos em torno da tampa (BERG et al., 1998). A repressentação da estrutura da lipase de *Thermomyces lanuginosus* é apresentada na Figura 14.

Figura 14 – Representação gráfica tridimensional da estrutura da lipase de *Thermomyces lanuginosus*



Legenda: Superposição das conformações próximas (verde, código PDB: 1DT3) e aberto (ciano, código PDB: 1EIN) da lipase *Thermomyces lanuginosus*. A tampa fechada, a tampa aberta e as tríades catalíticas foram destacadas por cores magenta, laranja e azul, respectivamente.
Fonte: KHAN et al., 2017.

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (anteriormente denominada de *Humicola lanuginosa*) é comercializada pela Novozymes Latin America Ltda, tanto em forma solúvel (Lipolase 100L) como imobilizada (Lipozyme TL IM). A Lipolase 100L é produzida por uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus oryzae* (PRATHUMPAI et al., 2004; GOUKA et al., 1996). O suporte usado na imobilização de *Thermomyces lanuginosus* para produzir a Lipozyme TL IM é um silicato e o processo de imobilização é via adsorção iônica (CHRISTENSEN, KIRK e PEDERSEN, 2003; PENG et al., 2002). O diâmetro das partículas desta enzima imobilizada é de 0,3 a 1,0 mm. A lipase Lipozyme TL IM apresenta especificidade para as posições 1 e 3 da ligação éster dos triglicerídeos (Oils e Fats / 2001-06952-04, Product Sheet, Novozymes).

Inicialmente indicada para a indústria alimentícia, a enzima encontrou aplicações em diferentes áreas industriais, desde a produção de biodiesel até produtos da química fina (principalmente em processos enantio e regioseletivos) (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

1.3.7.4 Lipase de *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é dita uma levedura não convencional, pois difere dos modelos celulares mais estudados como, por exemplo, a *Saccharomyces cerevisiae* (considerada levedura "convencional") em relação à fisiologia, genética e biologia molecular (BARTH e GAILLARDIN, 1997). Essa levedura possui capacidade de excretar ácidos orgânicos, como

ácido cítrico e pirúvico, além de secretar diferentes enzimas como lipases e proteases, o que possibilita a degradação de diferentes substratos, principalmente os de caráter hidrofóbico.

A levedura *Yarrowia lipolytica* pode utilizar vários substratos como fontes de carbono, dentre os quais se podem citar: alcanos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, glicerol, proteínas e alguns açúcares (frutose e glicose) (AMARAL, 2007; ZHU e JACKSON, 2015). Além disso, essa levedura produz e excreta importantes metabólitos como ácidos orgânicos, lisina, proteases, RNases, lipases, esterases e fosfatases (BRÍGIDA et al., 2014; NICAUD et al., 2002; BARTH e GAILLARDIN, 1997).

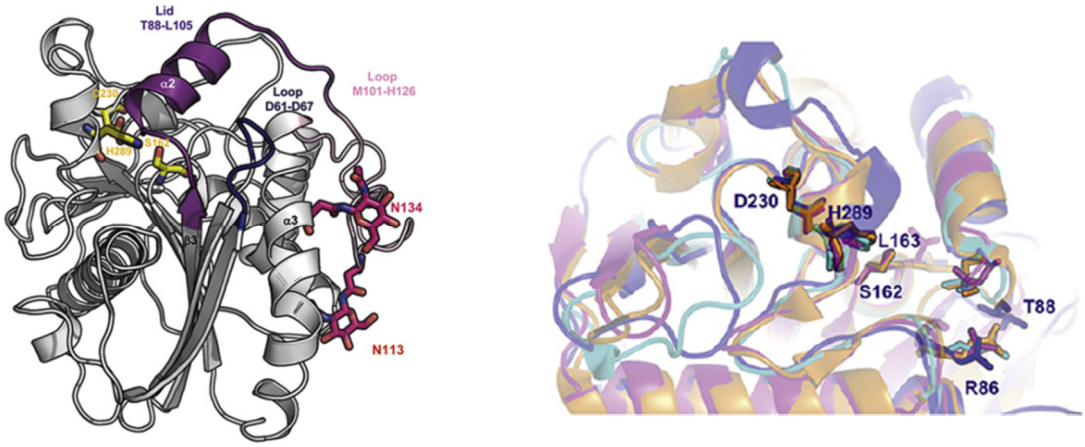
Este microrganismo possui os genes Lip1, Lip2, Lip3, Lip4, Lip5, Lip6, Lip7, Lip8, Lip9, Lip10, Lip11, Lip12, Lip13, Lip14, Lip15, Lip16, Lip17, Lip18, Lip19, Lip20, referentes à síntese de diversas lipases (FICKERS, MARTY e NICAUD, 2011), mas os genes mais conhecidos e estudados são os genes das lipases Lip1, Lip3 e Lip6 referentes à síntese de lipases intracelulares (FICKERS et al., 2005), da Lip2 que é uma lipase extracelular (PIGNÈDE et al., 2000) e das lipases Lip7 e Lip8, que estão ligadas à membrana celular da levedura e são bastante estáveis a variações de pH e temperatura (SONG et al., 2006).

A Lip2 é a lipase mais facilmente excretada, apresenta alta atividade hidrolítica, de esterificação e de transesterificação, o que possibilita seu emprego como biocatalisador para a síntese de ésteres, para a produção de biodiesel (YAN, ZHANG e CHEN, 2013) e para a resolução de misturas racêmicas de interesse farmacêutico (FICKERS, MARTY e NICAUD, 2011).

A massa molecular das lipases obtidas na fermentação de *Yarrowia lipolytica* varia entre 38,5 e 44 kDa. As lipases possuem atividade hidrolítica na faixa de pH entre 6 e 10, e os valores ótimos de pH são 6, 7 e 9. As lipases de *Yarrowia lipolytica* são 1,3 regioespecíficas na hidrólise das ligações éster do triglicerídeo (HOU, 1997; GUIEYSSE et al., 2004). A temperatura ótima dessa lipase situa-se na faixa de 37-55°C (YU, QIN e TAN, 2007; FICKERS, MARTY e NICAUD, 2011).

A tríade catalítica da Lip2 é constituída por Ser162, His289 e Asp230. A Lip2p apresenta especificidade para ácidos graxos de cadeias média e longa (PLEISS, SCHEIB e SCHMID, 2000). Na Figura 15 é ilustrada a estrutura da lipase de *Yarrowia lipolytica.* Já na Figura 16 é possível visualizar a lipase tanto em sua conformação aberta quanto fechada.

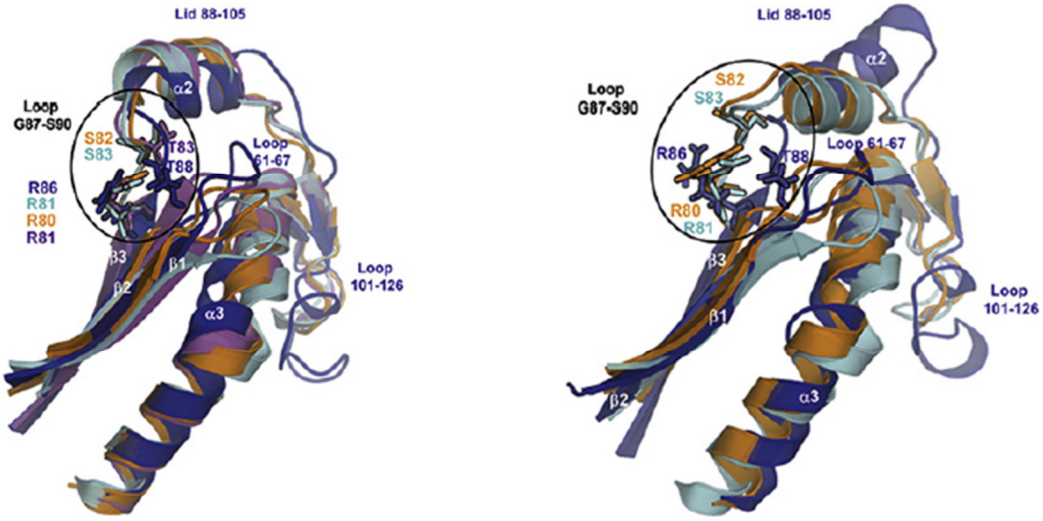
Figura 15 – Estrutura da lipase de *Yarrowia lipolytica* onde são descritas: a tampa, as estruturas proteicas e os resíduos que constituem a tríade catalítica



(a) (b)

Legenda: (a) tampa (T88-L105), estruturas α-hélice (D61-D67) e folha β-pregueada (M101- H126) e (b) resíduos da tríade catalítica (S162, D230, H289).
Fonte: Adaptado de BORDES et al., 2010.

Figura 16 – Lipase de *Yarrowia lipolytica* nas suas conformações aberta (a) e fechada (b)



(a) (b)

Fonte: Adaptado de BORDES et al., 2010.

As lipases de *Yarrowia lipolytica* são empregadas no tratamento de efluentes oriundos da indústria de processamento de azeite de oliva, na química fina para resolução de misturas racêmicas de fármacos, na polimerização e modificação de gorduras, na indústria alimentícia na maturação de queijos como o Camembert, na produção de ácido cítrico, entre outras aplicações (FICKERS, MARTY e NICAUD, 2011). Também é utilizada na produção de ácidos orgânicos (cítrico, isocítrico, pirúvico e succínico), na produção de aromas, na produção de proteínas para alimentos e na produção de emulsificantes e surfactantes (COELHO, AMARAL e BELO, 2010; BRAGA, 2009; LADESMA-AMARO e NICAUD, 2016).

1.4 Imobilização deenzimas

A utilização de enzimas solúveis apresenta uma série de desvantagens como: alto custo de produção e purificação, instabilidade da estrutura tridimensional quando isoladas do seu ambiente natural e possível perda de atividade devido às condições reacionais. Esses fatores podem resultar em um tempo de meia-vida operacional curto, aumentando o custo do processo. Além disso, as enzimas livres podem contaminar o produto por serem recuperadas do meio reacional em sua forma ativa (KRAJEWSKA, 2004).

Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou sistema analítico. No caso das enzimas, a imobilização consiste no confinamento da proteína em um suporte sólido insolúvel em meio aquoso e em solventes orgânicos, e pode ser usada isolada ou em combinação com outras técnicas de estabilização de proteínas, sendo considerada uma das ferramentas mais eficientes para alterar a especificidade, seletividade, atividade, e estabilidade das enzimas (MATEO et al., 2007).

Deste modo, o emprego de biocatalisadores imobilizados surge como uma alternativa para diminuir o elevado custo da aplicação de enzimas nos processos biocatalíticos, possibilitando seu emprego em escala comercial. Ao longo de décadas, várias pesquisas têm sido realizadas a fim de se obter enzimas cataliticamente ativas e insolúveis no meio reacional e, sobretudo, reutilizável em novos processos catalíticos.

Existe uma série de vantagens no emprego de enzimas imobilizadas frente às enzimas livres (FREIRE, 1988; BERGAMASCO et al., 2000; GÜRSEL et al., 2003; GÓMEZ et al., 2005; SZYMANSKA et al., 2007; MATEO et al., 2007; BRADY e JORDAAN, 2009; MENDES et al., 2011b; RODRIGUES et al., 2013), pode-se citar:

- Estabilização da enzima: as enzimas imobilizadas podem ser mais robustas e mais resistentes a mudanças do ambiente reacional, incluindo influências de temperatura, pH e solventes orgânicos;
- Processos que empregam enzimas imobilizadas podem ser conduzidos em modo contínuo, usando leitos fixos ou fluidizados, uma vez que podem ser facilmente controlados;
- Possibilidade de reutilização do biocatalisador, sem uma perda significativa na atividade;

- Possibilidade de utilizar uma alta concentração de enzima por volume de reator, quando em comparação ao emprego das enzimas livres;
- Facilidade de separação dos produtos do meio reacional e de interrupção da reação quando se atinge um determinado grau de conversão;
- Redução do custo operacional, uma vez que a vida útil de uma enzima imobilizada pode ser longa.

Como desvantagens do processo de imobilização pode-se citar:

- Possibilidade de perda de atividade enzimática durante o processo de imobilização, uma vez que a proteína pode ser distorcida, principalmente se interações múltiplas entre a enzima e o suporte ocorrerem, o sítio ativo pode ser bloqueado;
- Efeitos difusionais devido: a difusão do substrato do seio da fase líquida até a superfície do suporte, transporte do substrato da superfície do suporte para o domínio da enzima, transporte do produto do domínio da enzima a superfície do suporte, difusão do produto da superfície do suporte para o seio do meio reacional;
- Efeitos de partição causados pela desigualdade na distribuição das espécies químicas entre o microambiente e o seio do meio reacional. Esses efeitos resultam de interações hidrofóbicas, hidrofílicas e eletrostáticas entre o suporte e o substrato.

De um modo geral, as enzimas livres e imobilizadas diferem quanto as suas características bioquímicas e cinéticas. As alterações encontradas são atribuídas a dois fatores principais: (1) mudanças conformacionais em sua estrutura tridimensional, por exemplo, maior ou menor flexibilidade da proteína adquirida pelo contato com o suporte de imobilização; e (2) natureza heterogênea do microambiente em que a enzima se encontra, no qual as concentrações de substrato, produto e cofator podem ser diferentes da presente na solução (MARCONI, 1989).

Durante o processo de imobilização pode-se observar: mudanças conformacionais da estrutura da enzima que ocasionem a sua imobilização em uma forma inativa; perda da atividade catalítica e dessorção de moléculas de enzima do microambiente do suporte. Idealmente, o custo da imobilização deve ser compensado pela vida útil do biocatalisador (MATEO et al., 2007; MENDES et al., 2011b). Por isso, dependendo da relação entre o custo

do suporte e estabilidade do derivado imobilizado, a imobilização ao invés de reduzir o custo de um determinado processo, pode torna-lo ainda mais caro.

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como: atividade global do biocatalisador, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização, estabilidade operacional, propriedades hidrodinâmicas e características finais desejadas para a enzima imobilizada (DALLA-VECHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004; MENDES et al., 2011b; ILLANES et al., 2012).

A imobilização de uma enzima pode aumentar sua atividade (velocidade de uma reação por massa de enzima), especificidade (discriminação entre substratos) e seletividade (produção de um entre vários produtos possíveis) (RODRIGUES et al., 2013), sua estabilidade (enzimas imobilizadas são menos susceptíveis a influência do meio reacional), otimiza a dispersão enzimática podendo melhorar a acessibilidade para os substratos e evita a agregação das partículas hidrofílicas da proteína (HANEFELD, GARDOSSI e MAGNER, 2009).

1.4.1 Métodos de imobilização

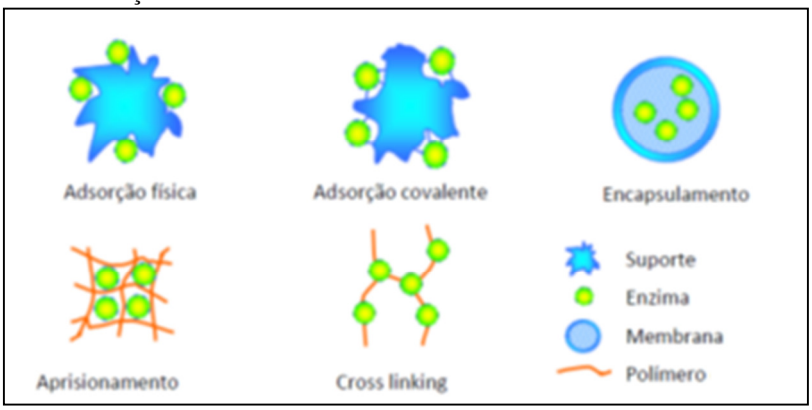
Inúmeras técnicas podem ser empregadas para imobilizar lipases, empregando tanto processos físicos quanto químicos, sendo estes por adsorção ou sem a ocorrência de ligações a um suporte. No processo de adsorção ocorre a ligação da enzima a um suporte sólido e esta ligação pode ocorrer por interações covalentes e não covalentes (MATEO et al., 2007; VILLENUEVE et al., 2000). Para que ocorra a diminuição da energia livre de Gibbs, que possibilita a adsorção das proteínas, é necessário que ocorram as seguintes contribuições: a desidratação hidrofóbica, mudanças estruturais, interações eletrostáticas, interações de van der Waals ou outras ligações específicas (REIS et. al, 2009). Outros métodos que podem ser empregados se referem à imobilização de lipases por confinamento, captura ou microencapsulamento, onde não ocorrem ligações físicas e/ou químicas na superfície de um suporte sólido. Neste caso, as lipases são apenas retidas em uma membrana semipermeável ou encapsuladas em um gel polimérico e sofrem uma delimitação através de uma barreira física, que impede a sua dessorção para o meio externo. Contudo, não ocorre uma restrição à sua mobilidade no interior do sistema. Assim, as enzimas ficam protegidas e menos susceptíveis

às mudanças estruturais (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, SANROMÁN e MOLDES, 2013; VILLENUEVE et al. 2000).

Os métodos de imobilização de enzimas podem ser classificados de acordo com a natureza da interação enzima-suporte, bem como o não emprego de suporte (Figura 17). São divididos em:

- Adsorção física (Forças não covalentes);
- Adsorção covalente (Ligação química);
- Cross-linking (Ligações cruzadas);
- Encapsulamento (Confinamento em membranas);
- Aprisionamento (Confinamento em polímero).

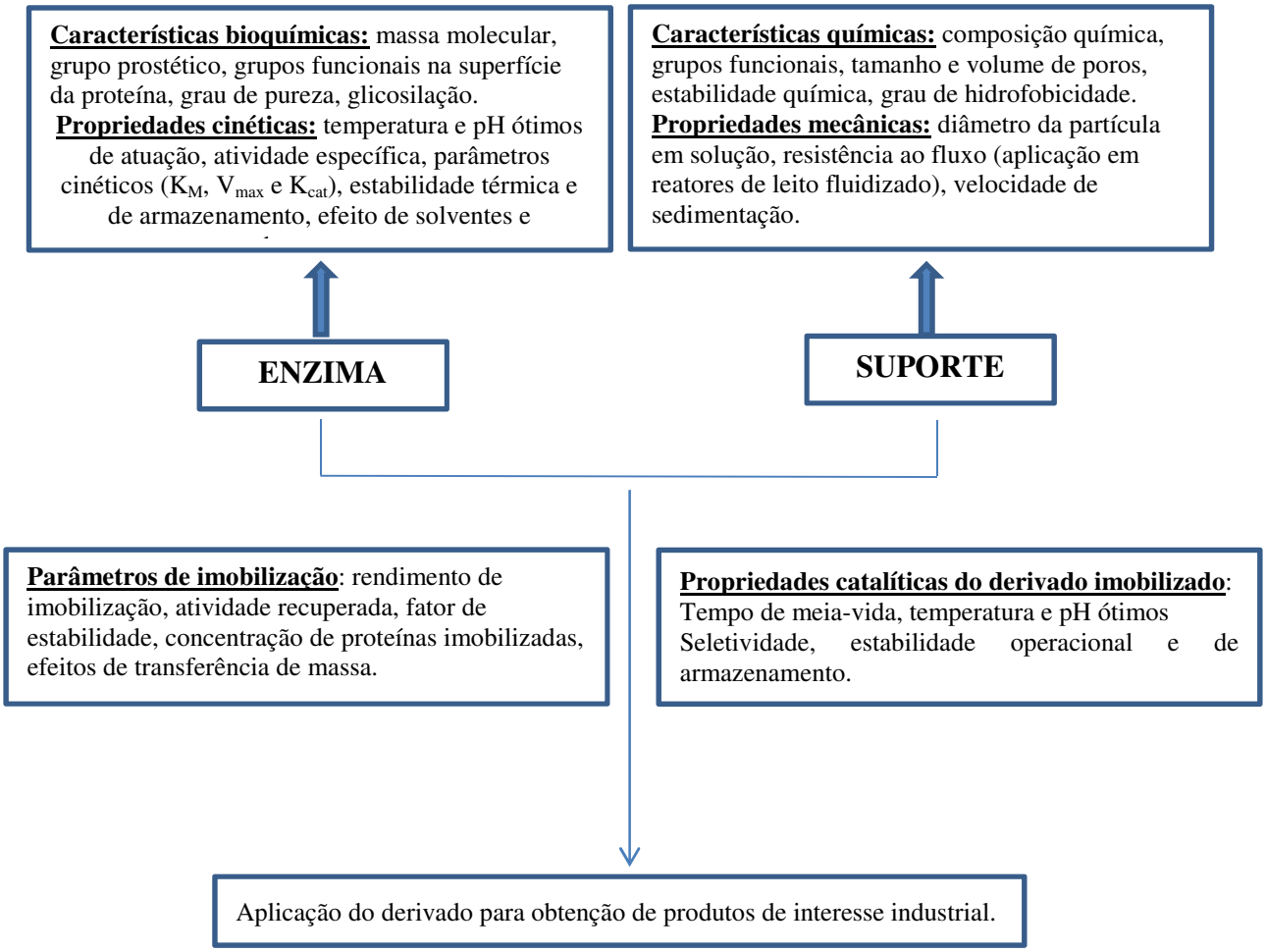
Figura 17 – Tipos de imobilização de enzimas



Fonte: Adaptado de SALLEH, RAHMAN e BASRI, 2006.

Na Figura 18 é apresentado um fluxograma com um resumo das características mais importantes que a enzima e o suporte devem possuir para serem empregados no processo de imobilização.

Figura 18 – Características importantes da enzima e do suporte que devem ser observadas no processo de imobilização de enzimas.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Na Tabela 8 é apresentada uma comparação geral entre os diferentes métodos de imobilização de enzimas.

Tabela 8 – Comparação geral entre as diferentes técnicas de imobilização de enzimas

Características	Adsorção	Ligação covalente	Aprisionamento	Confinamento em membranas
Preparação	Fácil	Difícil	Difícil	Fácil
Custo	Baixo	Alto	Moderado	Alto
Força de ligação	Variável	Forte	Fraco	Forte
Dessorção de enzima	Sim	Não	Sim	Não
Aplicabilidade	Ampla	Seletiva	Ampla	Muito ampla
Problemas operacionais	Alto	Baixo	Alto	Alto
Efeitos da matriz	Sim	Sim	Sim	Não
Grandes barreiras difusionais	Não	Não	Sim	Sim
Proteção contra microrganismos	Não	Não	Sim	Sim

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

O método de imobilização por adsorção física é a técnica mais antiga de produção de enzimas imobilizadas e envolve procedimentos simples, fáceis e de baixo custo e será o método estudado neste trabalho. A imobilização da enzima no suporte sólido ocorre a partir do emprego de baixas energias de ligação. A ligação das enzimas ao suporte sólido é realizada a partir de interações fracas, como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, interações hidrofóbicas (forças entrópicas), mas também pode ocorrer adsorção iônica via interações eletrostáticas (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, SANROMÁN e MOLDES, 2013; ZHENG et al., 2012; ZHOU et al., 2012; MENDES et al. 2011b; VILLENUEVE, 2000).

As vantagens do emprego desse método são: facilidade e simplicidade da técnica, condições brandas; custo relativamente baixo dos suportes (que não precisam ser ativados) e do processo de imobilização; fácil recuperação do suporte, após desnaturação da enzima, pode ser utilizado novamente em novas imobilizações e não requer o emprego de aditivos durante a adsorção (ZHANG et al., 2012; ZHOU et al., 2012). Outra vantagem deste método é que ao serem imobilizados os biocatalisadores não sofrem alterações significativas na sua estrutura tridimensional, uma vez que a enzima é espontaneamente imobilizada em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável, não ocasionando em uma desnaturação (ZHOU et al., 2012). Como desvantagem pode-se citar a relativa fraqueza das forças de ligação dos adsorventes, que pode ocasionar a dessorção das enzimas quando submetidas a variações de temperatura, pH, força iônica ou natureza do solvente e dificuldade quanto a estabilidade da enzima imobilizada (BRADY e JORDAAN, 2009; ARICA, ALTINTAS e BAYRAMOGLU, 2009; GUIDINI et al., 2010; MENDES et al., 2011b).

Uma série de técnicas foi desenvolvida a fim de reduzir a dessorção da enzima, como por exemplo, a modificação química do suporte, a redução do tamanho de seus poros ou a reticulação da enzima no interior dos poros (HE et al., 2006; REIS, WITULA e HOLMBERG, 2008). Outros estudos sugerem que a hidrofobização do suporte pode resultar na redução da lixiviação e melhoria da atividade enzimática (REIS, WITULA e HOLMBERG, 2008).

O controle dessas variáveis é requerido para a adsorção otimizada e retenção da atividade, devido à ligação fraca entre suporte e enzima. Para que o sistema seja estável é indispensável que as condições de adsorção da enzima ao suporte sejam idênticas às do sistema reacional no qual se utilizará o sistema imobilizado. Caso a interação suporte/enzima seja de natureza essencialmente iônica, uma ligeira mudança do pH ou da força iônica do

meio de reação pode ser suficiente para causar a dessorção da proteína (DALLA-VECCHIA et al., 2004; JEGANNATHAN et al*.,* 2008).

Para que o processo de imobilização por adsorção física seja eficiente, faz-se necessário observar uma série de parâmetros, dentre os quais se destacam: o tamanho da enzima a ser adsorvida, a área específica do material que será empregado como suporte, suas propriedades morfológicas, as características químicas da superfície e o pH do meio de imobilização (VILLENEUVE et al., 2000). No método de adsorção podem ser utilizados suportes porosos, de modo que, dependendo do tamanho dos poros, a enzima possa ser adsorvida tanto na superfície externa quanto no interior dos poros ou em ambos.

A adsorção física é o método mais empregado no setor industrial, que utiliza lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos (MENDES et al., 2011b; SECUNDO et al., 2008; CHRISTENSEN, KIRK e PEDERSEN, 2003; BORNSCHEUER, et al., 2002). A adsorção pode ser favorecida por suportes hidrofóbicos, uma vez que o método de imobilização das enzimas seja realizado através do emprego de interações hidrofóbicas e de van der Waals. Desse modo, as mudanças entrópicas e as forças de van der Waals serão responsáveis por assegurar certa estabilidade nas interações das enzimas com esses materiais (HANEFELD, GARDOSSI e MAGNER, 2009).

Devido à facilidade de imobilização pelo método de adsorção física e grande utilização destes biocatalisadores imobilizados, é possível adquirir enzimas imobilizadas em suportes e utilizá-las na síntese de biodiesel conforme descrito na Tabela 9.

Tabela 9 – Algumas lipases comerciais imobilizadas usadas para a produção de biodiesel

Nome comercial	**Enzima original**	**Suporte**	**Hidrofobicidade/hidrofilicidade**	**Produtor ou inventor**
Novozym 435	*Candida antarctica* tipo B	Lewatit VP OC 1600	Hidrofobicidade média	Novozymes (Dinamarca)
Lipozyme RM IM	*Rhizomucor miehei*	Duolite A568	Hidrofílica	Novozymes (Dinamarca)
Lipozyme TL IM	*Thermomyces lanuginosus*	Sílica granulada	Hidrofílica	Novozymes (Dinamarca)
Lipase PS Amano IM	*Burkholderia cepacia*	Terra diatomácea	Hidrofílica	Amano (Japão)
-	*Candida* sp. 99-125	Membrana têxtil	Hidrofóbica	Universidade de Tecnologia Química de Pequim (China)

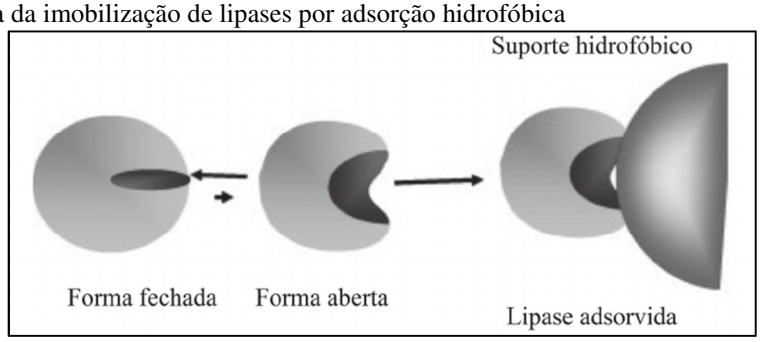
Fonte: ZHAO et al., 2015.

A adsorção hidrofóbica de lipases sobre suportes porosos ocorre via ativação interfacial, quando as enzimas reconhecem estes suportes como sendo uma interface hidrofóbica/hidrofílica, podendo expor o sítio ativo.

Conforme já citado, as lipases apresentam duas diferentes configurações: uma forma fechada, considerada inativa, na qual o contato entre o sítio ativo e o meio reacional é bloqueado por uma cadeia polipeptídica hidrofóbica chamada de tampa ("*lid*"); e a forma aberta, na qual a tampa é deslocada e o sítio ativo totalmente exposto ao meio de reação. Na presença de uma superfície hidrofóbica, a molécula de lipase sofre uma mudança conformacional e o equilíbrio é deslocado para a conformação aberta. Nesse caso a região do sítio ativo da enzima interage com o suporte por adsorção hidrofóbica, uma vez que reconhece como similar aos seus substratos naturais. Assim, a lipase é imobilizada em sua conformação ativa por um mecanismo exclusivo denominado de ativação interfacial (BRADY et al., 1990; DEREWENDA et al., 1992; PALOMO et al., 2002; MATEO et al. 2007; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; CABRERA et al., 2009; HANEFELD, GARDOSSI e MAGNER, 2009).

Na Figura 19 é apresentada uma representação esquemática da mudança conformacional de uma lipase e sua ligação em suporte hidrofóbico.

Figura 19 – Esquema da imobilização de lipases por adsorção hidrofóbica



Fonte: Adaptado de MATEO et al., 2007.

Após a adsorção da enzima sobre o suporte, devido a proximidade da superfície do suporte hidrofóbico à região do sítio ativo da enzima, pode ocorrer diminuição da atividade da enzima devido ao impedimento estereoquímico que substratos muito grandes ou hidrofílicos podem sofrer (MATEO et al., 2007). Geralmente, a adsorção hidrofóbica de lipases sobre suportes porosos ocorre na superfície. Os suportes porosos possuem superfície interna recoberta por espessas camadas bem definidas e altamente hidrofóbicas a baixa força iônica (BATISDA et al., 1998; PAIVA et al., 2000; PALOMO et al., 2002).

1.4.2 Suportes para Imobilização de Enzimas

A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte, apesar de existirem diferentes materiais que podem ser aplicados na imobilização de enzimas, a sua escolha dependerá essencialmente das características da enzima e das condições de uso da biomolécula imobilizada (MILETIC et al., 2009).

Quando se imobiliza uma enzima o objetivo é obter um biocatalisador insolúvel, ativo, estável e reutilizável. Deste modo, encontrar um suporte ideal é um desafio no que diz respeito à área de desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados. Para se estabelecer um protocolo de imobilização de lipases, por ligação em suportes sólidos, o principal parâmetro a ser avaliado é a natureza química do suporte. A estrutura física e composição química do suporte podem influenciar a capacidade de adsorção e a retenção das propriedades catalíticas da enzima, afetando a atividade e a estabilidade do biocatalisador imobilizado (TALBERT e GODDARD, 2012). Deste modo, o sucesso da imobilização depende do tipo de suporte empregado.

O suporte ideal deve possuir as seguintes características: ser inerte na reação, estável e resistente à força mecânica (CARDOSO, MORAES e CASS, 2009). Também é de suma importância os aspectos morfológicos e a química de superfície. Dentre as quais se destaca: elevada área superficial (deve ser superior a 10 m^2g^{-1}, para possibilitar a imobilização de quantidades significativas de enzima, a forma, a distribuição e tamanho de poros (o diâmetro dos poros deve permitir o fácil acesso da enzima e do substrato) e permeabilidade. Além disso, devem possuir uma alta densidade de grupos químicos reativos em sua superfície, de modo que estes grupos possam ser ativados ou modificados permitindo a ligação da enzima em condições que não a desnaturem (BON et al., 2008), caráter hidrofóbico/hidrofílico da superfície, presença de cargas superficiais, estabilidade química e mecânica sob as condições operacionais (HANEFELD, GARDOSSI e MAGNER, 2009; TALBERT e GODDARD, 2012; VILLENUEVE et al. 2000).

Os suportes devem ser insolúveis, para prevenir a liberação da enzima do suporte, mas principalmente para evitar a contaminação do produto, pelo suporte dissolvido e pela enzima. O suporte deve ser resistente à degradação por micro-organismos, de modo a evitar a liberação da enzima para a solução (BON et al., 2008). Além disto, deve ser regenerável e reutilizável, uma vez que as leis ambientais sobre a poluição e o esgotamento das reservas naturais tornaram a regeneração e o reciclo necessidades prementes nos processos em larga escala. Por

isto, tanto a possibilidade de regeneração como a reutilização da matriz devem ser consideradas na avaliação econômica do sistema com enzima imobilizada.

Contudo, particularmente, para que os sistemas de biocatalisadores imobilizados tenham potencial de aplicação industrial, não basta apenas que sejam ativos e estáveis, mas que também sejam de baixo custo e possam ser repetidamente utilizados (HANEFELD, GARDOSSI e MAGNER, 2009).

De acordo com sua origem, os suportes podem ser classificados como materiais orgânicos e inorgânicos. Quanto a sua morfologia podem ser porosos, não porosos e de estrutura em gel (MATEO et al., 2007; MENDES et al., 2011b).

Os materiais porosos apresentam como principal vantagem uma elevada área superficial interna disponível para imobilização de enzimas. O diâmetro dos poros do suporte deve ser suficientemente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato (DALLA-VECHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

A desvantagem do uso dos suportes porosos diz respeito a problemas relacionados a limitações difusionais, pois o substrato além de se difundir da solução para superfície externa, deverá se difundir também para o interior dos poros do suporte, onde grande parte das moléculas do catalisador está situada. Contudo a localização das moléculas de enzimas no interior dos poros também confere proteção frente a eventuais condições adversas do meio reacional (DALLA-VECHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004; MATEO et al., 2007; MENDES et al., 2011b).

Os suportes não porosos apresentam como principal vantagem à acomodação das moléculas de enzima apenas na sua superfície externa, o que facilita a interação do catalisador com moléculas de substrato. No entanto, a pequena área superficial exibida por esses suportes é sua mais notória desvantagem DALLA-VECHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004; MATEO et al., 2007; MENDES et al., 2011b).

Existe uma ampla variedade de suportes naturais ou sintéticos, orgânicos ou inorgânicos, hidrofóbicos ou hidrofílicos e também híbridos orgânico-inorgânicos sintéticos que podem ser empregados para a imobilização de lipases. Inicialmente, os materiais empregados no processo de imobilização foram os inorgânicos, dentre os quais se podem citar sílica, zeólita, alumina e terra diatomácea. Os materiais inorgânicos geralmente são estáveis térmica e mecanicamente, não são tóxicos e são resistentes à presença de solventes orgânicos e ao ataque microbiano. Recentemente, diversos outros materiais vêm sendo aplicados, como biopolímeros como quitosana e celulose, resinas de troca iônica/hidrofílicas, argilas modificadas, silicatos mesoporosos e materiais híbridos nano estruturados, filmes

poliméricos, polímeros hidrofóbicos, nano partículas magnéticas, entre outros (KAMEL et al. 2011; SALIS et al. 2009; VILLENUEVE et al. 2000).

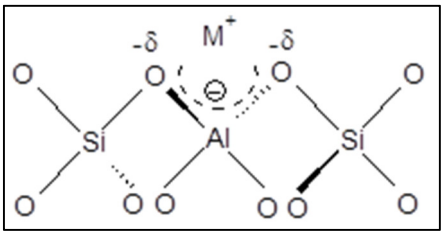
Nesta tese serão avaliados alguns suportes inorgânicos, que serão descritos a seguir:

1.4.2.1 Zeólitas

As zeólitas são aluminossilicatos microporosos cuja estrutura cristalina é formada por uma rede tridimensional de tetraedros AlO_4 e SiO_4 ligados entre si pelos átomos de oxigênio, cada um deles comum a dois tetraedros vizinhos. Assim, a estrutura das zeólitas tem como unidade básica de construção os tetraedros – TO_4 – nos quais o átomo central T é sílicio ou alumínio e os vértices são ocupados pelos átomos de oxigênio, como ilustrado na Figura 20.

Sendo o alumínio trivalente, os tetraedros AlO_4 têm carga negativa, resultando assim em uma carga residual negativa na rede cristalina. Esta carga é neutralizada pelos íons de compensação, que podem ser prótons, NH_4^+, cátions de metais alcalinos ou alcalinos terrosos, cátions de terras-raras e complexos catiônicos, cujos volumes sejam compatíveis com o espaço no interior da estrutura zeolítica.

Figura 20– Estrutura dos tetraedros AlO_4^- e SiO_4^- nas zeólitas.



Fonte: NAGY et al., 1998.

A cela unitária de uma zeólita é a menor unidade da estrutura que contém todas as suas propriedades, ou seja, é a unidade básica que se repete ao longo do cristal, e pode ser representada por:

$$M_{x/n}\ Al_x\ Si_y\ O_{2\,(x+y)}.wH_2O \qquad (1)$$

Onde:

M = cátion de valência n

w = número de moléculas de água por cela unitária

x + y = número total de tetraedros por cela unitária

y/x = razão atômica Si/Al

Os cátions de compensação presentes nas zeólitas apresentam considerável liberdade de movimento, permitindo a troca iônica, enquanto a água de hidratação pode ser removida reversivelmente, por aquecimento, sem alterar a estrutura cristalina (GIANNETTO, MONTES e RODRÍGUEZ-FUENTES, 2000).

As zeólitas apresentam canais e/ou cavidades interconectados com dimensões moleculares, nos quais se encontram os íons de compensação e as moléculas de água ou outros adsorvatos. Esse tipo de estrutura microporosa confere às zeólitas uma superfície interna muito grande, quando comparada à sua superfície externa (GIANNETTO, MONTES e RODRÍGUEZ-FUENTES, 2000).

Tendo em vista que a dimensão das aberturas dos poros e/ou cavidades zeolíticas é similar à de grande parte das moléculas orgânicas comumente processadas, as zeólitas comportam-se como peneiras moleculares.

O termo peneira molecular refere-se à propriedade particular que esses materiais exibem de reter moléculas seletivamente, por um processo de exclusão baseado no tamanho destas moléculas. Esta capacidade deve-se à sua estrutura porosa altamente regular, com poros de dimensões uniformes. O tamanho máximo da espécie molecular ou iônica que pode entrar nos poros de uma zeólita é limitado pelos diâmetros dos canais.

De acordo com o diâmetro dos poros (d), as zeólitas são classificadas conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 10- Classificação das zeólitas de acordo com o diâmetro de poros

Poro da Peneira	**Número de átomos de oxigênio na abertura do poro**	**Dimensão do poro (Å) (10^{-10} m)**
Extragrande	>12	d > 9
Grande	12	6 < d < 9
Médio	10	4,5 < d < 6
Pequeno	8	3 < d < 4,5

Fonte: NAGY et al., 1998.

Outra classificação se baseia no arranjo dos canais e cavidades da zeólita desidratada, influenciando diretamente o modo de circulação das moléculas dentro da estrutura porosa. Têm-se, assim, três tipos de estruturas zeolíticas (GIANNETTO, 1990):

- Unidimensional – Formada por canais que não se interceptam;
- Bidimensional – Formada por dois sistemas de canais que se interceptam, os quais podem ter ou não as mesmas dimensões;
- Tridimensional – Formada por canais que se interceptam em três direções; neste caso, todos podem ter as mesmas dimensões, ou pelo menos um deles tem dimensão diferente dos demais.

1.4.2.1.1 Zeólita ZSM-5

A zeólita ZSM-5 (Zeolite Socony Mobil) pertence ao grupo pentasil, possui estrutura do tipo MFI e se caracteriza pelo alto teor de silício na estrutura (relação Si/Al entre 11 e infinito). A MFI é uma estrutura cristalina com célula unitária ortorrômbica constituída por 96 tetraedros TO_4 (GIANNETTO, 1990). Essas zeólitas na forma sódica apresentam, quando hidratadas, a seguinte fórmula de célula unitária (Equação 2).

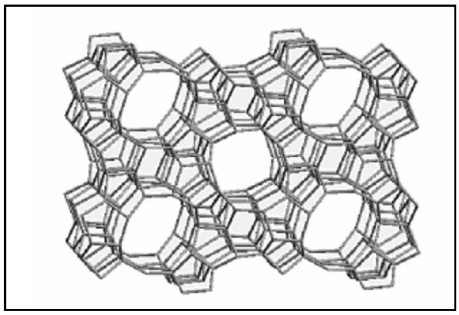
$$Na_nAl_nSi_{96-n}O_{192}.16H_2O \quad (2)$$

A estrutura da zeólita ZSM-5 forma-se a partir de unidades compostas por oito anéis de cinco tetraedros. A combinação destas unidades forma as lâminas características da zeólita ZSM-5. A combinação destas lâminas dá origem a estrutura tridimensional da zeólita. Dependendo da razão Si/Al, os parâmetros da cela unitária poderão apresentar os seguintes valores:

a = 20,10 – 20,07Å b = 19,90 – 19,86Å c = 13,40 – 13,36Å

A estrutura porosa da zeólita ZSM-5 apresenta dois sistemas de canais interconectados: sendo um formado por canais sinusoidais com abertura de aproximadamente 5,3 x 5,6 Å paralelo à direção [100], e o outro perpendicular a este, que são canais retos com abertura 5,1 x 5,5 Å paralelo à direção [010]. Esse sistema de canais é apresentado na Figura 21.

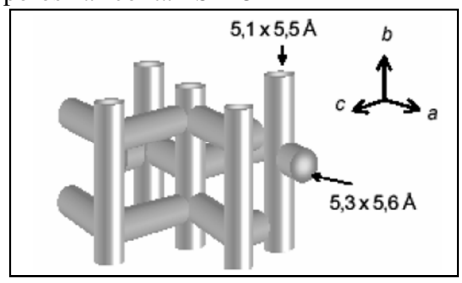
Figura 21 - Vista da abertura dos canais retilíneos da ZSM-5.



Fonte: KOKOTAILO et al., 1978.

O tamanho de poros, sua alta resistência térmica e a forte acidez, quando os cátions de compensação são prótons, são as principais características desse tipo de zeólita. Como a superfície gerada pelos canais internos é muito maior que a superfície externa, os sítios ativos em sua maioria estão localizados nos microporos. A razão entre a superfície interna e a externa afeta a atividade e a seletividade da zeólita, quando a mesma é usada como catalisador (GERVASINI, 1999). A estrutura tridimensional da zeólita ZSM-5 é apresentada na Figura 22.

Figura 22 - Estrutura tridimensional de poros na zeólita ZSM-5



Fonte: KOKOTAILO, LAWTON e OLSON, 1978.

1.4.2.2 Sílicas mesoporosas

As zeólitas são muito utilizadas em reações catalíticas, contudo a presença exclusiva de microporos com diâmetros na faixa de 0,4 – 1,2 nm impõem limitações significativas para a ocorrência de reações que envolvam reagentes ou produtos volumosos, uma vez que esses, não podem se difundir em seus microporos. Devido a essa limitação, o desenvolvimento de materiais com diâmetros de poros na faixa dos mesoporos tem sido amplamente estudado (GRECCO et al., 2013).

Desde a descoberta da família de peneiras moleculares mesoporosas denominada M41S em 1992, por pesquisadores da *Mobil Corporation*, diversos materiais mesoporosos foram preparados. M41S é um termo genérico para vários tipos de materiais mesoporosos classificados como MCM (*Mobil Composition of Matter*) (BECK et al., 1992; KRESG et al., 1992).

Esses materiais consistem em uma família de sílicas e aluminossilicatos, com alta área específica, arranjo de poros regulares, distribuição de diâmetro de poros bem definida, na faixa dos mesoporos, e que apresentam paredes amorfas. Não é possível definir uma célula unitária e nem as posições cristalográficas de suas estruturas. Sua única organização é a geometria tetraédrica dos átomos T, que a partir da unidade TO_4 não exibe um arranjo definido de átomos (BECK et al., 1992; KRESG et al., 1992; MASCARENHAS OLIVEIRA e PASTORE, 2001).

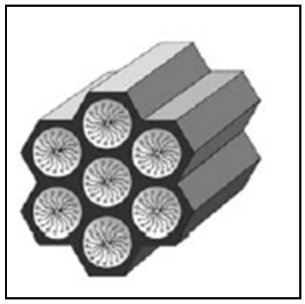
Os materiais M41S apresentam diâmetros de poros na faixa de 2 – 10 nm e os representantes mais conhecidos desta classe de materiais incluem as sílicas MCM–41 (2D hexagonal), MCM–48 (cúbica) e MCM–50 (laminar) (HOFFMANN et al., 2006).

1.4.2.2.1 MCM-41

A MCM-41 possui um arranjo mesoporoso hexagonal com sistema de poros unidimensional. Devido a seu arranjo hexagonal de mesoporos, enquadra-se no grupo espacial P6mm. Apesar da estrutura mesoporosa deste material ser altamente periódica não há organização no curto alcance (suas paredes são amorfas), ou seja, é a ordem dos mesoporos que resulta na organização no longo alcance, sendo esta característica a principal diferença comparada com as zeólitas, que possuem organização no curto e longo alcance (paredes cristalinas).

Pode-se verificar que a MCM-41 possui uma estrutura de mesoporos com arranjo hexagonal semelhante a um favo de mel com diâmetro de poros de aproximadamente 40 Å, enquanto que a zeólita ZSM-5 possui abertura de poro de aproximadamente 5 Å (ROTH e VARTULI, 2005). Na Figura 23 é apresentada a estrutura da MCM-41.

Figura 23 - Estrutura do material mesoporoso MCM-41



Fonte: HOFFMANN et al., 2006.

Este material possui área específica superior a 1000 $m^2 g^{-1}$ e diâmetro de mesoporos na faixa de 1,5 – 10 nm, que podem ser controlados através da escolha cuidadosa do direcionador de estrutura, da adição de compostos orgânicos auxiliares ou modificando-se os parâmetros de síntese. Entretanto, as paredes dos mesoporos são finas, com espessura que varia de 1 – 1,5 nm, impondo limitações na estabilidade térmica e hidrotérmica do material (GRECCO et al., 2013).

1.4.2.3 Sílica-aluminas

As sílica-aluminas da família Siral (SASOL, Alemanha) são produzidas a partir da inserção de diferentes teores de SiO_2 em uma matriz de alumina do tipo boemita, que possuem como fase alumina a boemita. As sílica-aluminas exibem uma elevada acidez em sua superfície o que as torna excelentes materiais para ser empregados como suporte (SASOL, 2018). A concentração e o tipo de sítios ácidos (sítios ácidos de Lewis x sítios ácidos de Bronsted) depende da relação Al_2O_3/SiO_2. A Tabela 11 ilustra os Sirais produzidos pela SASOL que foram empregados no presente trabalho, bem como suas características.

Tabela 11 – Características químicas típicas e propriedades físicas dos Sirais

Características químicas típicas e propriedades físicas		**Siral 10**	**Siral 20**	**Siral 40**
$Al_2O_3 + SiO_2$	[%]	75	75	75
Al_2O_3: SiO_2	[%]	90:10	80:20	60:40
Fe_2O_3	[%]	0,01	0,01	0,01
Na_2O	[%]	0,005	0,005	0,01
Densidade aparente	$[g.L^{-1}]$	400-600	300-500	250-450
Tamanho de partícula (d_{50})	µm	50	50	50
Área específica (BET)*	$[m^2.g^{-1}]$	400	420	500
Volume de poros	$[mL.g^{-1}]$	0,75	0,75	0,90

*Após a ativação a 550 °C durante 3 horas.
Fonte: SASOL, 2018.

A principal diferença entre as sílica-aluminas estudadas é a relação Al_2O_3/SiO_2, quanto menor essa relação, mais hidrofóbico é esse material. Desse modo, o material mais hidrofóbico é a Siral 40. Outra particularidade é área específica, dentre as silica-aluminas avaliadas a Siral 40 posssui a maior área (500 $m^2.g^{-1}$), seguida pela Siral 20 (420 $m^2.g^{-1}$) e Siral 10 (400 $m^2.g^{-1}$), respectivamente.

1.4.2.4 Emprego de zeólitas, sílicas mesoporosas e sirais como suporte para imobilização de lipases

Vários trabalhos na literatura reportam a imobilização de lipases em zeólitas e peneiras moleculares. A seguir estão destacados alguns destes trabalhos, bem como as condições em que foram realizados, o tipo de lipase empregada, tempo, temperatura, e pH de imobilização.

O processo de imobilização foi avaliado através da: eficiência de imobilização. Para os suportes escolhidos foram avaliados a quantidade de proteína adsorvida ao suporte, o rendimento de imobilização e atividade retida.

Knezevic e colaboradores (1998) estudaram a imobilização da lipase de *Candida cylindracea* na zeólita tipo Y. Esta zeólita foi sintetizada a partir da zeólita NaY. O processo de imobilização foi conduzido em pH 7 durante 1 h a 0ºC utilizando relação lipase:suporte em massa de 1:4. A quantidade máxima de proteína adsorvida foi de 8,2 $mg.g^{-1}$ e a eficiência máxima de imobilização foi de 33%.

A imobilização da Palatase 20000L (lipase de *Rhizomucor miehei*) na MCM-41 foi estudada por Macario et al. (2002) empregando 1 g lipase em 50 mL de tampão fosfato (pH 7)

com 0,4 g de suporte a 0°C durante 24 h. A quantidade máxima de lipase imobilizada foi igual a 472 mg. A eficiência de imobilização foi de 47,2%.

Os suportes MCM-36 e MCM-22 foram avaliados por Dumitriu et al. (2003) no processo de imobilização da lipase B de *Candida antarctica*. O processo de imobilização foi conduzido empregando 2 mg de lipase previamente purificada, esta foi dissolvida em 2 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7), à qual foi adicionado 200 mg de suporte (MCM-36 ou MCM-22). A mistura foi suavemente agitada durante 3 h à temperatura ambiente. A MCM-22 reteve uma maior quantidade de enzima (20 $mg.g^{-1}$) na sua superfície, já a MCM-36 reteve apenas 4 $mg.g^{-1}$. As diferentes quantidades de proteína adsorvidas podem ser explicadas com base nas propriedades hidrofóbicas/hidrofílicas das zeólitas empregadas. Como a MCM-22 possui um maior caráter hidrófobico que hidrofílico isto possibilitou que mais de 75% da sua superfície fosse coberta pela lipase.

Blanco e colaboradores (2004), também empregaram o método de adsorção física para a imobilização da lipase B de *Candida antarctica*. O suporte empregado foi a sílica MS-3030 (com área superficial de 300-320 $m^2.g^{-1}$; diâmetro médio de poro de 30-40 nm). A imobilização foi realizada a temperatura ambiente empregando diferentes volumes de CALB, variando de 0,04 a 2,4 mL (com o objetivo de preparar derivados com cargas crescentes de enzima: 10, 50, 100, 200, 400 e 600 mg de proteína), a lipase foi dissolvida em tampão fosfato 25 mM, pH 7, até um volume de 4 mL. Em seguida 100 mg de suporte foi adicionado. O teor de 200 mg proteína.g^{-1} possibilitou a obtenção de uma atividade recuperada de 48,6%.

A imobilização da Palatase 20000L (lipase de *Rhizomucor miehei*) foi avaliada por Macario et al. (2005) nos suportes: MCM-41, Al-MCM-41, Silicalita-1, FAU (zeólita X), ITQ-2 e ITQ-6 (zeólitas delaminadas). O processo de imobilização foi realizado durante 24 h a 0°C utilizando a 1 g lipase em 50 mL de tampão fosfato (pH 7) com 0,4 g de suporte. A porcentagem de lipase imobilizada para MCM-41 (41%), Al-MCM-41 (7%), Silicalita-1 (60%), FAU (0%), ITQ-2 (27%) e ITQ-6 (17%).

Macario e colaboradores (2007) investigaram a imobilização da Palatase 20000L (lipase de *Rhizomucor miehei*), nos suportes: Silicalita-1 (S1) (preparado a partir do método alcalino), F-S2 (preparado a partir do silicalito 1 empregando o método que utiliza fluoreto) e ITQ-2 (zeólita delaminada). A imobilização foi conduzida utilizando razão mássica: enzima/suporte igual a 2,5, pH 7, durante 24 h a 0ºC. A quantidade de enzima adsorvida/suporte para os suportes S1, F-S2 e ITQ-2 foi de 151, 290 e 133 $mg.g^{-1}$, respectivamente, o que equivale a quantidade adsorvida de enzima de 39, 69, 27%.

O emprego de hidrotalcita e de quatro diferentes tipos de zeólitas comerciais (13-X, 5A, FM-8 e AW-300) na imobilização da lipase Lipozyme TL-IM foi estudado por Yagiz, Kazan e Akin (2007). A imobilização foi conduzida empregando 2 mL de uma solução de lipase com concentração de 2,5 $mg.mL^{-1}$ de enzima e 0,2 g de suporte a 4°C. Quando as zeólitas foram empregadas como suporte a imobilização foi realizada em pH 7 durante 18 h. Já para a hidrotalcita a imobilização foi realizada em pH 8,5 durante 5 h. A quantidadede proteína adsorvida na hidrotalcita foi de 13 $mg.g^{-1}$, já na zeólita esta foi de 9 $mg.g^{-1}$. A eficiência máxima de imobilização foi de 95,8% e 56,1% para a hidrotalcita e para a zeólita, respectivamente.

Macario e colaboradores (2008a) investigaram o emprego dos suportes Na-Silicalita-1 (sintetizado pelo método alcalino), F-S1 (silicalita sintetizado pelo método do fluoreto), ITQ-6 (Zeólita delaminada), N-ITQ-6 (ITQ-6 funcionalizada com grupos $–NH_2$) e Si-MCM-41 (MCM-41 com alta densidade de grupos silanol) para a imobilização da lipase Palatase 20000L (lipase de *Rhizomucor miehei*). A imobilização foi conduzida empregando razão mássica enzima:suporte igual a 2,5, pH 7, durante 24 h a temperatura ambiente. A porcentagem de proteína imobilizada para Na-Silicalita-1(66%), F-S1 (69%), ITQ-6 (17%), Si-MCM-41 (41%) e N-ITQ-6 (0%).

A imobilização da lipase Palatase 20000L (lipase de *Rhizomucor miehei*) foi estudada por Macario et al. (2008b) empregando como suporte Silicalita-1. No processo de imobilização conduzido durante 24 h a temperatura ambiente foi utilizado 1 g lipase em 50 mL de tampão fosfato (pH 7) com 0,4 g de suporte. A quantidade de proteína adsorvida foi de 68%.

Macario e colaboradores (2009) empregaram como suporte Si-MCM-41 para imobilizar a enzima Palatase 20000L (lipase de *Rhizomucor miehei*). O processo de imobilização foi realizado a temperatura ambiente durante 24 h, empregando 1 g lipase em 50 mL de tampão fosfato (pH 7) com 0,4 g de suporte em forma de pó. A quantidade de proteína adsorvida foi superior a 95%.

O emprego da zeólita MCM 22 com diferentes razões Si/Al (15, 25 e 50) como suporte para imobilização da lipase suína pancreática foi avaliado por Calgaroto et al. (2011). O processo de imobilização foi realizado a 0°C durante 2 h, empregando uma preparação liofilizada, que foi solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 (2 g de enzima e 60 mL de tampão). A razão mássica enzima suporte foi de 2:1. A quantidade de proteína adsorvida na MCM 22-25 foi cerca de quatro vezes maior do que para os outros suportes. O processo de imobilização pode ser diretamente influenciado pela composição química do

suporte, neste caso a relação Si/Al e indiretamente pela acidez da superfície. Um aumento na quantidade de enzima imobilizada foi observado para menor razão de Si/Al. Desta forma, pode-se concluir que, tendo em vista a eficiência da imobilização, materiais com acidez intermediária MCM 22, com razão Si/Al = 25, podem ser considerados mais adequados. O maior rendimento de imobilização foi obtido quando a MCM-22 com razão Si/Al igual a 25 foi empregada, sendo este cerca de 25%.

Mitchell e Pérez-Ramirez (2011) testaram o emprego de zeólitas e peneiras moleculares como suportes para imobilização da lipase de *Aspergillus niger* (AS) e da lipase de *Pseudomonas fluorescens* (AK), ambas da Amano. Os suportes utilizados foram: ZSM-5 (com razão Si/Al igual a 26), MCM-41 (com razão Si/Al igual a 39,5), P (com razão Si/Al igual a 26), H (com razão Si/Al igual a 23) e HW (com razão Si/Al igual a 26). O processo de imobilização das lipases foi conduzido a temperatura ambiente durante 2 h, utilizando 100 mg do suporte em tampão fosfato de sódio (pH 7), a solução enzimática continha (5 cm^3, 20 $mg.cm^{-3}$, da enzima na forma de pó). A quantidade de proteína adsorvida quando a lipase de *Aspergillus niger* e os suportes P, H, HW e MCM-41 foram empregados foi de 121, 155, 186 e 80 $mg.g^{-1}$, respectivamente. Para a lipase de *Pseudomonas fluorescens* a quantidade de proteína adsorvida quando os suportes MCM-41, HW, H e P foram empregados foi de 191, 178, 120, 85 $mg.g^{-1}$, respectivamente.

A imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei* (Palatase 20000L) na gismodina (P) substituída com $Cu^{2+,}$ Zn^{2+} e Ni^{2+} foi estudada por Vasconcellos et al. (2012). A zeólita P com elevado teor de alumínio foi preparada em uma síntese típica empregando aluminato de sódio e uma suspensão de silicato (feita a partir de uma solução de silicato de sódio), esta amostra foi denominada de Na-P, sendo convertida as suas formas contendo Cu, Zn e Ni por troca iônica com a solução de sal apropriado. As amostras foram nomeadas Cu-P, Zn-P e Ni-P. Estas amostras foram então submetidas a um tratamento térmico empregando as temperaturas de 200 e 550°C. As amostras tratadas a 200ºC foram denominadas Na-P/200, Cu-P/200, Zn-P/200 e Ni-P/200. As amostras tratadas a 550°C foram nomeadas Na-P/550, Cu-P/550, Zn-P/550 e Ni-P/550. Após todo esse processo, a imobilização foi conduzida a temperatura ambiente durante 16 h, utilizando 2 $mg.mL^{-1}$ de enzima e 0,2 g de zeólita que foram misturados em 5 mL de tampão fosfato (pH 7). Pode-se notar que a porcentagem de enzimas imobilizadas nos suportes Na-P/200 e Na-P/550 foram praticamente as mesmas (12% e 11,8%, respectivamente). Para o sistema de Cu-P, a maior quantidade de enzima imobilizada foi observada para o suporte Cu-P/550 (20%) em comparação com o 16% do suporte Cu-P/200. O suporte Zn-P/550 imobilizou cerca de 19% da enzima em comparação com o suporte

Zn-P/200 que imobilizou 12,5%. O suporte Ni-P tratado a 200 e 550ºC praticamente imobilizou a mesma quantidade de enzima (11,2% e 10,1%, respectivamente).

Lin e colaboradores (2014) realizaram a imobilização da lipase de *Yarrowia lipolytica* na MCM-41 funcionalizada com ferro. Foram empregadas Fe-MCM-41 com diferentes diâmetros de poro. As amostras foram nomeadas a partir do diâmetro de poro: FM-1 (3,5 nm), FM-2 (3,78 nm), FM-3 (4,04 nm), FM-4 (4,27 nm), FM-5 (4,47 nm) e FM-6 (4,81 nm). A imobilização foi realizada durante 20 h a 25°C, pH 6,5, empregando 4 g de suportee 70 mL de lipase. O emprego de FM-4 como suporte possibilitou que a maior quantidade de proteína adsorvida (23,48 $mg.g^{-1}$) fosse obtida, já a utilização da FM-1 como suporte levou à menor quantidade de proteína adsorvida (15,08 $mg.g^{-1}$).

A imobilização das lipases de *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L) e *Rhizomucor miehei* (Palatase 20000L) em zeólitas contendo íons obtidos a partir da troca iônica empregando metais de transição foi avaliada por Vasconcellos et al. (2015). A zeólita NaX com elevado teor de alumínio, foi sintetizada em escala manométrica, esta amostra foi denominada de nanozeólita Nano-X/Na. Em seguida essa nanozeólita Nano-X/Na foi submetida a experimentos de troca iônica para substituir os cátions sódio com cátions de metal de transição. Quando foram empregadas soluções 0,1 M de $MnSO_4$, $CuSO_4$, $CoSO_4$, $ZnSO_4$ e $NiSO_4$ os derivados de troca iônica foram denominados de Nano-X/Mn/0,1 M, Nano-X/Cu/0,1 M, Nano-X/Co/0,1 M, Nano-X/Zn/0,1 M e Nano-X/Ni/0,1 M, respectivamente. Também foram empregadas soluções 0,5 M de $MnSO_4$, $CuSO_4$, $CoSO_4$, $ZnSO_4$ e $NiSO_4$ e estes derivados obtidos a partir da troca iônica foram designados Nano-X/Mn/0,5 M, Nano-X/Cu/0,5 M, Nano-X/Co/0,5 M, Nano-X/Zn/0,5 M e Nano-X/Ni/0,5 M. As lipases de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei*foram imobilizadas nos suportes derivados da troca iônica com Mn^{2+} (Nano-X/Mn/0,1 M, Nano-X/Mn/0,5 M), Cu^{2+} (Nano-X/Cu/0,1 M, Nano-X/Cu/0,5 M), Co^{2+} (Nano-X/Co/0,1 M, Nano-X/Co/0,5 M), Zn^{2+} (Nano-X/Zn/0,1 M, Nano-X/Zn/0,5 M) e Ni^{2+} (Nano-X/Ni/0,1 M, Nano-X/Ni/0,5 M). A concentração inicial das enzimas que foi empregada na imobilização foi de 2 $mg.mL^{-1}$ para cada 200 mg de nanozeólita. As enzimas e as nanozeólitas foram misturadas em 5 mL de tampão fosfato (pH 7), a imobilização foi conduzida durante 16 h à temperatura ambiente. Os derivados obtidos a partir da imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei* nas nanozeólitas foram designados como Nano-X/Mn/0,1M-RML, Nano-X/Mn/0,5M-RML, Nano-X/Cu/0,1M-RML, Nano-X/Cu/0,5M-RML, Nano-X/Co/0,1M-RML, Nano-X/Co/0,5M-RML, Nano-X/Zn/0,1M-RML, Nano-X/Zn/0,5 M-RML, Nano-X/Ni/0,1 M-RML e Nano-X/Ni/0,5M-RML. Já os derivados obtidos a partir da imobilização da lipase de *Thermomyces*

lanuginosus foram denominados de Nano-X/Mn/0,1M-TLL, Nano-X/Mn/0,5M-TLL, Nano-X/Cu/0,1M-TLL, Nano-X/Cu/0,5M-TLL, Nano-X/Co/0,1 M-TLL, Nano-X/Co/0,5 M-TLL, Nano-X/Zn/0,1M-TLL, Nano-X/Zn/0,5 M-TLL, Nano-X/Ni/0,1M-TLL e Nano-X/Ni/0,5M-TLL. O emprego dos suportes Nano-X/Co/0,5 M, permitiram obter rendimento de imobilização 98,5% para a lipase de *Thermomyces lanuginosus* e 98,3% para a lipase de *Rhizomucor miehei*.

Vários métodos de imobilização e vários suportes são descritos na literatura, mas não existe uma metodologia que seja mais indicada. A obtenção de um biocatalisador eficiente dependerá de vários fatores, dentre eles o meio reacional no qual o biocatalisador será empregado, o método de imobilização, o tipo de suporte, e evidentemente da enzima que será imobilizada. Além disso, o custo final do biocatalisador também deve ser considerado.

Na Tabela 12 são apresentados os preços de comercialização das lipases comerciais líquidas empregadas na presente tese e suas respectivas preparações imobilizadas.

Tabela 12 – Preços das lipases comerciais líquidas e imobilizadas

Lipase	**Preço ($R\$.mL^{-1}$) ou ($R\$.g^{-1}$)**
CALB	9,96
Palatase 20000L	18,56
Lipolase 100L	13,26
Novozym 435 (*lipase B de Candida antarctica*) imobilizada em resina acrílica	209,67
Lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em Immobead 150	78,50
Lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em Immobead 150	78,50

Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2018.

É possível observar que as lipases comerciais líquidas são mais baratas que as lipases comerciais imobilizadas, uma vez que a síntese e a escolha de um suporte de imobilização envolvem várias etapas, o que é aumenta o custo do produto final.

Na Tabela 13 são apresentados os preços de alguns suportes empregados na imobilização do extrato enzimático líquido de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 e das lipases comerciais líquidas (CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L).

Tabela 13 – Preços de alguns suportes empregados na imobilização das lipases.

Suporte	**Preço ($R\$.g^{-1}$)**
MCM-41	28,04
HZSM-5 (P-25 – razão molar SiO_2/Al_2O_3 igual a 25)	1,38

Fonte: ACS MATERIAL, 2018.

A sílica mesoporosa MCM-41 é mais cara que a zeólita HZSM-5 (SAR 25), uma vez que o processo de síntese desta sílica mesoporosa envolve métodos mais complexos e reagentes mais caros.

Este trabalho pretende contribuir para avaliação de diferentes tipos de suporte (MCM-41, HZSM-5 (com SAR 25 e 280) e Siral (10, 20 e 40)) na imobilização do extrato enzimático de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 e das lipases comerciais líquidas CALB (lipase B de *Candida antarctica*), Palatase 20000L (lipase de *Rhizomucor miehei*) e Lipolase 100L (lipase de *Thermomyces lanuginosus*).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Reagentes

Os reagentes empregados na condução dos experimentos foram: ácido oleico P.A., álcool etílico absoluto 99,8% P.A., álcool etílico 95% (etanol) P.A, *n*-hexano P.A, hidróxido de sódio P.A., acetona P.A., acetonitrila UV/HPLC, dimetilsulfóxido P.A., fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A., fosfato de sódio dibásico anidro P.A., ácido fosfórico (orto) P.A., todos obtidos da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). O padrão cromatográfico heptadecanoato de metila (95%), Coomassie Blue G 250, albumina bovina sérica (BSA), *p*-nitrofenil laurato e *p*-nitrofenol foram todos obtidos da Sigma Aldrich. O óleo de soja refinado utilizado foi o óleo SOYA da Sadia (Brasil) adquirido no comércio local.

2.1.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho são apresentados a seguir:

- Agitador vortex MS1 Minishaker IKA;
- Analisador ASAP (*Accelerated Surface Area and Porosity*) modelo 2020 da Micromeritics;
- Balança analítica digital Mettler modelo AB204-S/FACT;
- Banho termostático HAAKE modelo DC30-K2O com controle digital;
- Bomba de vácuo tipo diafragma Fisatom modelo 825;
- Centrífuga eppendorf miniSpin;
- Cromatógrafo a gás VARIAN modelo CP 3800 com amostrador automático;
- Destilador de água Fanem modelo 724;

- Equipamento Rigaku modelo Miniflex;
- Espectrofotômetro JASCO V730Bio acoplado a banho termostático;
- Espectrofotômetro HACH DR/4000 U;
- Espectrômetro Rigaku, modelo Supermini;
- Incubadora com agitação Tecnal modelo TE-420;
- Placa agitadora de rolos MOVIL-ROD (P SELECTA);
- Placa de agitação e aquecimento IKA C-MAG HS 4;
- Sistema de ultrapurificação de água Sinergy UV (Millipore) e
- Titulador automático Mettler T50, com amostrador automático;

2.1.3 Enzimas

As lipases comerciais líquidas utilizadas foram a CALB (lipase B de *Candida antarctica*), Palatase 20000L (lipase de *Rhizomucor miehei*) e Lipolase 100L (lipase de *Thermomyces lanuginosus*) da Novozymes Latin America Ltda (Araucária, Brasil).

A lipase B de *Candida antarctica* (CALB) é produzida por fermentação submersa do micro-organismo geneticamente modificado *Aspergillus niger* que possui um gene que codifica uma lipase de *Candida antarctica* e apresenta especificidade para as posições 1 e 3, porém age também como uma lipase não específica.

A lipase de *Rhizomucor miehei* (Palatase 20000L) é produzida por fermentação submersa do micro-organismo geneticamente modificado *Aspergillus oryzae* que possui um gene que codifica uma lipase de *Rhizomucor miehei* e apresenta especificidade para as posições 1 e 3.

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* é produzida por fermentação submersado micro-organismo geneticamente modificado *Aspergillus oryzae* que possui um gene que codifica uma lipase de *Thermomyces lanuginosus e* apresenta especificidade para as posições 1 e 3.

A preparação enzimática de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 foi fornecida pelo Laboratório BIOSE. O preparado enzimático líquido (PEL) foi obtido após 24 h de fermentação submersa de *Y. lipolytica* em meio contendo extrato de lêvedo (1% $m.v^{-1}$), peptona (0,64% $m.v^{-1}$), glicose (2% $m.v^{-1}$), chamado de "*Yeast extract, Peptone, Dextrose*"

(YPD), com concentração inicial de células de 1,0 $g.L^{-1}$, temperatura de cultivo de 28°C e vazão de oxigênio de 1,5 $L.min^{-1}$ (1,5 vvm).

2.1.4 Suportes

Foram empregados como suportes para imobilização a sílica mesoporosa MCM-41, adquirida junto a Tianjin Co (China), as zeólitas ZSM-5 com razão SiO_2:Al_2O_3 nominal igual a 25 (fornecida pelo CENPES/Petrobras) e 280 (adquiridas junto a Zeolyst International) e as sílica-aluminas Siral 10, 20 e 40 (com razão Al_2O_3: SiO_2 de 90:10, 80:20 e 60:40, respectivamente), doadas pela SASOL (Alemanha).

2.2 Métodos

2.2.1 Caracterização dos suportes

2.2.1.1 Espectrometria de fluorescência de raios X (FRX)

A composição química global das zeólitas foi determinada através de análises por espectrometria de fluorescência de raios X, utilizando-se o espectrômetro Rigaku, modelo Supermini, controlado por computador equipado com software Rix 3100 e dotado de tubo gerador de raios X de Rh. A contagem dos pulsos foi feita por meio de um detector proporcional de fluxo.

2.2.1.2 Difratometria de raios X (DRX)

A técnica de difratometria de raios X foi utilizada visando à avaliação da cristalinidade e a identificação das fases presentes nos suportes estudados. Os difratogramas de raios X das amostras obtidos pelo método do pó foram coletados pelo equipamento Rigaku modelo Miniflex II, utilizando-se radiação de Cu Kα com voltagem 15 kV e corrente de 15 mA. A varredura foi feita entre 4 a 60° (2θ) com intervalos de 0,02° e tempo de aquisição de 2 s por passo.

2.2.1.3 Análise textural

A caracterização textural dos suportes empregados no processo de imobilização das lipases foi realizada por adsorção/dessorção de N_2 a -196°C. O equipamento utilizado foi o analisador ASAP (Accelerated Surface Area and Porosity) modelo 2020 da Micromeritics. Este equipamento fornece a área específica B.E.T., a área e o volume de microporos pelo método t (equação de Harkins & Jura), além da área, do volume e da distribuição de mesoporos pelo método B.J.H. A amostra, previamente seca em estufa a 120°C, foi submetida a um pré-tratamento no próprio equipamento que consiste no aquecimento sob vácuo, a 300°C, por 12 h.

2.2.1.4 Espectroscopia noinfravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os suportes que apresentaram os melhores resultados no processo de imobilização, os derivados obtidos a partir da imobilização das lipases, bem como, os derivados obtidos após utilização na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, foram analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), em modo de refletância total atenuada (ATR), no espectrômetro Perkin Elmer, modelo Frontier. Foi utilizada uma célula de diamante expandido e os espectros foram adquiridos na faixa entre 600 e 4000 cm^{-1}.

2.2.2 Determinação da atividade enzimática de esterificação

As atividades de esterificação das lipases comerciais líquidas (CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L), das preparações enzimáticas de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, bem como dos derivados obtidos a partir da imobilização das preparações líquidas foram determinadas pelo consumo de ácido oleico na reação de esterificação com o etanol empregando a razão molar ácido oleico:etanol estequiométrica (1:1), a 30ºC. Uma unidade de atividade de esterificação (U) foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μmol de ácido oleico por minuto por grama ou mililitro de preparação enzimática nas condições experimentais descritas anteriormente (CORRÊA et al., 2011).

No procedimento de determinação da atividade enzimática, 15 mmols de ácido oleico e 15 mmols de etanol foram adicionados em um reator batelada fechado de capacidade de 15 mL, provido de agitação magnética e condensador. A temperatura do meio reacional foi mantida constante através da circulação de etilenoglicol, proveniente do banho termostático (HAAKE), pela camisa do reator. A reação de esterificação foi iniciada após a adição da lipase ao meio reacional. Alíquotas de 50 μL, em duplicata, foram retiradas do meio reacional nos tempos 0, 2, 4, 6, 10, 15, 20, e 30 min de reação para as preparações comerciais líquidas, já para os derivados obtidos a partir da imobilização destas preparações as alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 30 min de reação. O consumo de ácido oleico nas alíquotas foi determinado por titulometria de neutralização. As alíquotas foram diluídas em 35 mL de etanol 95% e tituladas com solução de NaOH 0,02 mol.L^{-1}, utilizando-se o titulador automático Mettler modelo T50.

A equação 3 descreve o cálculo da atividade enzimática de esterificação para as preparações enzimáticas sólidas.

$$A = \frac{(V_1 - V_2) \times M}{t \times m} \times \frac{V_m}{V_a} \times 1000 \qquad (3)$$

Onde:

A = atividade de esterificação (U.g^{-1});

V_1 = volume de NaOH consumido na titulação da amostra retirada no tempo zero de reação (mL);

V_2 = volume de NaOH consumido na titulação da amostra retirada no tempo t minutos de reação (mL);

M = concentração da solução de NaOH em mol.L^{-1};

t = tempo de reação (min);

m = massa de enzima empregada na reação (g);

V_a = volume de amostra (mL);

V_m = volume do meio reacional (mL).

Para o cálculo da atividade enzimática de esterificação para as preparações enzimáticas líquidas utilizam-se as equações 4 e 5.

$$V_t = V_m + V_e \tag{4}$$

$$n_1^{recalculado} = \frac{(M \times 1000 \times V_m)}{V_t} \times V_a \tag{5}$$

Onde:

V_t = volume total (mL);

V_m = volume do meio reacional (mL).

V_e = volume de enzima (mL);

$n_1^{recalculado}$ = número de micromols de ácido oleico da amostra retirada no tempo zero de reação recalculado (µmol);

n_2 = número de micro mols de ácido oleico da amostra retirada no tempo t minutos de reação (µmol);

M = concentração da solução de NaOH em mol.L^{-1};

V_a = volume de amostra (mL).

Deste modo a atividade enzimática de esterificação para as preparações enzimáticas líquidas pode ser descrita pela equação 6.

$$A = \frac{(n_1^{recalculado} - n_2) \times V_t}{t \times V_e \times V_a} \tag{6}$$

Onde:

A = atividade de esterificação ($U.mL^{-1}$);

$n_1^{recalculado}$ = número de micro mols de ácido oleico da amostra retirada no tempo zero de reação recalculado (µmol);

n_2 = número de micro mols de ácido oleico da amostra retirada no tempo t minutos de reação (µmol);

V_t = volume total (mL);

t = tempo de reação (min);

V_e = volume de enzima (mL);

V_a = volume de amostra (mL).

2.2.3 Determinação do índice de acidez

O índice de acidez (IA) é definido como a massa de hidróxido de potássio (mg) necessária para neutralizar os ácidos graxos presentes em 1 g de amostra. Para essa análise, amostras de 100 µL, retiradas em duplicata, do óleo vegetal foram dissolvidas em 35 mL de solução de acetona/etanol 1:1 e tituladas com solução de NaOH 0,02 $mol.L^{-1}$, empregando o titulador automático Mettler modelo T50. A equação 7 descreve como o índice de acidez foi calculado.

$$\text{Índice de Acidez (mg KOH.g}^{-1}) = \frac{M \times V \times MM}{m} \quad (7)$$

Onde:

M = concentração em $mmol.mL^{-1}$ da solução de hidróxido de sódio;

V = volume da solução de hidróxido de sódio empregada na titulação da amostra (mL);

M_{KOH} = massa molar do KOH (56,1 $mg.mmol^{-1}$);

m = massa da alíquota (g).

2.2.4 Imobilização das preparações enzimáticas contendo lipases

A imobilização das lipases comerciais líquidas (CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L) e da lipase líquida de *Yarrowia lipolytica* foi realizada empregando o método de adsorção física, a temperatura ambiente (25±1ºC). Foram utilizados 10 mL de solução de lipase previamente diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7 com 1 g de suporte. Após a adsorção, o sobrenadante foi separado do derivado por filtração. O derivado foi submetido à lavagem com solução tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7, e secagem a vácuo por 30 minutos. A fim de avaliar o processo de imobilização foram quantificadas: a atividade hidrolítica da solução de enzima oferecida ao suporte (E_0), do sobrenadante ao final do processo de imobilização (E_f), bem como a concentração de proteína da preparação enzimática oferecida ao suporte (C_0) e a concentração de proteína do sobrenadante ao final do processo de imobilização (C_f).

A seguir serão descritas as condições experimentais utilizadas para avaliação de alguns parâmetros reacionais.

2.2.4.1 Efeito do tipo de suporte

A influência do tipo de suporte empregado na imobilização por adsorção física das lipases comerciais líquidas CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L e da lipase líquida de *Yarrowia lipolytica* foi investigada a temperatura ambiente. Dez mililitros de solução de lipase previamente diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7, foram misturados com 1 g de suporte.

Os suportes empregados foram as zeólitas HZSM-5, com razões molares SiO_2:Al_2O_3 (SAR) de 25 e 280, a peneira molecular mesoporosa MCM-41 e as sílica-aluminas Siral 10, 20 e 40 (com razão Al_2O_3: SiO_2 de 90:10, 80:20 e 60:40, respectivamente). Cabe ressaltar que antes de serem utilizados no processo de imobilização os suportes foram submetidos a um tratamento térmico tendo sido calcinados em mufla durante 4 h, segundo o seguinte procedimento: aquecimento até 150ºC a uma taxa de 10°C min^{-1}, permanecendo nesta temperatura durante 60 min e, em seguida, aquecidos até 500ºC a uma taxa de 10°C min^{-1}, permanecendo nesta temperatura durante 180 min. Após este processo, o material foi

resfriado e transferido para o dessecador, para posterior emprego no processo de imobilização.

Após adsorção da lipase no suporte, o sobrenadante foi separado do derivado sólido por filtração. O derivado foi submetido à lavagem com solução tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7, e secagem a vácuo por 30 minutos. O acompanhamento do processo de imobilização foi feito através da retirada de alíquotas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 e 120 min.

2.2.4.2 Efeito da concentração da solução tampão fosfato

A influência da concentração da solução tampão fosfato de sódio empregada na imobilização por adsorção física das lipases comerciais líquidas CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L e da lipase líquida de *Yarrowia lipolytica* foi investigada a temperatura ambiente. Foram utilizados 10 mL de solução de lipase previamente diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio, pH 7 com 1 g de suporte, nas concentrações de 5 mM e 100 mM. O processo de imobilização foi acompanhado pela retirada de alíquotas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 e 120 min. Essas amostras foram quantificadas em relação à concentração de proteína da preparação enzimática oferecida ao suporte (C_0) e à concentração de proteína do sobrenadante ao final do processo de imobilização (C_f).

2.2.4.3 Efeito do pH da solução tampão fosfato de sódio

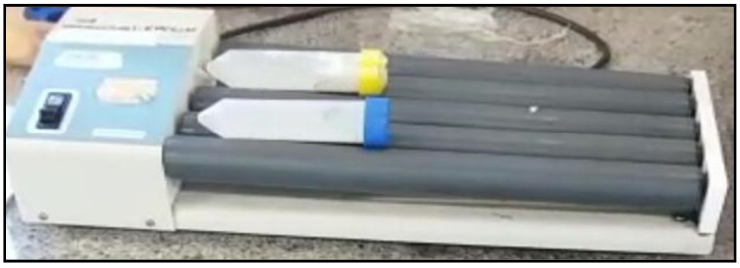
O efeito do pH (pH 7 e pH 11) da solução tampão fosfato de sódio 5 mM empregada na imobilização das preparações comercias líquidas CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L e da preparação enzimática líquida de *Yarrowia lipolytica* foi avaliado a temperatura ambiente. Foram utilizados 10 mL de solução de lipase previamente diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio 5 mM com 1 g de suporte. Para acompanhar a eficiência do processo de imobilização foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 e 120 min. Estas alíquotas foram quantificadas quanto à concentração de proteína da preparação enzimática oferecida ao suporte (C_0) e concentração de proteína do sobrenadante ao final do processo de imobilização (C_f). Após a adsorção, o sobrenadante foi separado do derivado por filtração,

este foi submetido à lavagem com solução tampão fosfato de sódio 5 mM e secagem a vácuo por 30 minutos.

2.2.4.4 Efeito do tipo de sistema reacional

O efeito do tipo de sistema reacional utilizado no processo de imobilização das lipases comerciais líquidas CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L e da preparação enzimática líquida de *Yarrowia lipolytica* foi avaliado a temperatura ambiente. A razão enzima:suporte (volume por massa) foi mantida em 10. Foram utilizados 10 mL de solução de lipase previamente diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7 com 1 g de suporte. A imobilização foi conduzida empregando placa agitadora de rolos (Figura 24) e incubadora com agitação orbital (Figura 25). Para acompanhar a eficiência do processo de imobilização foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 e 120 min. Estas alíquotas foram quantificadas quanto à concentração de proteína da preparação enzimática oferecida ao suporte (C_0) e concentração de proteína do sobrenadante ao final do processo de imobilização (C_f).

Figura 24 - Placa agitadora de rolos



Fonte: O autor, 2018.

Figura 25 – Incubadora com agitação orbital

Fonte: O autor, 2018.

2.2.4.5 Efeito do teor proteico

A influência da concentração de proteína da preparação enzimática empregada na imobilização por adsorção física das lipases comerciais líquidas CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L foi investigado a temperatura ambiente. A razão enzima:suporte (volume por massa) foi sempre mantida em 10, a enzima foi diluída até 10 mL com tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7. As concentrações de proteína testadas foram: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 $mg.mL^{-1}$.

2.2.5 Determinação da atividade hidrolítica

A reação de hidrólise de laurato de *p*-nitrofenila (*p*NFL) foi definida como a metodologia padrão para a medida de atividade hidrolítica das lipases testadas. Para tanto, acompanhou-se a hidrólise de uma solução de *p*NFL a 2,5 mM em tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7). A solução de laurato de *p*-nitrofenila foi preparada pesando-se 0,008 g de *p*NFL e dissolvendo esta massa em 10 mL de uma solução de acetonitrila e dimetilsulfóxido (1:1 $v.v^{-1}$). Para a determinação da atividade de enzima livre, adicionou-se 0,25 mL de *p*NFL 2,5 mM; 2,2 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7) e 0,05 mL de extrato enzimático diluído. O acompanhamento do progresso da reação ocorreu pelo monitoramento da absorvância a 412 nm, a cada 5 segundos, durante 3 min.

Para determinação da curva padrão de *p*-nitrofenol (pNF) foi preparada uma solução mãe contendo 0,0086 g de *p*-nitrofenol comercial (Sigma-Aldrich) dissolvidos em 10 mL de acetonitrila. A solução mãe resultante tinha a concentração igual a 6,18 mM. Para obtenção da curva de calibração de *p*NF, correlacionaram-se os valores de absorbância obtidos a partir da leitura de soluções de *p*NF a concentrações conhecidas de *p*NF, variando-se a concentração entre 0 e 0,247 mM.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de *p*NF formada por minuto, em µmol, por mL de extrato enzimático, sob as condições do ensaio. O cálculo da atividade enzimática foi feito usando-se a Equação 8.

$$Atividade\ \left(\frac{U}{mL}\right) = \frac{\delta \times V_t}{\alpha \times V_e} \times D \quad (8)$$

Sendo:

α = coeficiente angular da curva de calibração (abs.M^{-1});

δ = coeficiente angular da curva de leitura de absorvância da amostra (abs.min^{-1});

V_t = volume total do meio reacional (mL);

V_e = volume do extrato enzimático (mL);

D = fator de diluição do extrato enzimático.

A curva padrão será apresentada no Apêndice A (Figura 61).

2.2.6 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas presente nas soluções enzimáticas contendo lipases foi determinada a partir do emprego da metodologia desenvolvida por Bradford (1976). O reagente de Bradford foi preparado a partir da dissolução de 100 mg de azul de Coomassie em 50 mL de etanol 95% e posterior adição de 100 mL de ácido orto-fosfórico 85% (m.v^{-1}). A solução final foi diluída com água destilada para um volume final de 1 L. Em um tubo de ensaio, adicionaram-se 3 mL do reagente de Bradford a 0,3 mL da amostra, agitou-se o tubo em agitador vórtex e esperou-se por 5 minutos pararealizar a leitura de absorbância (λ = 595 nm) em espectrofotômetro. Para obtenção da curva padrão de proteína, correlacionaram-se valores de absorbância obtidos a partir da leitura de soluções de albumina de soro bovino em concentrações conhecidas de proteína, variando-se a concentração entre 0 e 0,25 mg de proteína.mL^{-1}.

O cálculo da concentração de proteína presente no sobrenadante foi feito usando-se a Equação 9.

$$Concentração\left(\frac{mg}{mL}\right) = Abs \times f \times D \quad (9)$$

Sendo:

Abs = absorvância da amostra (nm);

f = coeficiente angular da curva de calibração ($mg.mL^{-1}abs^{-1}$);

D = fator de diluição da amostra.

A curva padrão será apresentada no Apêndice B (Figura 62).

2.2.7 Cálculo da eficiência de imobilização

A eficiência de imobilização foi calculada a partir da concentração de proteína oferecida ao suporte. O cálculo da eficiência de imobilização foi feito empregando a Equação 10.

$$Eficiência(\%) = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \times 100 \quad (10)$$

Sendo:

C_0 = concentração de proteína oferecida ao suporte ($mg.mL^{-1}$);

C_f = concentração de proteína do sobrenadante ao final do processo de imobilização ($mg.mL^{-1}$).

2.2.8 Cálculo do rendimento de imobilização

O rendimento de imobilização foi calculado a partir da atividade da enzima que foi adsorvida ao suporte, a atividade da solução enzimática no início do processo de imobilização e a atividade da enzima presente no sobrenadante ao final do processo de imobilização. O cálculo do rendimento de imobilização foi feito empregando a Equação 11.

$$\eta_0\,(\%) = \frac{U_{teo} \times 100}{U_e} \quad (11)$$

$$U_{teo} = U_e - U_s \quad (12)$$

Sendo:

η_0 = rendimento de imobilização (%);

U_{teo} = atividade da enzima que foi adsorvida ao suporte ($UIg_{suporte}^{-1}$);

U_e = atividade da solução enzimática presente no sobrenadante no início do processo de imobilização ($UIg_{suporte}^{-1}$);

U_s = atividade da enzima presente no sobrenadante ao final do processo de imobilização ($UIg_{suporte}^{-1}$).

2.2.9 Cálculo da retenção de atividade

A retenção de atividade foi calculada a partir da atividade hidrolítica do biocatalisador, a atividade teórica da enzima que ficou retida ao suporte, considerando a atividade da enzima solúvel no início do processo de imobilização e a atividade da enzima que ainda permanece na forma solúvel ao final da imobilização. O cálculo da retenção de atividade foi feito empregando a Equação 13.

$$R_a\,(\%) = \frac{U_{imohid} \times 100}{U_{teo}} \qquad (13)$$

$$U_{teo} = U_e - U_s$$

Sendo:

R_a = retenção de atividade (%);

U_{imohid} = atividade hidrolítica do biocatalisador ($UIg_{suporte}^{-1}$);

U_{teo} = atividade da enzima que foi adsorvida ao suporte ($UIg_{suporte}^{-1}$);

U_e= atividade da solução enzimática presente no sobrenadante no início do processo de imobilização ($UIg_{suporte}^{-1}$);

U_s = atividade da enzima presente no sobrenadante ao final do processo de imobilização ($UIg_{suporte}^{-1}$).

2.2.10 Cálculo da quantidade de proteína teórica adsorvida ao suporte

A quantidade de proteína adsorvida ao suporte foi calculada a partir da concentração inicial de proteína oferecida ao suporte, da concentração de proteína do sobrenadante ao final

do processo de imobilização, do volume da solução enzimática empregada no processo de imobilização e a massa de suporte. A quantidade de proteína adsorvida foi empregando a Equação 14.

$$P_{ads}\left(\frac{mg}{mL}\right) = \frac{(C_0 - C_f)\times V}{m_{sup}} \quad (14)$$

Sendo:

P_{ads}= quantidade de proteína adsorvida ao suporte ($mg.mL^{-1}$);

C_0 = concentração de proteína oferecida ao suporte ($mg.mL^{-1}$);

C_f = concentração de proteína do sobrenadante ao final do processo de imobilização ($mg.mL^{-1}$);

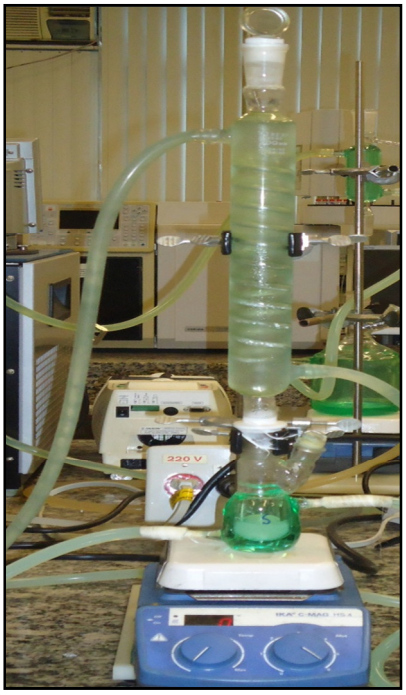
V = volume da solução enzimática empregada no processo de imobilização (mL);

m_{sup} = massa de suporte empregado no processo de imobilização (g).

2.2.11 Síntese de oleato de etila

As reações de esterificação do ácido oleico com etanol para síntese de oleato de etila foram realizadas em um reator batelada fechado de capacidade de 15 mL, provido de condensador e de agitação magnética (Figura 26). Para evitar a perda do álcool por evaporação, a água que circula no condensador era resfriada com o auxílio de banho termostático a 20°C. A temperatura do meio reacional foi mantida constante através da circulação de etilenoglicol pela camisa do reator, proveniente de um banho termostático.

Figura 26- Sistema reacional com reator batelada



Fonte: O autor, 2018.

A seguir são descritas as condições experimentais utilizadas para avaliação de alguns parâmetros reacionais.

2.2.11.1 Efeito da temperatura

A influência da temperatura na síntese de oleato de etila foi investigada nas reações de esterificação do ácido oleico com o etanol, nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 75ºC empregando a razão molar ácido oleico/etanol de 1:1 e teor de enzima de 10% $v.v^{-1}$ para as lipases comerciais líquidas e 20% $v.v^{-1}$ de PEL e 20% $m.v^{-1}$ do derivado obtido após a imobilização das preparações enzimáticas líquidas. Alíquotas de 50 µL, em duplicata, foram retiradas do meio reacional em diferentes tempos e o consumo de ácido oleico nas alíquotas foi determinado por titulometria de neutralização.

2.2.11.2 Efeito da concentração de enzima

A influência da concentração de enzima na síntese de oleato de etila foi avaliada nas reações de esterificação do ácido oleico com o etanol, utilizando razão molar ácido oleico/etanol de 1:1, a 30ºC empregando 5, 10, 20, 30 e 40% $v.v^{-1}$ para as lipases comerciais líquidas e para o PEL e 3, 10 e 20% $m.v^{-1}$ do derivado obtido após a imobilização das preparações enzimáticas líquidas. Alíquotas de 50 μL, em duplicata, foram retiradas do meio reacional em diferentes tempos e o consumo de ácido oleico nas alíquotas foi determinado por titulometria de neutralização.

2.2.11.3 Reutilização da enzima imobilizada

A possibilidade de reutilização dos derivados obtidos após a imobilização das lipases comerciais líquidas (CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L) e da preparação enzimática líquida de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, após as reações de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, no reator batelada fechado foi avaliada. As reações foram conduzidas a 30ºC empregando 20% $m.v^{-1}$ do derivado imobilizado. Após 30 minutos de reação, a lipase imobilizada foi retirada do reator, lavada com 5 mL de etanol e filtrada a vácuo. Em seguida a enzima recuperada foi reutilizada em uma nova reação, na temperatura de 30ºC. Alíquotas de 50 μL, em duplicata, foram retiradas do meio reacional nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 30 min de reação. O consumo de ácido oleico nas alíquotas foi determinado por titulometria de neutralização conforme item 2.2.11.4.

2.2.11.4 Determinação da conversão de ácido oleico por volumetria de neutralização

O progresso das reações de esterificação foi acompanhado a partir da análise indireta de ácidos graxos livres presentes no meio reacional por volumetria de neutralização. Alíquotas de 50 μL do meio reacional, em duplicata, foram dissolvidas em 35 mL da mistura

acetona/etanol e tituladas contra uma solução de NaOH a 0,02 molL^{-1}, empregando titulador automático Mettler modelo T50.

O cálculo utilizado para a conversão do ácido oleico é descrito na Equação 15.

$$Conversão = \frac{(C_0 - C_t)}{C_0} \times 100 \quad (15)$$

Sendo:

Conversão = conversão de ácido oleico (%);

C_0 = concentração de ácido oleico no tempo inicial (mmol mL^{-1});

C_t = concentração de ácido oleico no tempo em questão (mmol mL^{-1}).

2.2.12 Caracterização das lipases líquidas e do meio reacional obtido após a síntese de oleato de etila empregando as lipases imobilizadas

As lipases comerciais líquidas (CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L), a preparação enzimática de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, os meios reacionais obtidos após a reação de esterificação do ácido oleico com o etanol empregando os derivados obtidos a partir do processo de imobilização, bem como o etanol e o ácido oleico foram analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), em modo de refletância total atenuada (ATR), em um espectrômetro Perkin Elmer, modelo Frontier. Foi utilizada uma célula de diamante expandido e os espectros foram adquiridos na faixa entre 600 e 4000 cm^{-1}.

2.2.13 Síntese de biodiesel

As reações de transesterificação enzimática do óleo de soja refinado e dos óleos com diferentes índices de acidez (8,5, 50 e 90 mg KOH.g^{-1}) para síntese de biodiesel foram realizadas em um reator batelada fechado de capacidade de 15 mL, provido de condensador e de agitação magnética (Figura 26). Para evitar a perda do álcool por evaporação, a água que

circula no condensador era resfriada com o auxílio de banho termostático. A temperatura do meio reacional foi mantida constante através da circulação de etilenoglicol pela camisa do reator, proveniente de um banho termostático.

2.2.13.1 Efeito da temperatura

A influência da temperatura na síntese de biodiesel foi investigada nas reações de transesterificação do óleo de soja com o etanol, nas temperaturas de 30, 40 e 50ºC empregando a razão molar óleo/etanol de 1:3, com adição escalonada do etanol (três adições com volumes iguais nos tempos 0, 30 e 60 min, conforme descrito por Bernardes et al., 2007), aplicando 200 U do PEL e 1000 U das lipases comerciais líquidas CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L. O progresso da reação foi acompanhado pela retirada de amostras, em duplicata, nos tempos 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 4,0 h, que foram analisadas por cromatografia em fase gasosa.

2.2.13.2 Efeito da concentração de enzima

A influência da concentração de enzima na síntese enzimática de biodiesel foi avaliada nas reações de transesterificação do óleo de soja com o etanol, utilizando a razão molar óleo/etanol de 1:3, com adição escalonada do etanol (três adições com volumes iguais nos tempos 0, 30 e 60 min, conforme descrito por Bernardes et al., 2007) a 30ºC empregando 0,5, 1, 2, 5, 7, 10 e 13% $v.v^{-1}$ do PEL e das lipases comerciais líquidas CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L e 10 e 20% $m.v^{-1}$ para os derivados obtidos a partir da imobilização destas preparações enzimáticas comerciais e da preparação enzimática líquida de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. O progresso da reação foi acompanhado pela retirada de amostras, em duplicata, nos tempos 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 4,0 h, que foram analisadas por cromatografia em fase gasosa.

2.2.13.3 Efeito do índice de acidez

A influência do índice de acidez do óleo foi avaliada nas reações de transesterificação do óleo de soja (com índice de acidez de 0,5; 8,5; 50 e 90) e o etanol, utilizando a razão molar: óleo/etanol de 1:3 e acido oleico/etanol de 1:1, com adição escalonada do etanol (três adições com volumes iguais nos tempos 0, 30 e 60 min, conforme descrito por Bernardes et al., 2007) a 30ºC empregando 10% $v.v^{-1}$ do PEL e das lipases comerciais líquidas CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L. O progresso da reação foi acompanhado pela retirada de amostras, em duplicata, nos tempos 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 4,0 h, que foram analisadas por cromatografia em fase gasosa.

2.2.13.4 Análise cromatográfica

Para determinar o teor de ésteres etílicos e consumo de ácido oleico nas amostras das reações de síntese de biodiesel foi utilizado método cromatográfico adaptado da norma indicada pelo Comitê de Padronização Europeu (Draft prEN 14103, 2001). Alíquotas de 200µL do meio reacional foram diluídas 5 vezes em hexano contendo heptadecanoato de metila (padrão interno). Em seguida, 1,0 µL da amostra diluída foi injetada no cromatógrafo a gás Varian CP 3800 equipado com uma coluna CP WAX 52 CB (30m x 0,25mm x 0,25µm) e detector de ionização de chama (DIC), em sistema de injeção split com razão de 1:20. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 280ºC e 300ºC, respectivamente. A pressão do gás de arraste (H_2) no sistema foi de 12 psi. A temperatura inicial do forno foi, inicialmente, mantida a 200ºC por 4,5 min e, em seguida, aumentada a 250ºC a uma taxa de 20ºC.min^{-1} e mantida por 5 minutos nesta temperatura. Um computador equipado com o software Star Workstation 6.2 foi conectado ao cromatógrafo a gás através do módulo de interface (Star 800) para integrar automaticamente os picos obtidos.

O cálculo utilizado para a determinação do teor em ésteres etílicos obtido em cada reação seguiu o critério indicado pela norma. A soma das áreas dos ésteres na amostra (pesada previamente) é comparada com a área de uma massa conhecida de padrão, dentro da faixa de resposta linear do detector para o heptadecanoato de metila (padrão) e calculado o conteúdo percentual em massa dos ésteres obtidos na reação (biodiesel) – equação 16.

$$C = \frac{(\sum A) - A_{PI}}{A_{PI}} \times \frac{C_{PI} \times V_{PI}}{M_{am}} \times 100 \quad (16)$$

Onde:

C = conteúdo percentual em massa dos ésteres (biodiesel);

$\sum A$ = área total dos picos dos ésteres;

A_{PI} = área do pico do padrão interno;

C_{PI} = concentração do padrão de heptadecanoato de metila em hexano ($mg.mL^{-1}$);

V_{PI} = volume da solução de padrão interno utilizada para dissolver a amostra (mL);

M_{am} = massa da amostra (mg).

O cálculo utilizado para a determinação da conversão de ácido oleico em oleato de etila foi determinado pela equação 17. A área referente à presença do ácido oleico presente no meio reacional antes da adição da lipase foi subtraída da área do ácido oleico no tempo t da reação.

$$Conversão = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad (17)$$

Onde:

A_0 = área do ácido oleico presente no meio reacional antes da adição da lipase;

A_t = área do ácido oleico presente no meio reacional após a adição da lipase após t minutos de reação;

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo foi organizado da seguinte forma: inicialmente serão apresentadas as características (atividade e teor proteico) das lipases (lipases comerciais e lipase de *Yarrowia lipolytica*) utilizadas nesta tese. Em seguida, será apresentado o desempenho das lipases livres em reações de esterificação de ácido graxo (ácido oleico) e de transesterificação de óleo de soja, com diferentes índices de acidez, com etanol. Após avaliação da performance das lipases livres na síntese de biodiesel, serão apresentados os experimentos de imobilização dessas preparações enzimáticas em diferentes suportes, que serão, então, testadas nas reações de esterificação e de transesterificação para síntese de biodiesel.

3.1 Caracterização das lipases

As lipases imobilizadas mais estudadas para síntese de biodiesel são as preparações Novozym 435 (lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica), Lipozyme RM IM (lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina de troca iônica) e Lipozyme TL IM (lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em sílica) (PEDRO et al., 2018; TAN et al., 2010; FJERBAEK,CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009). Neste trabalho foi avaliada a performance das respectivas formulações líquidas, CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L, na síntese de biodiesel a partir de óleo ácido. O desempenho do extrato enzimático líquido, contendo a lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, obtido por fermentação em estado sólido de *Yarrowia lipolytica* de IMUFRJ 50682 em torta de soja, também foi avaliado em reações de esterificação e de transesterificação.

A concentração de proteínas das preparações enzimáticas testadas, determinadas pelo método de Bradford (item 2.2.3.7), está informada na Tabela 14. Desses resultados destaca-se o elevado teor proteico da Lipolase, em oposição à baixa concentração de proteínas observada no extrato líquido obtido na FES de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. Cabe ressaltar que o extrato líquido de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 não passou por nenhum processo de purificação.

As atividades de esterificação das lipases comerciais líquidas e imobilizadas foram determinadas pelo consumo de ácido oleico na reação de esterificação com etanol, de acordo

com a metodologia descrita no item 2.2.2, e os valores encontrados estão apresentados na Tabela 14. De acordo com esses resultados, verifica-se que a preparação enzimática Palatase 20000L possui maior potencial catalítico em reações de esterificação. Comparando o valor das atividades das enzimas em sua forma livre com as preparações comerciais imobilizadas (Tabela 15), nota-se que as formas imobilizadas apresentam valores de atividade maiores e que as atividades de esterificação da Novozym 435 e da Lipozyme RM IM foram similares.

Os valores de atividade hidrolítica, de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.3.6, encontrados para as lipases líquidas também estão apresentados na Tabela 14. Dentre as enzimas comerciais, a Lipolase 100L apresentou a maior atividade hidrolítica, considerando atividade específica.

Observando-se os valores de atividade específica, destaca-se o potencial do extrato enzimático líquido de *Yarrowia lipolytica*, principalmente em reações de hidrólise.

Tabela 14 - Teor proteico e atividade enzimática das lipases testadas

Lipase	**Concentração de proteína ($mg.mL^{-1}$)**	**Atividade de esterificação ($U\ mL^{-1}$)**	**Atividade específica de esterificação ($U\ mg^{-1}$)**	**Atividade de hidrólise ($U\ mL^{-1}$)**	**Atividade específica de hidrólise ($U\ mg^{-1}$)**
CALB	6	425	71	1457	243
Palatase	4	600	150	2749	687
Lipolase	26	370	14	241.333	9282
Y.lipolytica	0,150	40	267	102	1397

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Tabela 15- Atividade enzimática das lipases comerciais imobilizadas

Lipase	**Atividade de esterificação ($U\ g^{-1}$)**	**Atividade de hidrólise ($U\ g^{-1}$)**
Novozym 435	1950	36.523
Lipozyme RM IM	1945	31.810
Lipozyme TL IM	725	170.607

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

3.2 Reações de síntese de oleato de etila

A escolha de matérias-primas mais baratas do que o óleo vegetal refinado se faz necessária para viabilizar economicamente a produção de biodiesel. Nesse sentido, é interessante estudar a utilização de óleos ácidos na síntese enzimática deste biocombustível. As lipases podem esterificar os ácidos graxos presentes no óleo ácido, convertendo-os em

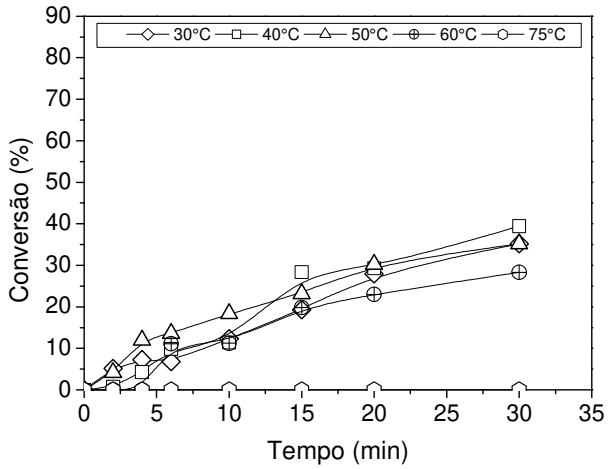
ésteres alquílicos, como também catalisar a reação de transesterificação dos triglicerídeos presentes no óleo com álcool.

A reação de esterificação entre ácido oleico e etanol foi escolhida como reação modelo para avaliar a eficiência das lipases testadas nessa tese para remoção dos ácidos graxos livres presentes em óleos ácidos. O ácido oleico é o ácido graxo predominante nos óleos vegetais utilizados para a síntese de biodiesel (óleo de soja, óleo de palma etc.) e é líquido à temperatura ambiente. Além do tipo de lipase livre testada, foram avaliados os efeitos da temperatura e da concentração enzimática na síntese de oleato de etila.

3.2.1 Efeito da temperatura

A síntese de oleato de etila foi investigada nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 75^{o}C. Nas Figuras 27 a 29 são apresentados os resultados do efeito da temperatura nas reações de esterificação do ácido oleico com etanol empregando as lipases comerciais líquidas CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L.

Figura 27– Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 10% v.v^{-1} da lipase comercial líquida CALB.



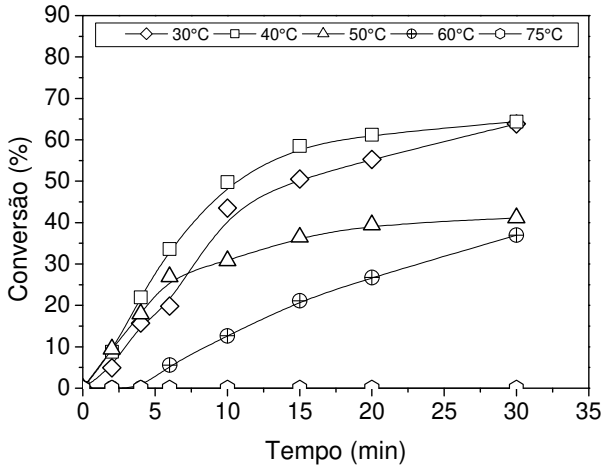
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Nas reações empregando a lipase comercial líquida CALB, a temperatura que proporcionou a obtenção da maior conversão (39,5%) foi a de 40ºC. Com o aumento da temperatura de reação pode-se observar a desnaturação da enzima, uma vez que a velocidade

inicial da reação decaiu após a temperatura ótima, de 8,71 mol L^{-1}. h^{-1} (velocidade inicial para a temperatura de 40°C) para 0 mol L^{-1}. h^{-1} (velocidade inicial para a temperatura de 75°C). A lipase perdeu completamente sua atividade a 75°C.

Foresti e Ferreira (2005) também estudaram o efeito da temperatura (35-75ºC), empregando a lipase comercial líquida CALB, na conversão do ácido oleico em oleato de etila e observaram que a taxa inicial de reação aumentou com a temperatura. No entanto, a estabilidade da enzima diminuiu com a elevação da temperatura. De acordo com os autores, a temperatura ótima para a lipase CALB foi a de 45ºC. A 75ºC, a atividade da CALB diminuiu severamente, mostrando uma redução do rendimento de cinco vezes após 7 h de reação, comparada com o rendimento máximo.

Figura 28 – Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 10% $v.v^{-1}$ da lipase comercial líquida Palatase 20000L.

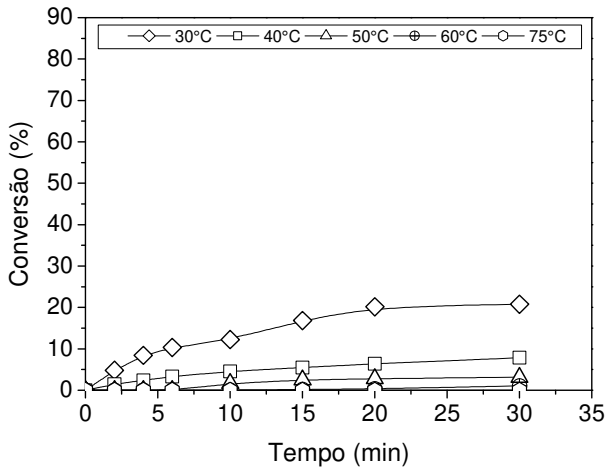


Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Pode-se observar que, nas reações empregando a preparação enzimática comercial Palatase 20000L (Figura 28), a temperatura ótima também foi a de 40ºC e possibilitou alcançar a maior conversão entre as enzimas líquidas testadas (64,4%).

No entanto, a conversão caiu significativamente quando a temperatura aumentou para 50°C (41,2%) e 60°C (37%). A velocidade inicial da reação também diminuiu significativamente de 15,18 mol L^{-1}. h^{-1} (velocidade inicial para a temperatura de 40°C) para 0 mol L^{-1}. h^{-1} (velocidade inicial para a temperatura de 75°C), sinalizando a desnaturação da lipase em temperaturas maiores que 40°C.

Figura 29 – Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 10% $v.v^{-1}$ da lipase comercial líquida Lipolase 100L.



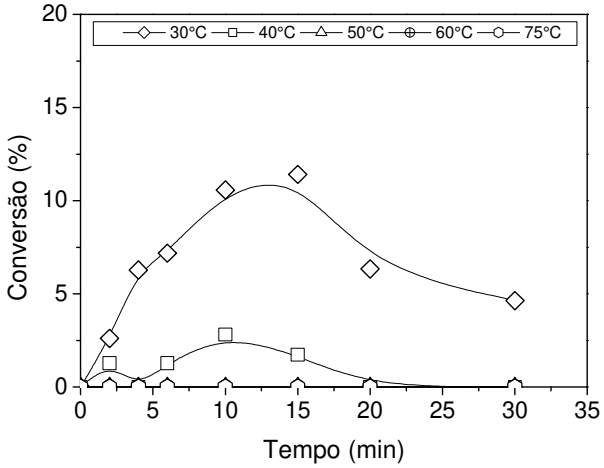
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

A lipase Lipolase 100L mostrou menor estabilidade térmica (Figura 29). O aumento na temperatura ocasionou uma diminuição significativa na velocidade inicial para temperaturas maiores que 30°C.

Na Figura 30 estão apresentados os resultados obtidos para o estudo de temperatura empregando a preparação enzimática de *Yarrowia lipolytica*. Pode-se observar que o aumento na temperatura acima de 30°C resultou na queda acentuada na conversão da reação. Em temperaturas maiores que 40°C, não foi observada consumo de ácido oleico.

O efeito da temperatura na atividade catalítica da lipase extracelular de *Yarrowia lipolytica* purificada (Y1Lip2) foi avaliado por Yu, Qin e Tan (2007), que determinaram como temperatura ótima o valor de 40°C. A atividade catalítica da lipase diminuiu significativamente a partir de 45°C e a 60°C nenhuma atividade foi observada.

Figura 30 – Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 20% $v.v^{-1}$ da lipase líquida de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Brígida (2010) investigou o efeito da temperatura (25-65°C) na atividade da lipase livre de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, obtida a partir de fermentação submersa, nas reações de hidrólise do *p*-nitrofenil laurato (pH 7). O aumento da temperatura na faixa de 25 a 37°C ocasionou um aumento da atividade enzimática. Contudo, a partir da temperatura de 37°C, observou-se um declínio na atividade. A atividade ótima da lipase foi determinada, sendo a mesma de 37°C.

Nas reações catalisadas por enzimas, a elevação da temperatura acarreta um aumento da velocidade de reação, já que esta aumenta a energia cinética das moléculas que compõem o sistema, possibilitando um aumento na probabilidade de choques efetivos entre essas moléculas. Porém, esse efeito só é observado quando ocorre em um intervalo de temperatura que permita a manutenção da estrutura da enzima. A elevação da temperatura pode ocasionar a perda da estrutura catalítica nativa da enzima (desnaturação), uma vez que as ligações químicas responsáveis pela manutenção dessa estrutura tridimensional são alteradas. Com o rompimento das ligações de hidrogênio, uma série de alterações estruturais ocorre, ocasionando a formação de uma nova conformação ou um estado sem estrutura definida, no qual a enzima é dita desnaturada. Esta temperatura de desnaturação é variável para cada enzima, porém esta se encontra pouco acima de sua dita temperatura ótima na qual a enzima opera com eficiência máxima (SEGEL, 1993).

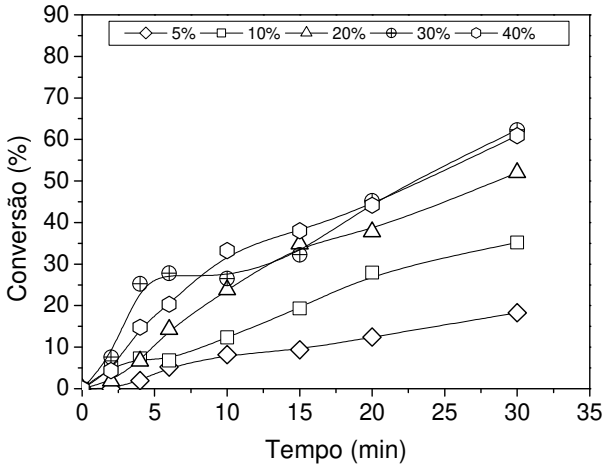
3.2.2 Efeito da concentração enzimática

Como a temperatura de 30ºC foi a que propiciou as maiores conversões de ácido oleico para a maioria das lipases testadas, os experimentos a seguir foram realizados nesta temperatura para evitar a desnaturação enzimática.

Os efeitos da concentração enzimática para as lipases comerciais líquidas estão apresentados nas Figuras 31 a 33.

Nas reações empregando a lipase comercial líquida CALB (Figura 31), a concentração enzimática que possibilitou a obtenção da maior conversão (62,3%) foi a de 30% $v.v^{-1}$. Com o aumento da concentração de enzima de 5 a 30% $v.v^{-1}$ pode-se observar um aumento na conversão. Contudo, o emprego do teor de 40% $v.v^{-1}$, não resultou em um aumento na conversão e nem na taxa inicial da reação. A formulação enzimática utilizada é preparada em meio aquoso, logo, o uso de maior concentração de biocatalisador significa um aumento na quantidade de água no sistema reacional, que é um subproduto da reação.

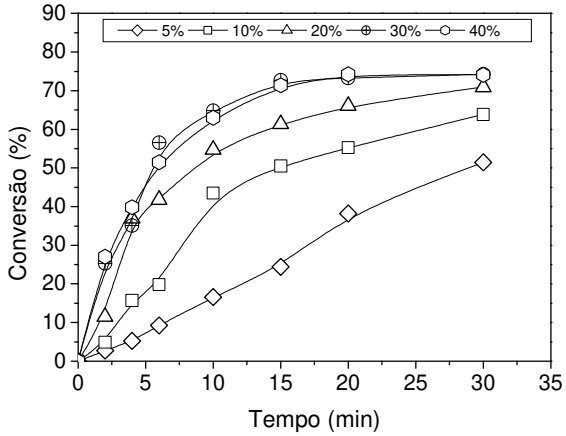
Figura 31 – Avaliação da concentração enzimática (5, 10, 20, 30 e 40% $v.v^{-1}$) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30ºC e a lipase comercial líquida CALB.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

De acordo com os resultados da Figura 32, observa-se que para a Palatase 20000L, o emprego de 30% $v.v^{-1}$ também proporcionou a obtenção da maior conversão (74,2%). A utilização do teor enzimático de 40% $v.v^{-1}$, não possibilitou aumento da conversão, indicando a saturação do biocatalisador.

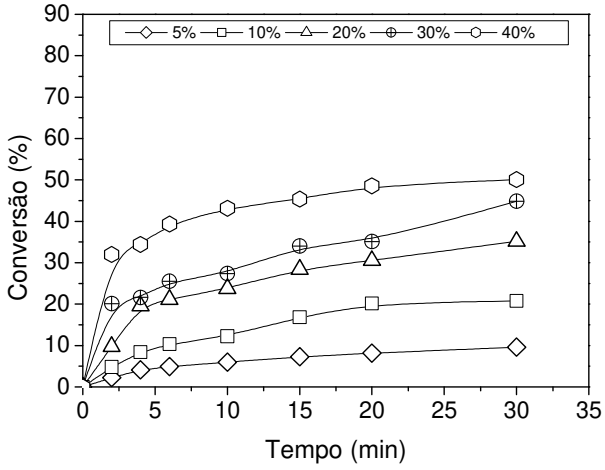
Figura 32 – Avaliação da concentração enzimática (5, 10, 20, 30 e 40% v.v^{-1}) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30ºC e a lipase comercial líquida Palatase 20000L.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Para a Lipolase, a velocidade inicial de reação aumentou com o incremento na concentração de enzima na faixa estudada. A concentração enzimática de 40% v.v^{-1} possibilitou que a maior conversão fosse alcançada (50%).

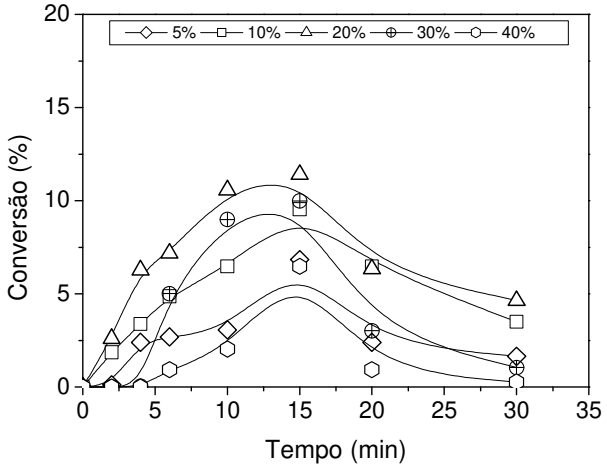
Figura 33 – Avaliação da concentração enzimática (5, 10, 20, 30 e 40% v.v^{-1}) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30ºC e a lipase comercial líquida Lipolase 100L.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Na Figura 34 são apresentados os efeitos da concentração enzimática para a preparação enzimática de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.

Figura 34 – Avaliação da concentração enzimática (5, 10, 20, 30 e 40% v.v^{-1}) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30ºC e a lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Observa-se que ocorreu uma diminuição na conversão da reação de esterificação empregando o extrato enzimático líquido de *Yarrowia lipolytica* em concentração maior que 20% v.v^{-1}. Pode-se notar que a velocidade inicial de reação também diminui para teores superiores a 20% v.v^{-1}. Novamente, o emprego de um maior teor do extrato enzimático representou um aumento na quantidade de água no sistema reacional e, consequentemente, na reversão da reação, conforme pode ser verificado pela diminuição da conversão em tempos de reação maiores que 15 minutos.

A influência da quantidade de água nas reações de esterificação de ácidos graxos com etanol foi estudada por Meng e colaboradores (2011) empregando lipases de *Yarrowia lipolytica* imobilizadas em membranas pré-fabricadas. Os autores observaram que o aumento da quantidade de água no meio superior a 0,5% provocou uma redução do grau de esterificação, quando comparada a uma reação conduzida sem adição de água.

3.3 Reações de transesterificação

Após verificar a performance das lipases livres em reações de esterificação, a transesterificação de óleo de soja com etanol foi estudada, avaliando os efeitos da temperatura, da concentração de enzima e da acidez do óleo.

3.3.1 Efeito da temperatura

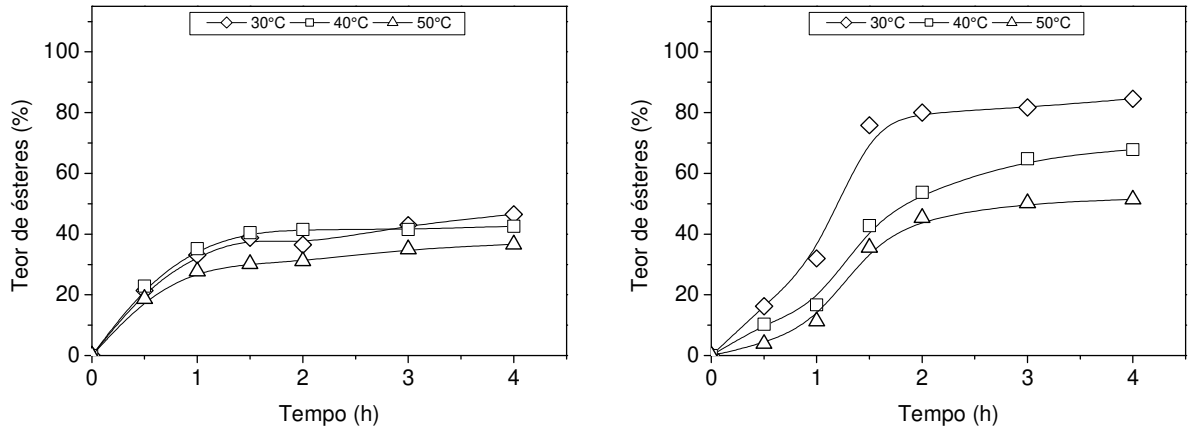
A síntese enzimática do biodiesel geralmente é realizada na faixa de temperaturas entre 30-55ºC para evitar a desnaturação térmica da lipase (CHRISTOPHER, HEMANATHAN e ZAMBARE, 2014; GOG et al., 2012). Neste estudo, a faixa de temperatura escolhida para a condução das reações de transesterificação do óleo de soja com etanol, utilizando as lipases livres, foi de 30-50ºC.

Os resultados obtidos empregando as preparações enzimáticas Palatase 20000L e Lipolase 100L são apresentados na Figura 35. O teor de éster etílico formado nas reações catalisadas pela lipase de *Yarrowia lipolytica* e CALB, em todas as temperaturas testadas, foi menor do que 2% $m.m^{-1}$ e, portanto, os resultados dessas reações não foram incluídos na Figura 35.

Para Palatase 20000L e Lipolase 100L, pode-se verificar na Figura 35 que o aumento da temperatura diminuiu o teor em biodiesel. Após 4 h de reação, o teor em ésteres etílicos obtido nas reações catalisadas pela Palatase 20000L foi de 46%, 43% e 35% a 30ºC, 40ºC e 50ºC, respectivamente.

O aumento da temperatura também foi prejudicial para as reações conduzidas com a Lipolase 100L, no entanto, a concentração de ésteres etílicos foi muito maior, principalmente a 30 ºC: 84,6%, 67,8% e 51,4%, a 30ºC, 40ºC e 50ºC, respectivamente.

Figura 35 - Efeito da temperatura na reação de transesterificação do óleo de soja com o etanol, empregando razão molar óleo de soja: etanol 1:3, adição escalonada do etanol (1/3 do volume total adicionado nos tempos 0, 0,5 1 h) e 1000 U de atividade de esterificação das lipases comerciais líquidas ([a] Palatase 20000L e [b] Lipolase 100L).



a) Palatase 20000L b) Lipolase 100L

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

O efeito da temperatura (40ºC a 78ºC) na reação de transesterificação catalisada por lipases imobilizadas (Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM) foi investigado por Pedro e colaboradores (2018). Com a Novozym 435, o teor em biodiesel aumentou com o aumento da temperatura até 70ºC, sendo obtidos 62% de rendimento. Nas reações empregando Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM, a concentração de ésteres etílicos aumentou com o aumento da temperatura até 50ºC, diminuindo ligeiramente para temperaturas superiores a 60ºC. A maior concentração de ésteres etílicos, nas reações com Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM, foi de 32% e 52%, respectivamente, a 50ºC.

As diferenças entre essas lipases comerciais podem ser explicadas considerando que a sensibilidade de uma enzima à desnaturação em temperaturas elevadas pode variar de acordo com muitos fatores (pH, solvente, substratos, produtos, etc.) e pode diferir de uma proteína para outra. Em comparação com as respectivas formas livres, lipases imobilizadas podem apresentar maiores temperaturas ótimas, mesmo diferindo de uma para outra. Geralmente, as lipases imobilizadas apresentam maior resistência à temperatura quando comparadas às livres (FJERBAEK, CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009). A ligação ao suporte pode aumentar a estabilidade da enzima e promover uma diminuição do efeito térmico, evitando a sua desnaturação, quando comparada à enzima livre (FJERBAEK, CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009). Este aumento da estabilidade térmica foi observado nas reações conduzidas com a Palatase e sua respectiva forma imobilizada Lipozyme RM IM, e com a Lipolase e a Lipozyme TL IM. O resultado mais intrigante, no entanto, foi obtido ao comparar

a CALB com sua forma comercial imobilizada, a Novozym 435. A CALB não apresentou nenhum resultado expressivo para qualquer temperatura testada; o maior rendimento obtido foi de 2% a 30ºC. Por outro lado, a Novozym 435 apresentou a maior eficiência (60%) para síntese de biodiesel a 70°C (Pedro et al., 2018).

Também é interessante observar que a transesterificação do óleo de soja com etanol utilizando a Lipolase resultou em maiores teores de biodiesel (84,6%), do que a sua forma imobilizada Lipozyme TL IM (52%). Assim, o uso da lipase livre, que possui menor custo que a sua correspondente preparação imobilizada comercial, em um processo homogêneo a 30°C, permitiu maiores teores de biodiesel (Pedro et al., 2018).

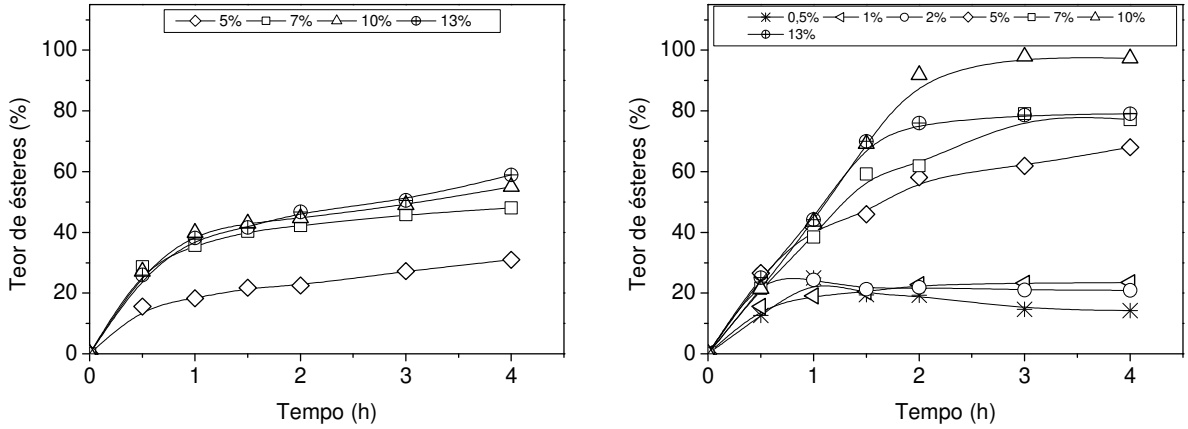
3.3.2 Efeito da concentração enzimática

Os efeitos da concentração enzimática na síntese de biodiesel empregando as lipases comerciais líquidas CALB, Palatase 20000L, Lipolase 100L e extrato enzimático líquido de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 foram avaliados empregando os teores de 0,5; 1; 2; 5; 7; 10 e 13% $v.v^{-1}$. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 36. Novamente, o teor de éster etílico formado nas reações catalisadas pela lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 e CALB, em todas as concentrações testadas, foi menor do que 2% $m.m^{-1}$ e, portanto, os resultados dessas reações não foram incluídos na Figura 36.

De acordo com a Figura 36a verifica-se que o maior teor em biodiesel (55%) foi obtido com 10% $v.v^{-1}$ de Palatase. As reações conduzidas com concentrações enzimáticas menores que 5% $v.v^{-1}$ não alcançaram 1% de rendimento em biodiesel, logo estes resultados não foram ilustrados nesta figura.

Avaliando os resultados obtidos para a Lipolase 100L, observa-se que a concentração enzimática que possibilitou alcançar a maior concentração de biodiesel (97,3%) foi de a 10% $v.v^{-1}$. Os rendimentos de biodiesel para os teores de 0,5; 1; 2; 5; 7 e 13% $v.v^{-1}$ foram de 14,2; 23,4; 20,9; 68,0; 77,2 e 79,1%, respectivamente.

Figura 36 - Efeito da concentração enzimática (% v.v^{-1}) na reação de transesterificação do óleo de soja com o etanol, empregando razão molar óleo de soja: etanol 1:3, com adição escalonada do etanol (1/3 do volume total adicionado nos tempos 0; 0,5 1 h), a 30°C ([a] Palatase 20000 L e [b] Lipolase 100L).



a) Palatase 20000L

b) Lipolase 100L

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

A queda no rendimento de ésteres etílicos com o aumento da concentração enzimática acima de 10% v.v^{-1} para a Lipolase 100L pode ser justificada pela natureza das formulações enzimáticas líquidas, que são soluções aquosas. A presença de água no meio reacional pode promover a hidrólise dos ésteres e, portanto, a diminuição do teor de ésteres e um aumento de ácidos graxos livres (GULDHE et al., 2015). O teor de água no meio reacional tem alguns benefícios nas reações empregando lipases livres como a diluição do meio, reduzindo a concentração de etanol, e a formação de uma segunda fase líquida, criando uma interface que é conhecida por ativar muitas lipases (PEDERSEN et al., 2014; TAN et al., 2010).

O efeito da concentração da lipase comercial imobilizada (1 a 9% m.m^{-1}), Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM e Novozym 435, na síntese de biodiesel foi estudado a 50ºC por Pedro e colaboradores (2018). A reação conduzida com Lipozyme RM IM obteve o maior teor em biodiesel (51%), após 4 h, utilizando 7% m.m^{-1} de enzima, que foi semelhante ao resultado obtido com 9% em m.m^{-1}. Os maiores teores em biodiesel (50%) foram alcançados usando 5 e 7% m.m^{-1} Lipozyme TL IM. Maiores concentrações de Lipozyme TL IM resultaram em menores concentrações de biodiesel, provavelmente pela formação de agregados enzimáticos. Novamente destaca-se a melhor performance da preparação Lipolase líquida, em relação à sua correspondente preparação imobilizada, permitindo alcançar teor de biodiesel de 97,3%.

O aumento da concentração de Novozym 435 até 9% m.m^{-1} acarretou em um crescente aumento da concentração de biodiesel no meio reacional. Utilizando 9% m.m^{-1} de Novozym

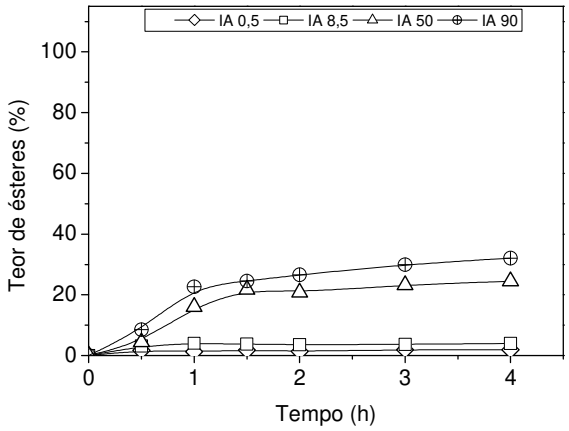
435, o teor em esteres etilicos foi de 73%. Novamente, comparando as lipases livres com suas respectivas formas imobilizadas, Novozym 435 e CALB apresentaram resultados divergentes. Enquanto a Novozym 435 apresentou um rendimento de 73% com 9% $m.m^{-1}$, o uso de CALB na faixa de concetração estudada (0,5 a 13% $v.v^{-1}$) não catalisou a formação de ésteres etílicos em concentrações maiores do que 2%, indicando que esta enzima não é adequada às reações de transesterificação quando em sua forma livre (Pedro et al., 2018).

3.3.3 Efeito da acidez

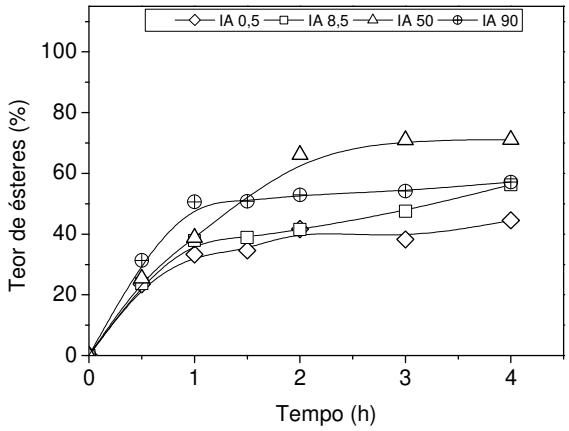
O efeito da acidez na síntese de biodiesel foi avaliado a partir do emprego do óleo ácido com índice de acidez de 0,5; 8,5; 50 e 90, e das preparações enzimáticas líquidas, CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L. Apesar de não conseguir determinar as condições ótimas para a lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 e para a CALB, a síntese de biodiesel a partir de óleos ácidos também foi realizada 30°C, com 10% $v.v^{-1}$ dessas preparações enzimáticas. Os resultados são apresentados na Figura 37. O teor em biodiesel com a lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 foi menor que 2% para todas as condições testadas.

Para as reações empregando a CALB (Fig. 37a), a concentração em biodiesel aumentou com o aumento da acidez do óleo, conforme apresentado na Figura 37a. O maior teor (32%) foi alcançado com o óleo ácido com IA de 90. Uma vez que esta lipase apresentou melhor performance na esterificação do que na transesterificação, os resultados são coerentes, indicando que o biodiesel produzido deve ser proveniente da reação de esterificação do ácido oleico com etanol.

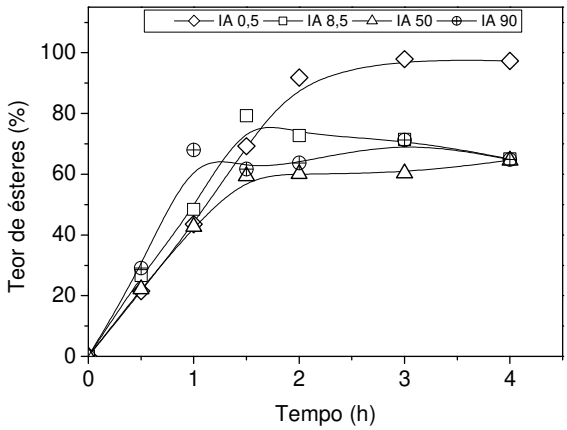
Figura 37- Efeito da acidez na reação de transesterificação do óleo ácido com o etanol, empregando razão molar óleo: etanol 1:3, ácido oleico:etanol 1:1, adição escalonada do etanol (1/3 do volume total adicionado nos tempos 0, 0,5 1 h, a 30°C e 10% $v.v^{-1}$ das lipases comerciais líquidas ([a] CALB, [b] Palatase 20000L e [c] Lipolase 100L).



a) CALB



b) Palatase 20000L



c) Lipolase 100L

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

O maior teor em biodiesel (71%) nas reações conduzidas com a Palatase 20000L (Fig. 37b) foi alcançado com o óleo ácido de IA 50, após 4 horas de reação. O teor em biodiesel diminuiu ao empregar o óleo ácido com IA de 90 (57%). Este resultado pode ser explicado pela maior concentração de etanol no meio reacional quando o óleo ácido com IA de 90 foi usado, o que pode ser responsável pela desnaturação enzimática.

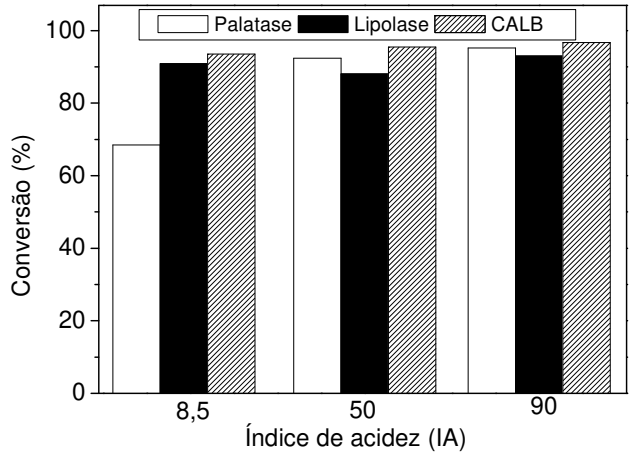
Já para a Lipolase 100L (Fig. 37c), a acidez do meio diminuiu a síntese de biodiesel. O teor de biodiesel foi de cerca de 65% para óleos ácidos com IA de 8,5, 50 e 90 e de 97,3% para o óleo refinado. Esse resultado também é coerente com os observados nas reações de esterificação de ácido oleico e de transesterificação do óleo de soja com etanol. A Lipolase 100L foi mais ativa em reações de transesterificação do que em reações de esterificação.

Quando comparadas às suas respectivas formas imobilizadas, Palatase 20000L e Lipolase 100L foram capazes de apresentar melhores resultados do que a Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM. Palatase 20000L obteve o melhor resultado com o óleo ácido de IA 50 (71%), enquanto que Lipozyme RM IM apresentou esta mesma tendência, mas propiciou teor de biodiesel de 30%, a 50ºC. Para Lipolase 100L e Lipozyme TL IM, o melhor resultado foi obtido utilizando óleo de soja refinado com IA de 0,5; sendo o teor de biodiesel de 97,3% e de 50%, respectivamente.

As lipases CALB e Novozym 435 mostraram um desempenho semelhante, aumentando a concentração de biodiesel com o aumento do índice de acidez do óleo. No entanto, a preparação imobilizada obteve resultados muito melhores com óleo de soja refinado com IA de 0,5 (28%) e óleo ácido com IA de 8,5 (33%) do que a CALB, que não obteve um rendimento superior a 5% em ambos os casos.

A conversão do ácido oleico também foi determinada nas reações de síntese de biodiesel empregando óleo ácido. Na Figura 38 são apresentadas as conversões de ácido oleico obtidas após 4 h de reação para as reações de transesterificação dos óleos ácidos com índice de acidez de 8,5, 50 e 90 empregando CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L. Os resultados obtidos indicam novamente que, embora a CALB tenha propiciado baixos teores de biodiesel, esta lipase poderia ser aplicada para reações de esterificação de matéria-prima com elevados teores de ácidos graxos livres, uma vez que converteu quase todo o ácido oleico presente no meio reacional para todos os óleos ácidos testados. Para as reações com Palatase 20000L, as conversões obtidas foram elevadas para os óleos ácidos com IA de 50 e 90, estas foram de 93% e 95%, respectivamente. Ao empregar o óleo ácido com IA de 8,5, a conversão obtida foi menor, em torno de 70%. A lipase Lipolase 100L apresentou altos valores de conversão para óleos ácidos com IA de 8,5, 50 e 90, que foram de 91%, 88% e 93%, respectivamente.

Figura 38 – Conversão do ácido oleico obtida nas reações de transesterificação do oleo ácido (IAs 8,5; 50 e 90) empregando as lipases comerciais CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L, após 4 h. Condições reacionais: 30°C, 10% $v.v^{-1}$de lipase, razão molar óleo:etanol 1:3, ácido oleico:etanol 1:1, adição escalonada do etanol (1/3 do volume total adicionado nos tempos 0, 0,5 e 1 h).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

3.4 Imobilização por adsorção

Considerando o elevado custo das enzimas comerciais imobilizadas, que limita a sua aplicação, foi estudada a imobilização de lipases em suportes inorgânicos, pelo método de adsorção, a fim de permitir seu reuso e, desta forma, diminuir o custo do bioprocesso.

No processo de imobilização foram avaliados os efeitos de: tipo de suporte, solução tampão fosfato empregada (pH e concentração), tipo de sistema reacional (placa agitadora de rolos e incubadora com agitação orbital) e concentração de proteína do preparado enzimático.

3.4.1 Caracterização dos suportes empregados na imobilização das lipases

Vários suportes vêm sendo testados para imobilização de lipases (CIPOLATTI et al., 2017; CARVALHO, LIMA e SOARES, 2015; VASCONCELLOS et al., 2015; CALGAROTO et al., 2011; MENDES, 2009). O suporte ideal deve ser inerte, estável e resistente à força mecânica. Neste trabalho foram estudados alguns sólidos inorgânicos

microporosos (zeólitas HZSM-5 com razões molares SiO_2:Al_2O_3 (SAR) de 25 e 280) e mesoporosos (peneira molecular Si-MCM 41 e sílica-aluminas Siral 10, 20, 40 com razão Al_2O_3: SiO_2 de 90:10, 80:20 e 60:40, respectivamente).

A vantagem do emprego de suportes microporosos é a formação de uma rede ou agregados. As partículas isoladas, quando ligadas por ligações de hidrogênio, originam aglomerados estáveis que podem ter centenas de nanômetros de tamanho e, deste modo, formar uma rede tridimensional (MATTE et al., 2012). Dizge e colaboradores (2008) observaram que a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em suporte microporoso hidrofóbico apresentou estabilidade operacional durante 15 ciclos. Quanto aos materiais mesoporosos, estes possuem grandes áreas superficiais, o que minimiza as restrições difusionais, melhora a acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima (BON, FERRARA e CORVO, 2008), os derivados geralmente retêm atividades mais elevadas e têm maior carga enzimática (ARROYO, SÁNCHEZ-MONTERO e SINISTERRA, 1999).

Aspectos morfológicos e a química de superfície desses materiais, dentre as quais se destaca a área específica; a forma, a distribuição e o tamanho dos poros; a presença de grupamentos químicos e de cargas superficiais, a composição da superfície dos materiais e o caráter hidrofóbico/hidrofílico da superfície são de grande importância para o sucesso da imobilização.

Neste sentido, algumas características texturais dos suportes foram determinadas e estão apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16– Caracterização textural dos suportes empregados na imobilização das lipases comerciais líquidas.

Suporte	**Área específica ($m^2.g^{-1}$)**	**Volume de microporos (cm^3g^{-1})**	**Volume de mesoporos (cm^3g^{-1})**
MCM-41	910	-	0,849
HZSM-5 (SAR 25)	360	0,165	0,021
HZSM-5 (SAR 280)	367	0,166	0,060
Siral 10	313	0,01	0,624
Siral 20	338	0,01	0,712
Siral 40	451	-	0,845

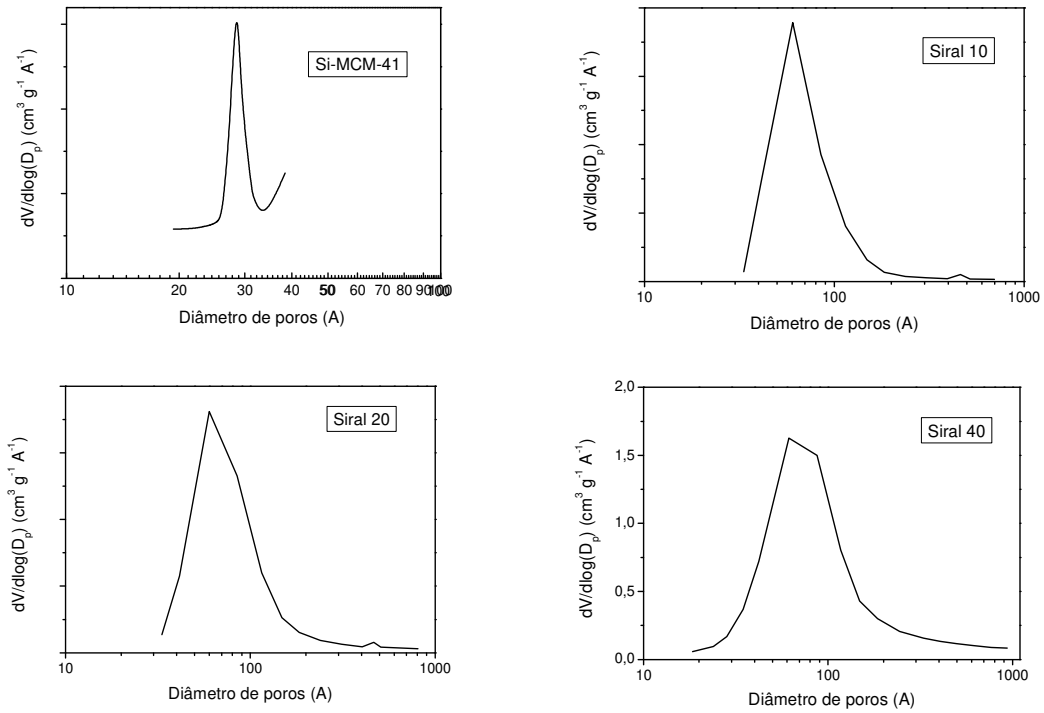
Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Como apresentado na Tabela 16 todos os suportes possuem áreas específicas superiores a 300 $m^2.g^{-1}$. As zeólitas HZSM-5 (SAR 25 e SAR 280) são sólidos microporosos. Considerando-se que o diâmetro de seus poros situa-se em torno de 5,5 Å, a imobilização das enzimas deve ocorrer na superfície dos cristais. Por outro lado, os outros suportes estudados

são materiais mesoporosos (20 Å < Dp < 500 Å), o que possibilita a imobilização de quantidades significativas de enzima em seu interior (GARCIA-GALAN et al., 2011; HANEFELD , GARDOSSI e MAGNER, 2009).

A Figura 39 apresenta a distribuição de diâmetro de poros encontrada para os suportes mesoporosos estudados. A Si-MCM-41, apresenta uma distribuição de diâmetro de mesoporos estreita, com dimensão média próxima a 30 Å. Já as sílica-aluminas da série Siral apresenta distribuição de diâmetro de poros ampla, abrangendo a faixa de 30 a 200 Å, com predomínio de poros na faixa entre 50 e 100 Å.

Figura 39 – Distribuição de diâmetro de poros dos suportes mesoporosos



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

As lipases CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L possuem diâmetro esférico médio de 39,2, 41 e 53,2 Å, respectivamente. O diâmetro da lipase de *Yarrowia lipolytica,* é da ordem de 30 a 40 Å. Constata-se assim, que a imobilização das enzimas nas zeólitas e na peneira molecular Si-MCM-41 dar-se-á na superfície externa dos cristais, enquanto nos suportes da série Siral ela poderá ocorrer tanto no interior dos poros quanto na superfície das partículas.

As zeólitas HZSM-5 com razões molares SiO_2:Al_2O_3 (SAR) de 25 e 280 e as sílica-aluminas, Siral 10, 20, 40, com razão Al_2O_3: SiO_2 de 90:10, 80:20 e 60:40 foram testadas a fim de avaliar a influência da razão Si:Al, uma vez que quanto maior essa razão mais

hidrofóbico é o material. É relatado na literatura que lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos podem exibir maior atividade que enzimas livres ou outras formas de imobilização (LAGE et al., 2016; MENDES et al., 2013) e são mais estáveis sob diferentes condições experimentais (FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

A imobilização das lipases comerciais líquidas foi realizada pela mistura de 10 mL da preparação enzimática diluída em tampão fosfato 5 mM pH 7 com 1 g do suporte e foi acompanhada pela determinação da concentração de proteínas e da atividade enzimática. Verificou-se que, em alguns casos, os valores de eficiência de imobilização calculados pela determinação da atividade enzimática e pelo teor proteico não eram concordantes. Considerando que alguns desses materiais apresentam caráter ácido, o que poderia provocar a inativação enzimática, mediu-se o pH da solução após a adição do sólido ao tampão fosfato 5 mM pH 7. Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 17.

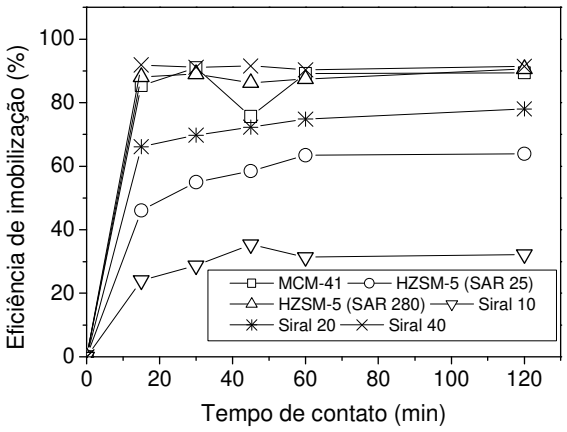
Tabela 17 – pH final da solução após a adição do suporte ao tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7.

Suporte	**pH final da solução**
MCM-41	5,40
HZSM-5 (SAR 25)	2,40
HZSM-5 (SAR 280)	3,40
Siral 10	5,00
Siral 20	4,80
Siral 40	4,00

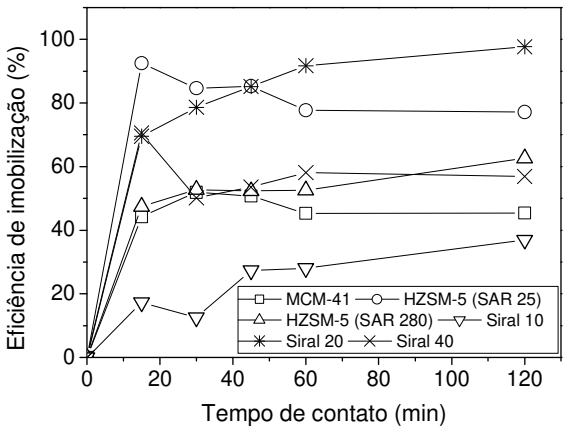
Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Desta forma, verifica-se que, para alguns suportes, principalmente para as zeólitas HZSM-5, o pH final da solução caiu significativamente. A diminuição do pH para a faixa ácida pode ter causado a inativação da lipase, com a consequente queda na atividade hidrolítica. Desta forma, a eficiência da imobilização calculada pela diferença na atividade enzimática, não seria um parâmetro confiável e resolveu-se determinar a eficiência de imobilização pela diminuição do teor proteico na solução. Os resultados obtidos para a imobilização das preparações enzimáticas comerciais estão apresentados na Figura 40.

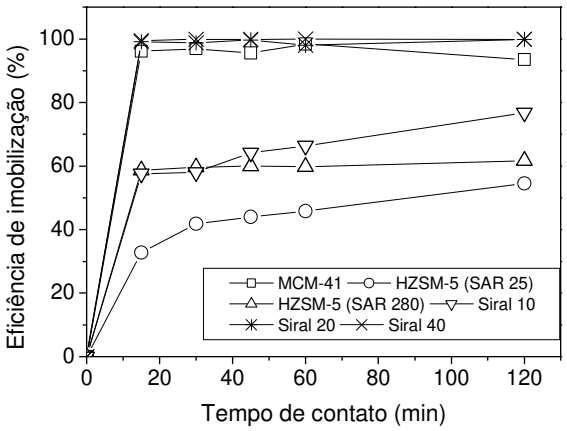
Figura 40 - Efeito do tipo de suporte na eficiência de imobilização das lipases comerciais líquidas ([a] CALB; [b] Palatase 20000L e [c] Lipolase 100L), empregando 10 mL da solução enzimática (diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0) com 1g de suporte, a temperatura ambiente (25±1ºC).



a) CALB



b) Palatase 20000L



c) Lipolase 100L

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Alguns fatores que podem afetar a eficiência da adsorção enzimática em suportes sólidos são o ponto isoelétrico da enzima e do suporte, bem como o pH do meio de adsorção (YU et al., 2013). O pH da solução é um fator importante para a adsorção da enzima ao suporte, pois o pH afeta a superfície do suporte e o grau de ionização das moléculas de enzima (MILETIC et al., 2010). Segundo Magner (2013), o processo de adsorção é mais eficiente quando ocorre em uma faixa de pH entre os pontos isoelétricos da enzima e do suporte.

O ponto isoelétrico (pI é o pH no qual há um número igual de cargas positivas e negativas em sua superfície) de uma enzima deve ser considerado nos estudos de adsorção. Abaixo do pI a proteína é positivamente carregada e acima do pI é negativamente carregada.

Enzimas não têm carga líquida em seus pontos isoelétricos, e, portanto, a adsorção máxima de soluções aquosas é geralmente observada em seus pontos isoelétricos (SECUNDO et al., 2008). Desse modo, altas concentrações de proteína adsorvidas ao suporte são esperadas em valores de pH próximos ao pI da proteína onde a molécula tem carga neutra e qualquer repulsão lateral entre as moléculas é minimizada. À medida que o pH se afasta do ponto isoelétrico, repulsões eletrostáticas laterais entre as moléculas de proteína tornam-se mais dominantes, reduzindo a quantidade de proteína adsorvida. No entanto, esse comportamento específico só acontece quando as interações iônicas são a principal força motriz do processo de adsorção.

O pI das lipases CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L é 6,0; 3,8 e 4,4, respectivamente (UPPENBERG et al., 1994; RODRIGUES e FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2010; JHA et al.; 1999). Quanto ao pH das preparações comerciais CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L é 4,64; 5,57 e 6,06, respectivamente. Para a lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 o pH é 7,39. O pH ótimo para as preparações enzimáticas CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L situa-se na faixa de 5-9; 7-10 e 7-10, respectivamente. Já para a lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 o pH ótimo é 9 (PEREIRA-MEIRELLES, ROCHA-LEÃO e SANT'ANNA JR, 1997).

Como foi possível observar na Figura 40a, os suportes que apresentaram as maiores eficiências para a imobilização da CALB foram Siral 40 (91,4%), HZSM-5 (SAR 280) (90,6%) e MCM-41 (89,4%). O Siral 40 foi escolhido como melhor suporte para imobilização da CALB, pois possui elevada eficiência de imobilização, área específica elevada e maior volume de mesoporos. Apesar da MCM-41 também apresentar essas mesmas características, é um sólido extremamente leve, que quando entra em contato com o meio reacional sofre o processo de flotação, dificultando o procedimento experimental nas condições estudadas. Para a Siral 40 obteve-se 6,1 $mg.g^{-1}$ de lipase adsorvida após 2h de imobilização.

Pode-se observar que os suportes que obtiveram as maiores eficiências de imobilização são mais hidrofóbicos, pois possuem uma elevada razão sílica:alumina. Tem sido amplamente relatado que a lipase CALB é intensamente ativada em materiais hidrofóbicos (TALBERT e GODDARD, 2012; LASZLO e EVANS, 2007; HAN, LEE e YING, 2006; BLANCO et al., 2004) devido à grande superfície hidrofóbica existente ao redor da entrada do seu sítio ativo (UPPENBERG et al., 1994).

Blanco e colaboradores (2004) imobilizaram a lipase CALB na sílica MS-3030 (área específica de 300-320 $m^2.g^{-1}$, diâmetro médio dos poros 30-40 nm) e obtiveram uma eficiência de 48,6%. Os autores esperavam uma maior eficiência de imobilização, uma vez

que este material possui caráter hidrofóbico, devido a um elevado teor de sílica presente em sua composição.

As eficiências de imobilização obtidas empregando a Siral 40 (91,4%), HZSM-5 (SAR 280) (90,6%) e MCM-41 (89,4%) foram superiores às obtidas por Blanco et al. (2004).

Dimitriu e colaboradores (2003) imobilizaram a lipase CALB em MCM-36 (peneira molecular que apresenta caracteristicas microporosas e propriedades mesoporosas, com área externa maior do que sua precursora a MCM-22) e MCM-22 (peneira molecular microporosa). A imobilização foi conduzida durante 3 h, a temperatura ambiente, em pH 7, e os autores obtiveram 20 e 4 $mg.g^{-1}$ de lipase adsorvida para os suportes MCM-22 e MCM-36, respectivamente. Considerando que a CALB possui diâmetro esférico médio de 39,2 Å, a superfície ocupada pelas moléculas da lipase é 19,17 $m^2.g^{-1}$, portanto, 78% da área específica externa da MCM-22 foi coberta por lipase. No caso do MCM-36, se levarmos em conta que sua superfície é 1,5 vezes maior que a da zeólita MCM-22, e que apenas 4 $mg.g^{-1}$ de lipase adsorvida foi retida, a carga máxima de enzima ficou longe da capacidade máxima.

No processo de imobilização da preparação enzimática Palatase 20000L, pode-se observar na Figura 40b que os suportes que permitiram a obtenção das maiores eficiências de imobilização foram Siral 20 (97,6%), HZSM-5 (SAR 25) (77,1%) e HZSM-5 (SAR 280) (62,7%). A Siral 20 foi escolhida como suporte para imobilização desta preparação, devido à maior eficiência de imobilização.

O emprego das zeólitas HZSM-5 com diferentes SAR (25 e 280) apresentou eficiências de imobilização superiores a 60%, este comportamento pode estar associado ao elevado número de grupos silanol (≡SiOH) presentes na superfície externa destes materiais, uma vez que estes grupos permitem que a lipase seja adsorvida em sua conformação aberta (DEREWENDA, DEREWENDA e DODSON, 1992).

Macario e colaboradores (2007) observaram que durante o processo de imobilização da lipase Palatase 20000L (lipase de *Rhizomucor miehei*) pode ocorrer uma interação entre o aminoácido básico presente na tampa da lipase (Arginina) e os grupos silanol ácidos do suporte (Silicalita-1 sintetizada em meio alcalino e a zeólita delaminada ITQ-2). Estas interações permitem a abertura da tampa, possibilitando a ativação do sítio catalítico.

A imobilização da preparação enzimática Palatase 20000L (lipase de *Rhizomucor miehei*) em MCM-41 foi avaliada por Macario et al. (2005) que empregou uma temperatura de 0°C, pH 7 e após 24 h obteve uma eficiência de 41%. Em outro estudo Macario e colaboradores (2008) utilizaram uma MCM-41 com alta densidade de grupos silanol denominada de Si-MCM-41, e obteve a mesma eficiência de imobilização (41%). Na presente

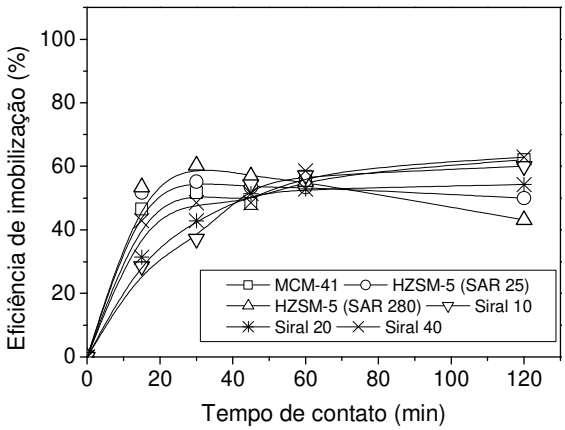
tese obteve-se uma eficiência de imobilização de 45% com a MCM-41, empregando temperatura ambiente (25°C) e um menor tempo de imobilização (2 h).

As maiores eficiências de imobilização da lipase comercial Lipolase 100L foram obtidas quando os suportes Siral 20 (99,9%), Siral 40 (99,9%) e MCM-41 (93,5%) foram empregados. O suporte escolhido para imobilização desta enzima foi a Siral 40, uma vez que esse suporte possui maior razão SiO_2/Al_2O_3, logo apresentará um número maior de grupos silanol (≡SiOH) em sua superfície, maior volume de mesoporos e é mais hidrofóbico que Siral 20. A quantidade de proteína adsorvida pela Siral 40 foi de 22,56 mg de proteína. g^{-1} de suporte.

Vasconcellos e colaboradores (2015) obtiveram uma eficiência de 98,5% na imobilização da lipase Lipolase 100L em uma nanozeólita obtida a partir de uma zeólita NaX que sofreu um processo de troca iônica durante 16 h empregando uma solução 0,5M de $CoSO_4$, denominada de Nano-X/Co/0,5M.

Na Figura 41 são apresentados os resultados obtidos para a imobilização da lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.

Figura 41- Efeito do tipo de suporte na eficiência de imobilização da lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, empregando 10 mL da solução enzimática (diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0) com 1g de suporte, a temperatura ambiente (25±1ºC).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Os suportes que permitiram a obtenção das maiores eficiências de imobilização foram Siral 40 (62,9%), MCM-41 (62,1%) e Siral 10 (60%). A Siral 40 foi escolhida como suporte para imobilização desta preparação, pois apresenta um número maior de grupos silanol (≡SiOH) em sua superfície e possui o maior caráter hidrofóbico. A quantidade de proteína adsorvida foi de 0,8 $mg.g^{-1}$ após 2 h.

Lin e colaboradores (2014) imobilizaram a lipase de *Yarrowia lipolytica* em MCM-41 funcionalizada com ferro, empregando materiais com diferentes diâmetros de poro, durante 20 h, a 25°C e pH 6,5. A maior quantidade de proteína adsorvida (23,48 $mg.g^{-1}$) foi alcançada utilizando a MCM-41 com diâmetro de poro 4,27 nm. A quantidade alcançada nesta tese foi bem inferior cerca de 0,8 $mg.g^{-1}$ de proteína adsorvida, após 2 h.

A seguir serão apresentados dois parâmetros de imobilização que foram calculados para os suportes escolhidos para a imobilização das preparações enzimáticas comerciais CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L e lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.

3.4.1.1 Rendimento de imobilização

O rendimento de imobilização foi calculado a partir da atividade hidrolítica antes e depois da imobilização segundo o item 2.2.8. O rendimento de imobilização para a imobilização das preparações enzimáticas CALB, Lipolase 100L e *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em Siral 40 e para a lipase Palatase 20000L em Siral 20 estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 – Rendimento de imobilização para os melhores suportes em 120 min

Lipase	**Suporte**	**Rendimento de imobilização (%)**
CALB	Siral 40	81,2
Palatase 20000L	Siral 20	93,3
Lipolase 100L	Siral 40	98,2
Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682	Siral 40	65,7

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

O maior rendimento de imobilização (98,2%) foi obtido na imobilização da Lipolase 100L em Siral 40. Cabe ressaltar que o rendimento da imobilização da lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em Siral 40 foi superior a 60%, apesar desta lipase possuir o menor teor de proteínas entre as preparações enzimáticas testadas.

3.4.1.2 Atividade retida

A atividade retida no biocatalisador após a imobilização considerando a atividade hidrolítica foi calculada segundo o item 2.2.9. As atividades retidas para as preparações enzimáticas CALB, Lipolase 100L e *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 imobilizadas em Siral 40 e para a lipase Palatase 20000L imobilizada em Siral 20. São apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19 – Atividades retidas para as lipases imobilizadas nos melhores suportes

Lipase	**Suporte**	**Atividade retida (%)**
CALB	Siral 40	16,6
Palatase 20000L	Siral 20	10,3
Lipolase 100L	Siral 40	8,5
Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682	Siral 40	33,8

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

A lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 imobilizada em Siral 40 apresentou a maior atividade retida (33,8%). Entre as lipases comerciais a maior atividade retida foi alcançada pela preparação enzimática CALB imobilizada em Siral 40, sendo esta de 16,6%.

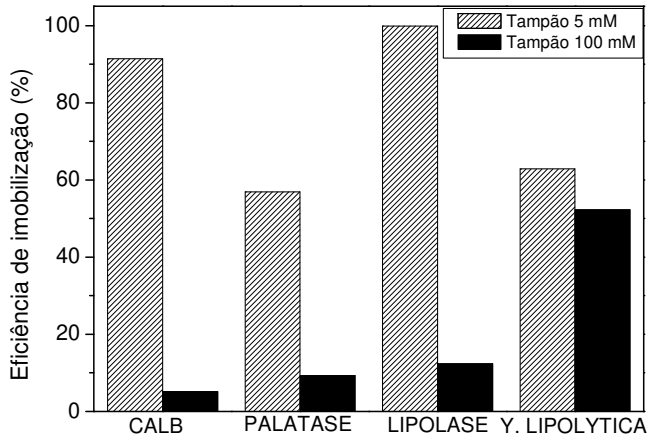
3.4.2 Efeito da concentração e do pH da solução tampão fosfato empregada na imobilização

As soluções tampão utilizada nas imobilizações apresentam um papel fundamental para o sucesso do processo de adsorção. É necessário o uso de um tampão próprio para a enzima que se deseja imobilizar e também um estudo da força iônica desta solução. As lipases podem ser adsorvidas em suportes hidrofóbicos. Quando a força iônica é baixa (tampão fosfato de sódio 5-25 mM), a adsorção envolve as regiões hidrofóbicas em torno do sítio ativo, estabilizando a lipase em sua conformação aberta (FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1998). Quando uma força iônica elevada é empregada pode ocorrer uma interação mais forte entre a enzima e o suporte, o que pode dificultar o acesso ao sítio ativo da enzima, assim a entrada do substrato no sítio ativo da enzima será prejudicada o que ocasiona em um aumento dos impedimentos estéricos.

O tampão mais utilizado na imobilização de lipases é o tampão fosfato de sódio a 10 e 25 mM (PALOMO et al., 2005). O uso de soluções tampão diluídas, com valores baixos de força iônica, é mais indicado para o processo de imobilização, colaborando para a melhor interação enzima-suporte. Porém, considerando a alteração de pH da solução enzimática durante o processo de imobilização causada pelo material testado, investigou-se o uso de solução tampão mais concentrada (100 mM) a fim de tamponar eficientemente o meio. Com o uso desse tampão, o pH do meio ao final da imobilização foi mantido em torno de 7. Entretanto, vários trabalhos encontrados na literatura reportam o uso de tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7 para imobilização das lipases CALB, Palatase e Lipolase (MENDES, 2009; BASSI et al., 2016; LAGE et al.; 2016; RIOS, 2016).

Os resultados obtidos nesses experimentos de imobilização empregando tampão fosfato de sódio pH 7 (5 mM e 100 mM), conduzidos com o melhor suporte determinado nos experimentos anteriores, estão apresentados na Figura 42.

Figura 42 - Efeito da concentração do tampão fosfato pH 7 (5mM e 100 mM) na eficiência de imobilização das lipases comerciais líquidas (CALB; Palatase 20000L e Lipolase 100L) e lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, empregando 10 mL da solução enzimática (diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio pH 7,0) com 1g de Siral 40, a temperatura ambiente (25±1ºC), após 120 min



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

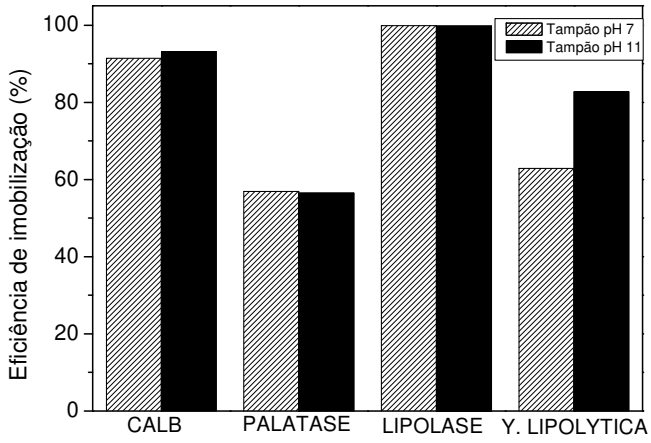
Pode-se verificar que o aumento na concentração do tampão provocou uma queda drástica nas eficiências de imobilização para as preparações enzimáticas comerciais CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L, sendo estas de 5,2; 9,3; e 12,3%, respectivamente. Já para a lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 houve uma ligeira queda na eficiência de imobilização. A redução na eficiência de imobilização das lipases testadas pode estar

associada ao aumento da concentração salina do tampão, que pode provocar o rompimento das interações iônicas entre a molécula de enzima e o suporte (BORNSCHEUER et al., 2002).

Como o aumento na concentração do tampão ocasionou uma redução drástica nas eficiências de imobilização para as lipases comerciais líquidas, foi avaliado o emprego do tampão fosfato de sódio 5 mM com um pH mais elevado (pH 11) a fim de diminuir a queda no pH provocada pelos suportes empregados (sirais 20 e 40), que são materiais ligeiramente ácidos, visando maximizar a quantidade de proteína adsorvida ao suporte. O uso do tampão fosfato de sódio 5 mM pH 11 manteve o pH final em 8,01 para os suportes testados (Siral 20 e 40).

Os resultados do efeito do pH da solução do tampão fosfato 5 mM são apresentados na Figura 43.

Figura 43- Efeito do pH da solução do tampão fosfato 5 mM (pH 7 ou 11) na eficiência de imobilização das lipases comerciais líquidas (CALB; Palatase 20000L e Lipolase 100L) e lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, empregando 10 mL da solução enzimática (diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio) com 1g de Siral 40, a temperatura ambiente (25±1ºC), após 120 min



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

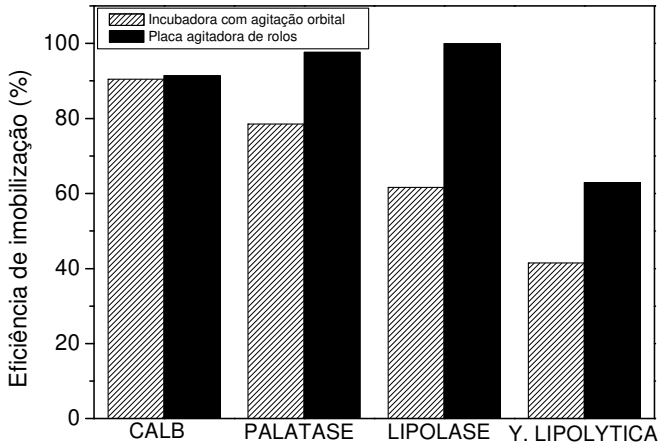
Observa-se que o aumento no pH da solução tampão empregada na imobilização não alterou a eficiência de imobilização para as lipases comerciais. Para a lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, o aumento no pH do tampão promoveu um aumento na eficiência de imobilização de cerca de 31%.

3.4.3 Efeito do tipo de sistema reacional empregado na imobilização

Até agora o processo de imobilização foi conduzido em placa agitadora de rolos. Sabe-se que a adsorção física das enzimas a um suporte sólido é realizada a partir de interações fracas, portanto, a intensidade de agitação pode influenciar a eficiência do processo de imobilização e elevadas eficiências poderão ser obtidas com agitações suaves (MENDES et al., 2011b; ROBLES-MEDINA et al., 2009).

Este efeito foi observado em experimentos preliminares, conduzidos em reator batelada de 50 mL, com agitação magnética, que resultaram em eficiências de imobilização, das lipases comerciais, menores do que 20%. Assim, para estudar os efeitos do tipo de agitação durante a imobilização da enzima, foram avaliados dois sistemas reacionais: placa agitadora de rolos, com agitação de 36 rpm, e incubadora com agitação orbital, com agitação de 85 rpm. Nesses experimentos foram empregados como suportes o Siral 40 para CALB, Lipolase 100L e, para a lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, e Siral 20, para a Palatase 20000L. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 44.

Figura 44- Efeito do tipo de agitação na eficiência de imobilização das lipases comerciais líquidas (CALB; Palatase 20000L e Lipolase 100L) e da lipase de *Yarrowia lipolytica*, empregando 10 mL da solução enzimática (diluída de 1:10 em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0) com 1g de suporte, após 120 min



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

As melhores eficiências de imobilização obtidas utilizando a placa agitadora de rolos, cujos valores são 91,4; 97,6; 99,9 e 62,9% para as lipases comerciais CALB, Palatase 20000L, Lipolase 100L e para a lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682,

respectivamente. Já quando a incubadora com agitação orbital foi empregada, para as preparações enzimáticas comerciais CALB, Palatase 20000L, Lipolase 100L e para a lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 imobilizada, as eficiências alcançadas foram de 90,4; 78,5; 61,6 e 41,5%. Pode-se verificar que os maiores valores de eficiência de imobilização foram obtidos quando a placa agitadora de rolos foi empregada, uma vez que este sistema possui menor intensidade de agitação. O agitador de rolos propicia uma agitação suave e adequada para a imobilização.

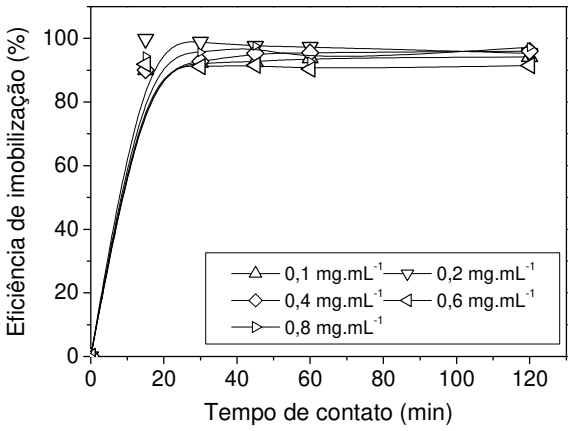
3.4.4 Efeito da concentração de proteína da preparação enzimática empregada na imobilização

O efeito da concentração da preparação enzimática na eficiência de imobilização para os suportes escolhidos também foi estudado. Em todos os experimentos foi mantida a relação de 1 g de suporte para 10 mL da solução enzimática diluída em tampão fosfato 5 mM pH 7. Os resultados são apresentados na Figura 45.

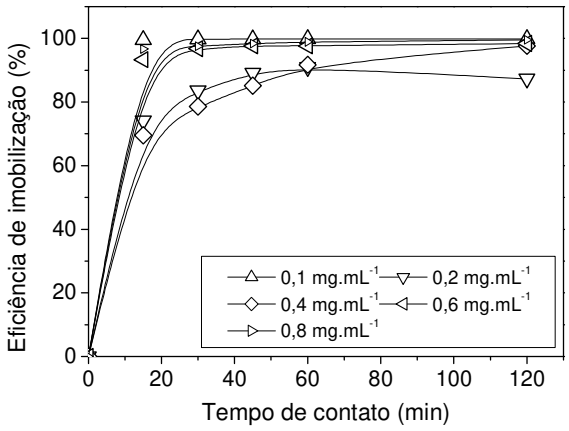
Esperava-se que a eficiência de imobilização aumentasse até certo ponto e depois estagnasse independente do aumento da concentração de lipase no meio, devido à questão da saturação. Contudo, pode-se verificar que, para as lipases CALB (Figura 45a) e Lipolase 100L (Figura 45c), independentemente da concentração de enzima oferecida ao suporte, a eficiência de imobilização foi elevada (>95%).

Blanco e colaboradores (2004) observaram que toda proteína presente na preparação enzimática CALB (lipase de *Candida antarctica*), oferecida ao suporte (sílica MS-3030), era rapidamente imobilizada. Apesar desta lipase possuir uma pequena tampa, não ocorreu o fenômeno de hiperativação. Desse modo a imobilização provavelmente foi conduzida através de uma região hidrofóbica da enzima. Assim, de acordo com os autores, toda a proteína oferecida é rapidamente ligada ao suporte hidrofóbico em um meio com baixa força iônica. Por outro lado, as lipases tendem a formar agregados pela interação entre áreas hidrofóbicas de diferentes moléculas de enzima. Porém, se as áreas da enzima estão ligadas ao suporte, as probabilidades de agregação são diminuídas, possibilitando a imobilização em monocamadas para alta carga enzimática, de modo que a imobilização em multicamadas só ocorreria, de acordo com os autores, com quantidades de lipase acima de 200 $mg.g^{-1}$.

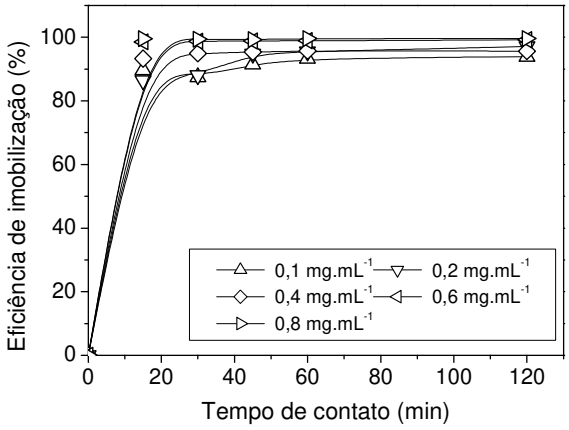
Figura 45 - Efeito da concentração de proteína na imobilização das lipases comerciais líquidas ([a] CALB; [b] Palatase 20000L e [c] Lipolase 100L), empregando 10 mL da solução enzimática (diluída em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0) com 1g de suporte (Siral 40 (para as lipases CALB e Lipolase 100L) e Siral 20 (para a Palatase 20000L)), a temperatura ambiente (25±1ºC)



a) CALB



b) Palatase 20000L



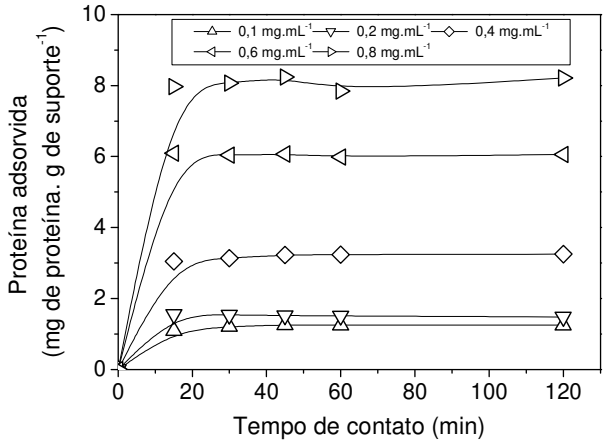
c) Lipolase 100L

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

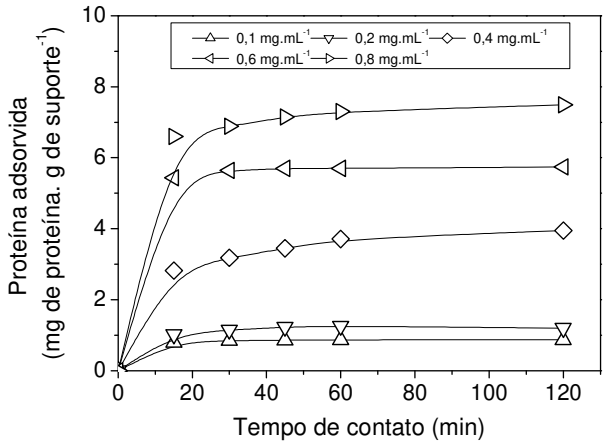
A quantidade de proteína adsorvida pelo suporte quando diferentes concentrações de proteína são empregadas está apresentada na Figura 46.

Foi possível notar que os suportes Siral 20 e Siral 40 alcançaram a carga máxima de proteína adsorvida no início do processo de imobilização e esta se manteve praticamente constante até o final do processo, independente da concentração de proteína fornecida.

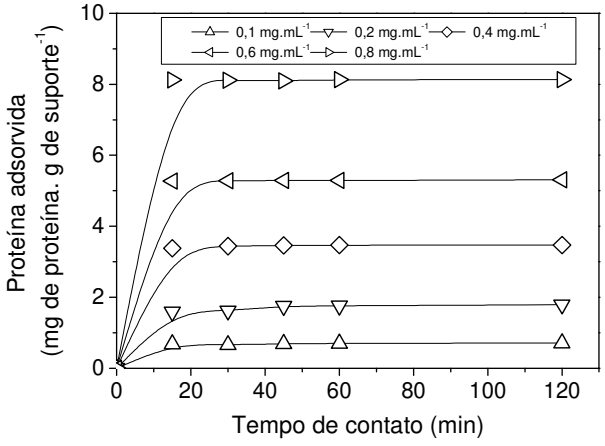
Figura 46 - Quantidade de proteína adsorvida pelo suporte na imobilização das lipases comerciais líquidas ([a] CALB; [b] Palatase 20000L e [c] Lipolase 100L), empregando 10 mL da solução enzimática (diluída em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0) com 1g de suporte (Siral 40 (para as lipases CALB e Lipolase 100L) e Siral 20 (para a Palatase 20000L)), a temperatura ambiente (25±1ºC)



a) CALB



b) Palatase 20000L



c) Lipolase 100L

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

3.5 Reações de síntese de oleato de etila empregando as preparações enzimáticas imobilizadas

A fim de investigar se a imobilização conferiu melhoria nas propriedades das lipases, foram avaliados, então, os efeitos da temperatura, da concentração enzimática e do reuso do biocatalisador imobilizado na reação modelo de esterificação do ácido oleico com o etanol.

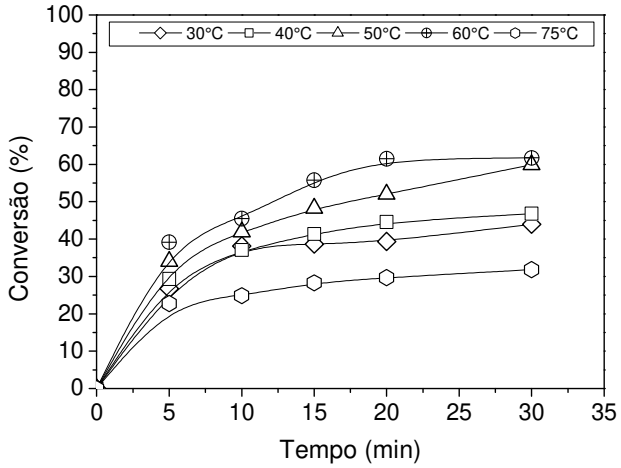
3.5.1 Efeito da temperatura

Nas Figuras 47, 48 e 49 estão apresentados os resultados do efeito da temperatura nas reações de esterificação do ácido oleico com etanol empregando as enzimas comerciais imobilizadas nos suportes da família Siral escolhidos pelos ensaios anteriores. Foi possível observar, pelos resultados ilustrados, o aumento na estabilidade térmica utilizando os biocatalisadores heterogêneos.

A imobilização da CALB em Siral 40 resultou em um produto mais estável termicamente. A taxa reacional aumentou até a temperatura de 60°C. A temperatura ótima da lipase passou de 40°C para 60°C. Cabe ressaltar que na reação com a CALB imobilizada em Siral 40, uma maior quantidade de proteína foi oferecida ao meio reacional, já que com o teor de 20% $m.m^{-1}$ há 7,03 mg de proteína, enquanto que na reação com a lipase em sua forma livre, para o teor de 10% $v.v^{-1}$, a quantidade de proteína foi de 3,53 mg.

Essa maior estabilidade pode estar relacionada com uma interação mais forte entre a enzima e o suporte, promovendo uma redução na mobilidade da estrutura terciária da lipase, protegendo-a dos efeitos desnaturantes que podem ser causados tanto pela temperatura, quanto pelo contato com o meio reacional. Assim, de acordo com os resultados apresentados na Figura 47, a CALB imobilizada em Siral 40 é mais termoestável do que a lipase em sua forma líquida, o que é desejável, pois aumenta a viabilidade econômica dos processos de biotransformação.

Figura 47 – Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 20% $m.m^{-1}$ da lipase CALB imobilizada em Siral 40

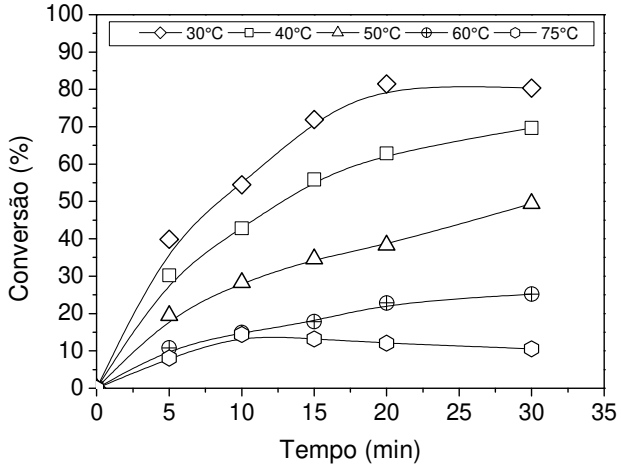


Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Ma e colaboradores (2016) também observaram que a lipase CALB imobilizada em sílica modificada com epóxi exibiu maior atividade que a CALB em sua forma livre, na faixa de 0-60°C.

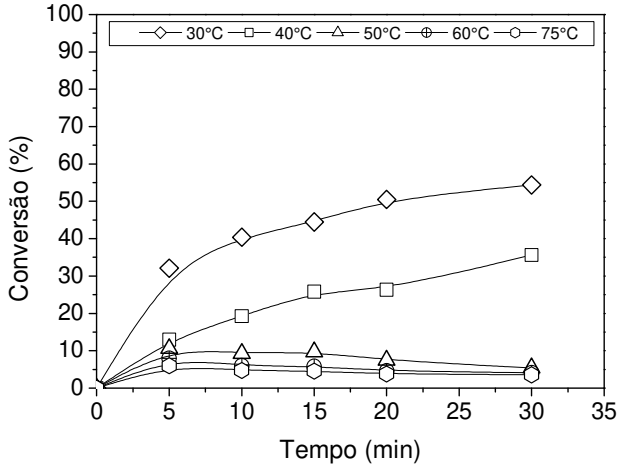
Para a Palatase 20000L imobilizada em Siral 20, no entanto, a temperatura ótima continuou sendo 30ºC. Pode-se notar que a taxa inicial de reação decresceu linearmente com o aumento da temperatura até 60ºC. Apesar da temperatura de máxima conversão não ter aumentado, o valor da conversão máxima foi maior nas reações conduzidas com as enzimas imobilizadas. As conversões obtidas foram de 80,3; 69,7; 49,5; 25,2 e 10,5% para as temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 75°C, respectivamente. Já para a lipase em sua forma aquosa a maior conversão obtida a 40°C não passou de 64,4 %. A 75°C, a enzima líquida já havia perdido sua atividade.

Figura 48 – Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 20% m.m^{-1} da lipase Palatase 20000L imobilizada em Siral 20



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Figura 49 – Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 20% m.m^{-1} da lipase Lipolase 100L imobilizada em Siral 40



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

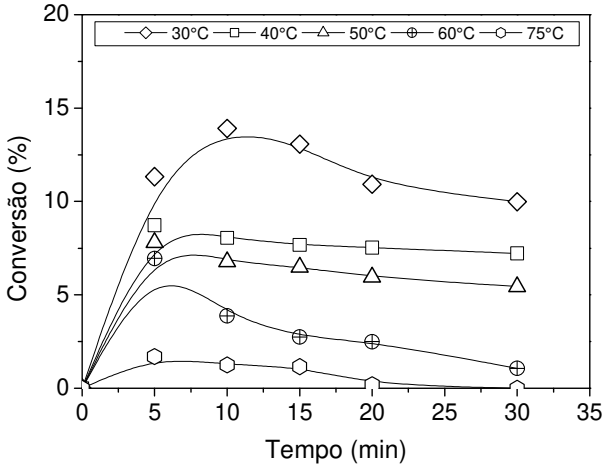
Para a Lipolase 100L imobilizada em Siral 40, a temperatura ótima permaneceu 30ºC. A taxa inicial de reação decresceu abruptamente, com o aumento da temperatura de 30 para 40°C, após esse intervalo manteve-se praticamente constante até 75°C. O valor da conversão máxima também foi superior nas reações empregando a enzima imobilizada, mas, uma quantidade elevada de proteína foi oferecida ao meio reacional, já que foi utilizado o teor de 20% m.m^{-1} que possuía 30,2 mg de proteína. Já na reação com a lipase em sua forma livre, para o teor empregado de 10% v.v^{-1}, existia 15,3 mg de proteína.

Comparando os resultados obtidos pelo presente trabalho com o de Martins e colaboradores (2013) que empregaram a lipase Lipolase 100L (lipase de *Thermomyces lanuginosus*) imobilizada em estireno-divinilbenzeno na a síntese de butirato de etila. Não foi possível observar um aumento linear na taxa de reação com o aumento da temperatura para a lipase de Lipolase 100L imobilizada em Siral 40. Já para a Lipozyme TL-IM, os autores observaram um aumento linear na taxa de reação com o aumento da temperatura até 50°C, diminuindo em temperaturas mais altas. Já para a para a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em estireno divinilbenzeno, houve um aumento na atividade com o aumento da temperatura de 30 para 40°C, e manteve-se inalterada para incrementos adicionais de temperatura.

Diferentemente, do que ocorreu com a Lipolase 100L (lipase de *Thermomyces lanuginosus*) imobilizada em partículas de poli metacrilato para a síntese de oleato de isoamila a partir da esterificação do ácido oleico com o álcool isoamílico estudada por Lage et al. (2016). Onde o aumento da temperatura até 45°C possibilitou um aumento na taxa de síntese do éster, este resultado sinalizou que o aumento da temperatura melhorou o acesso das moléculas de reagentes ao microambiente do biocatalisador. O aumento na temperatura superior a 30°C para a lipase Lipolase 100L imobilizada em Siral 40 não ocasionou em um incremento na reação, provavelmente devido à inativação de algumas moléculas da enzima.

Na Figura 50 são apresentados os resultados do efeito da temperatura nas reações de esterificação do ácido oleico com etanol empregando a preparação enzimática de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 imobilizada na Siral 40 em pH 7.

Figura 50 – Avaliação da temperatura (30, 40, 50, 60 e 75°C) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes e 20% $m.m^{-1}$ da lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 imobilizada em Siral 40



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Pode-se observar que a imobilização da preparação enzimática de *Yarrowia lipolytica* IMFRJ 50682 na Siral 40 conferiu um aumento na estabilidade térmica da preparação quando esta foi submetida a uma elevação de temperatura, quando comparada com sua forma livre. Contudo, a temperatura ótima para a condução da reação de esterificação permaneceu 30°C. A taxa inicial de reação decresceu linearmente com o aumento da temperatura.

A notável melhora da estabilidade térmica por imobilização pode ser decorrente de uma conformação favorável da enzima após a sua adsorção ao suporte (CUI et al., 2013; YAN, ZHANG e CHEN, 2013), o que pode impedir as alterações na estrutura que podem ser causadas pela desnaturação térmica (CUI et al., 2013; YAN, ZHANG e CHEN, 2013).

A imobilização da lipase de *Yarrowia lipolytica* na MCM-41 funcionalizada com ferro, com diâmetros de poro de 3,5; 3,78; 4,04; 4,27; 4,47 e 4,81 nm foi avaliada por Lin et al. (2014). Assim como no presente estudo foi possível observar que a imobilização da lipase conferiu uma melhora em seu desempenho, quando comparada a lipase em sua forma livre. A lipase de *Yarrowia lipolytica* imobilizada em MCM-41 funcionalizada com ferro com diâmetro de poro de 4,27 nm foi melhor do que a enzima em sua forma livre.

Assim como no presente trabalho, onde a imobilização da preparação enzimática de *Yarrowia lipolytica* IMFRJ 50682 na Siral 40 conferiu um aumento na estabilidade térmica da preparação. Li e colaboradores (2015) também observaram um aumento na temperatura ótima da reação de síntese do oleato de etila para 40°C quando foi utilizada a lipase de *Yarrowia lipolytica* imobilizada em tecido de viscose, a temperatura ótima para lipase em sua forma

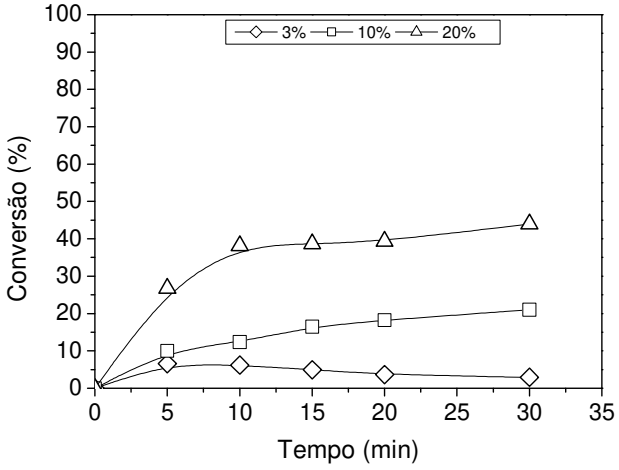
livre era 30-35°C. Os mesmos resultados foram observados quando a lipase foi imobilizada em fibra de seda (CHEN et al., 2012).

A estabilidade térmica da lipase de *Yarrowia lipolytica* na sua forma livre e imobilizada em nanopartículas magnéticas foi investigada por Akil e colaboradores (2016). A imobilização nesse caso também conferiu um aumento na estabilidade térmica da enzima, como o que ocorreu no presente trabalho. A imobilização aumentou a rigidez estrutural e previniu o desenovelamento da enzima quando exposta a altas temperaturas. A lipase imobilizada reteve mais de 90% de sua atividade inicial, após 4 h de incubação a 20-50°C. Na temperatura de 60°C a atividade foi retida por 1 h. Já para a lipase livre, quando incubada a 20-30°C por 4 h, manteve mais de 80% da sua atividade inicial, porém a 50°C, reteve 70% da atividade inicial, após 1 h de incubação. Na temperatura de 60°C houve uma redução de atividade de quase 60% após 2 h de incubação.

3.5.2 Efeito da concentração enzimática

Os efeitos da concentração enzimática na síntese de oleato de etila empregando as lipases comerciais CALB e Lipolase 100L imobilizadas em Siral 40, Palatase 20000L imobilizada em Siral 20 e a lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 imobilizada em Siral 40 foram avaliados empregando os teores de 3, 10 e 20% $m.m^{-1}$. Os resultados estão apresentados nas Figuras 51 a 53.

Figura 51 – Avaliação da concentração enzimática (3, 10 e 20% m.m^{-1}) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30ºC e a lipase CALB imobilizada em Siral 40



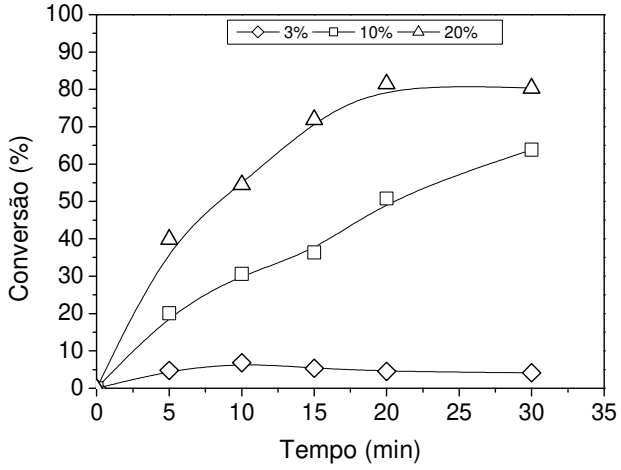
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Para a lipase CALB imobilizada em Siral 40 (Figura 51) foi possível observar um aumento na taxa de esterificação, com o aumento da concentração de enzima na faixa estudada, com 20% m.m^{-1}, a conversão foi de 40%.

Diferentemente do que era esperado, o desempenho da CALB imobilizada em Siral 40 foi inferior ao apresentado pela preparação em sua forma livre (conversão de 62%).

Quando a preparação enzimática Palatase 20000L imobilizada em Siral 20 (Figura 52) foi empregada, observou-se um aumento linear na taxa de reação com o aumento da concentração de biocatalisador. A maior conversão (80,3%), dentre todas as lipases testadas, foi alcançada empregando 20% m.m^{-1} deste biocatalisador imobilizado. A enzima imobilizada mostrou desempenho superior ao apresentado pela enzima em sua forma livre.

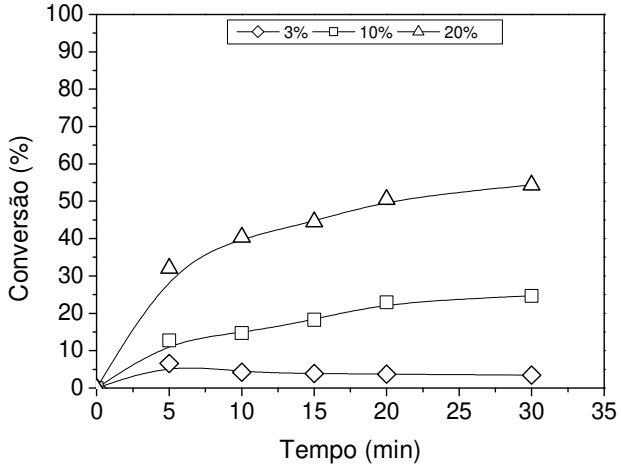
Figura 52 – Avaliação da concentração enzimática (3, 10 e 20% m.m^{-1}) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30ºC e a lipase Palatase 20000L imobilizada em Siral 20



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

O desempenho da Lipolase imobilizada na Siral 40 (Figura 53) foi ligeiramente superior ao da preparação enzimática em sua forma livre. Um aumento na taxa inicial de esterificação foi também verificado com o incremento na concentração enzimática na faixa estudada.

Figura 53 – Avaliação da concentração enzimática (3, 10 e 20% m.m^{-1}) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30ºC e a lipase Lipolase 100L imobilizada em Siral 40



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

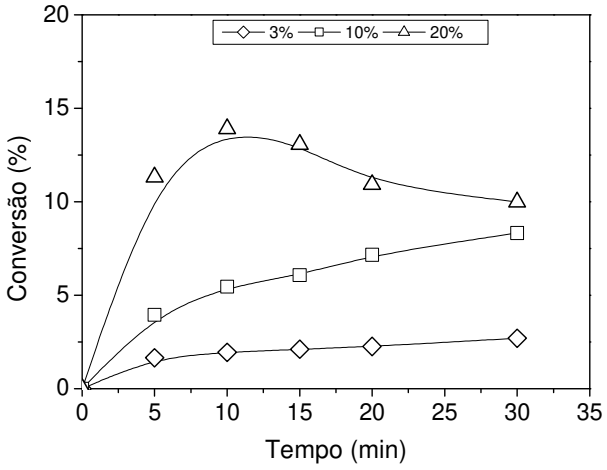
Assim como o presente trabalho observou um aumento na taxa inicial com o incremento do teor de enzima na reação na síntese de oleato de etila. Martins e colaboradores

(2013) também observaram que as taxas iniciais de reação aumentaram linearmente com o aumento na concentração de 3% para 10% $m.m^{-1}$ quando a lipase Lipolase 100L (lipase de *Thermomyces lanuginosus*) imobilizada em estireno-divinilbenzeno foi utilizada na síntese de butirato de etila.

Lage e colaboradores 2016 empregaram a lipase Lipolase 100L (lipase de *Thermomyces lanuginosus*) imobilizada em partículas de polimetacrilato na síntese de oleato de isoamila, a partir da esterificação do ácido oleico com o álcool isoamílico. Assim como o presente estudo, observaram também um aumento na conversão com o incremento do teor de biocatalisador. Conversões de 85% foram obtidas nas reações empregando 20 e 25% $m.v^{-1}$, após 30 min de reação. Estes resultados podem ser atribuídos à possível aglomeração do biocatalisador no meio reacional ou a falta de moléculas de substrato para acessar os sítios ativos da enzima na maior concentração (25% $m.v^{-1}$) (TODERO et al., 2015; MAHAPATRA et al., 2009).

A lipase imobilizada de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (Figura 54) mostrou-se mais eficiente na síntese de oleato de etila quando comparada a enzima em sua forma livre.

Figura 54 – Avaliação da concentração enzimática (3, 10 e 20% $m.m^{-1}$) na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 30ºC e a lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 imobilizada em Siral 40



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

O aumento da concentração de enzima ocasionou um aumento na síntese de oleato de etila quando a lipase imobilizada de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 foi empregada. O mesmo fenômeno foi observado por Meng e colaboradores (2010) utilizando uma lipase de *Yarrowia lipolytica* imobilizada em membrana de tecido, na esterificação dos ácidos graxos

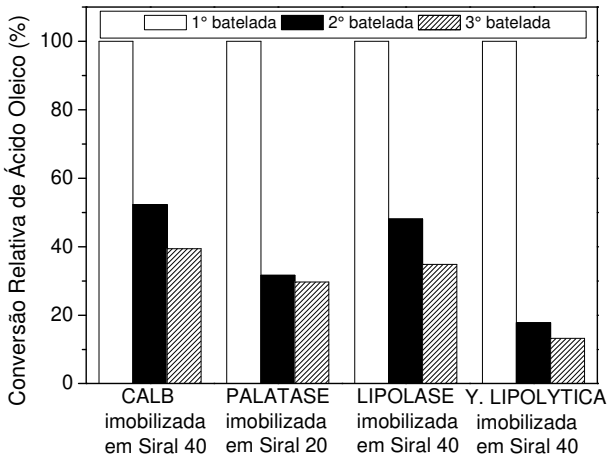
livres (obtidos a partir da hidrólise do óleo de soja) com etanol. O grau de esterificação aumentou gradualmente com o aumento da concentração de enzima.

Sendo assim, pode-se observar que o aumento na concentração enzimática promoveu um aumento na conversão e na taxa inicial nas reações de esterificação, como esperado, na faixa estudada, para todas as preparações testadas.

3.5.3 Reutilização do biocatalisador

A vantagem do emprego das preparações enzimáticas imobilizadas é que estas podem ser reutilizadas e empregadas em processos em sistema contínuo, o que pode ocasionar uma redução do custo do processo. A reutilização do biocatalisador imobilizado foi avaliada durante 3 bateladas, utilizando razão estequiométrica dos reagentes, a 30ºC, empregando 20% ($m.m^{-1}$) das preparações enzimáticas comerciais imobilizadas. Após cada batelada, o biocatalisador foi lavado com 5 mL de etanol, filtrado a vácuo por no mínimo 30 min, e mantido em dessecador na geladeira até a próxima reação. O etanol cujo coeficiente de partição (log P = -0,30) foi escolhido como solvente por ser um dos reagentes da reação estudada. Os resultados são apresentados na Figura 55.

Figura 55 – Avaliação da reutilização do biocatalisador na conversão de ácido oleico na reação de esterificação com o etanol, empregando razão molar etanol:ácido oleico = 1, 20% $m.m^{-1}$ das lipases imobilizadas CALB, Palatase 20000L, Lipolase 100L e *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, após 30 min a 30ºC



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

De acordo com os resultados observados na Figura 55, todas as preparações enzimáticas puderam ser reutilizadas. Os biocatalisadores obtidos a partir da imobilização das lipases comerciais mantiveram conversões de ácido oleico em torno de 30% após 3 bateladas. Já para a lipase imobilizada de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, a conversão obtida após seu reuso foi de cerca de 13%.

A queda na conversão não foi tão acentuada na 2ª e 3ª bateladas. A redução na conversão durante o reuso do biocatalisador pode estar associada tanto a lixiviação das lipases, que estavam adsorvidas apenas na superfície externa do suporte, quanto ao efeito do solvente de lavagem. A escolha do solvente de lavagem deve considerar alguns aspectos, como a capacidade de remoção dos reagentes e produtos adsorvidos sobre o suporte do biocatalisador e de desnaturação da enzima (AGUIEIRAS et al., 2016). Por isso, a escolha do solvente para lavagem da lipase imobilizada deve ser levada em consideração quanto aos seus efeitos na estrutura da lipase, uma vez que a atividade e a estabilidade enzimática podem variar significativamente de acordo com o solvente utilizado. O solvente também pode afetar as interações enzima-água através da remoção da camada essencial de água da enzima, além de alterar a conformação nativa da enzima através do rompimento das fracas ligações (interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio), bem como seus efeitos sobre o suporte de imobilização e sua capacidade de remover o subproduto adsorvido sobre o biocatalisador (QUEIROZ et al., 2014). Esses efeitos combinados contribuirão para o desempenho geral do biocatalisador em reutilizações sucessivas.

Solventes polares são mais hidrofílicos, por isso, provocam mais danos às enzimas, uma vez que podem distorcer a molécula de enzima ou remover a água presente na micro-camada que circunda o biocatalisador, causando sua desativação (STERGIOU et al., 2013; BEZBRADICA et al., 2007; AGUIEIRAS, SOUZA e LANGONE, 2013).

A hidrofobicidade (polaridade) dos solventes pode ser mensurada através do log P, que é definido como o logaritmo do coeficiente de partição para um sistema padrão bifásico octanol/água. As enzimas na presença de solventes hidrofílicos polares (log P < 2), em geral, apresentam baixa atividade enzimática (QUEIROZ et al., 2014; LIMA e ANGNES, 1999).

Na reação de esterificação os principais componentes do meio reacional que podem adsorver sobre o suporte são polares (ácido oleico, etanol e água), bem como o produto formado pela reação (oleato de etila) e a utilização de solventes polares seria mais indicada para a remoção desses componentes (SOARES, 2015). Contudo, as lipases podem ser inativadas por álcoois de cadeias curtas. Geralmente, o grau de inativação da enzima é inversamente proporcional ao número de átomos de carbono presentes na cadeia do álcool,

quanto menor o número de átomos de carbono na cadeia mais hidrofílico (CHEN e WU, 2003).

José e colaboradores (2011) observaram que a estrutura secundária da lipase B de *Candida antarctica* (Novozym 435) mudou após o contato com o etanol, com um aumento na contribuição na estrutura da folha β. Isso pode ser explicado, já que solventes polares podem remover a água da superfície da proteína e competir por ligações de hidrogênio entre os átomos da proteína, desnaturando a estrutura em um estado amplamente desdobrado. A estrutura da Lipozyme TL IM também foi alterada quando a enzima permaneceu em contato com o etanol. Desse modo, o emprego do etanol tanto como reagente na síntese de oleato de etila como solvente de lavagem pode ter ocasionado mudanças na estrutura das lipases testadas no presente trabalho, o que pode ter provocado a acentuada queda de conversão nas reutilizações sucessivas.

A reutilização da lipase B de *Candida antarctica* imobilizada por adsorção física em resina foi estudada por Jun e colaboradores (2013). A lipase imobilizada CALB exibiu menos de 30% de sua atividade inicial após 5 ciclos. A diminuição da atividade da lipase pode ser atribuída à lixiviação da enzima durante a etapa de lavagem com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. Desse modo, a queda na conversão após as reutilizações sucessivas pode estar associada a lixiviação da enzima do suporte durante a etapa de lavagem com etanol.

Khan, Jadhav e Rathod (2015) observaram que o emprego da lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em esferas de poliacrilato na síntese de oleato de cetila ocasionou uma pequena diminuição da atividade após três ciclos de reação e após sete ciclos de reação, o biocatalisador reteve apenas 20% da sua atividade catalítica inicial. Comparando este resultado com o obtido pelo presente estudo que utilizou a lipase CALB imobilizada em Siral 40, também foi observada uma queda não muito acentuada na conversão na 2ª e 3ª bateladas. Além disso, a conversão de ácido oleico foi mantida em torno de 30% após 3 bateladas.

Lin e colaboradores (2014) investigaram a reutilização da lipase de *Yarrowia lipolytica* imobilizada na MCM-41 funcionalizada com ferro, com diâmetros de poro 3,5; 3,78; 4,04; 4,27; 4,47 e 4,81 nm, na síntese de biodiesel. As lipases imobilizadas na MCM-41 funcionalizada com ferro, com diâmetros de poro 3,5 e 3,78 nm exibiram baixos valores na reutilização assim como a lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 imobilizada em Siral 40 avaliada no presente trabalho. Já a lipase imobilizada na MCM-41 funcionalizada com ferro com diâmetro de poro de 4,27 nm pode ser reutilizada para a produção de biodiesel por 9 ciclos, mantendo rendimento superior a 90% durante 6 ciclos. Em contraste, o rendimento

da lipase imobilizada na MCM-41 funcionalizada com ferro com diâmetro de poro de 4,04 nm foi de 50,32%, após 5 ciclos.

Miranda e colaboradores (2014) investigaram a utilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em partículas de poli-hidroxi butirato mesoporoso (PHB) na síntese de ésteres alquílicos de cadeia curta a partir de ácido oleico (metil- e oleato de etila). O biocatalisador reteve 70% de sua atividade inicial após cinco ciclos de 15 minutos de reação. O desempenho da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em Siral 40 avaliada no presente estudo foi pior, pois esta manteve a conversão de ácido oleico em torno de 30% após 3 bateladas.

A performance da Lipolase 100L (lipase de *Thermomyces lanuginosus*) imobilizada em Siral 40 foi muito abaixo da obtida pela lipase Lipolase 100L imobilizada em partículas de poli metacrilato empregada por Lage et al. (2016). Uma vez que o biocatalisador do presente trabalho só pode ser reutilizado por 3 bateladas e reteve apenas 30% da conversão enquanto a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em partículas de poli metacrilato reteve totalmente sua atividade até 22 ciclos de reação. Depois, uma pequena diminuição de sua atividade (8,6%) foi observada devido ao possível acúmulo de moléculas de água no microambiente do suporte e/ou possível inativação e dessorção de algumas moléculas de enzimas preferencialmente adsorvidas no microambiente externo das partículas de poli metacrilato (MIRANDA et al., 2014; TODERO et al., 2015; SILVA et al., 2014).

3.5.3.1 Espectroscopia no infravermelho

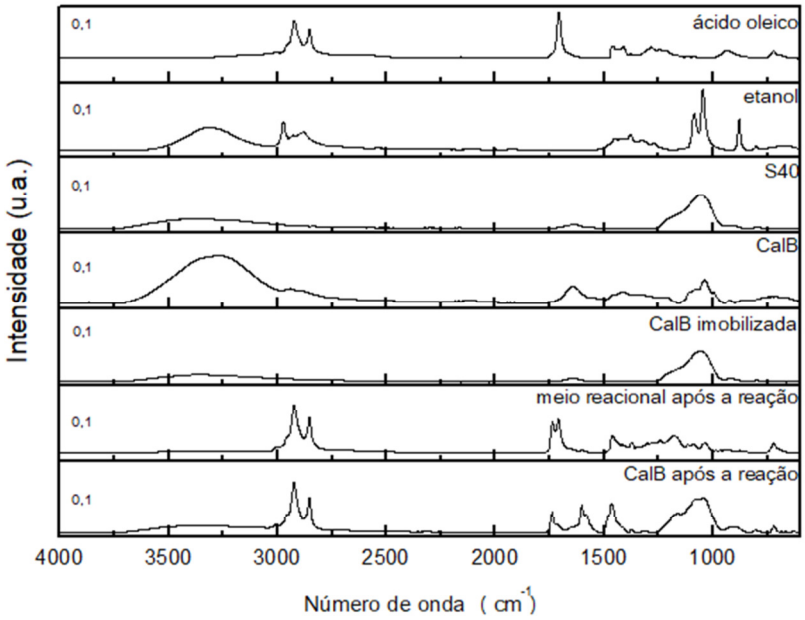
Considerando a queda na conversão com o reuso dos biocatalisadores imobilizados, foram realizadas análises de espectroscopia no infravermelho para tentar avaliar se a enzima e as substâncias químicas (reagentes e produtos) estavam adsorvidas no suporte sólido.

Os espectros de FTIR têm sido amplamente utilizados como uma ferramenta para identificar presença de certos grupos funcionais ou ligações químicas na superfície de um sólido e também da ocorrência de modificações na superfície dos materiais (LI e BAI, 2005).

As Figuras 56 a 59 mostram, para as enzimas CALB, Palatase 20000L, Lipolase 100L e *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, os espectros de FTIR para: o suporte, a enzima em sua forma livre, a enzima imobilizada, a enzima imobilizada após ser utilizada na reação de

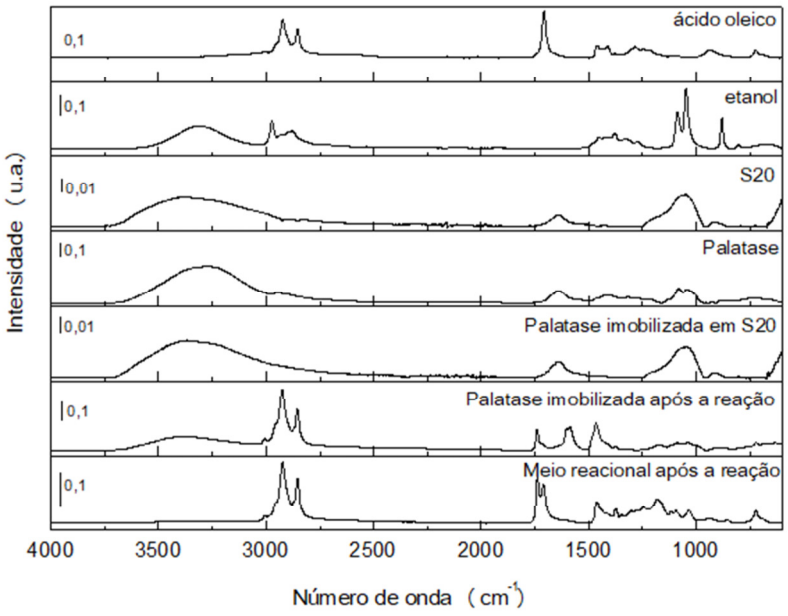
esterificação do ácido oleico com o etanol, o ácido oleico, o etanol e meio reacional após a reação. A atribuição das bandas observadas em cada espectro é apresentada na Tabela 18.

Figura 56 - Espectro FTIR do ácido oleico, do etanol, do suporte Siral 40, da lipase CALB em sua forma livre e imobilizada na Siral 40, após ser utilizada na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol e do meio reacional após a retirada da enzima imobilizada



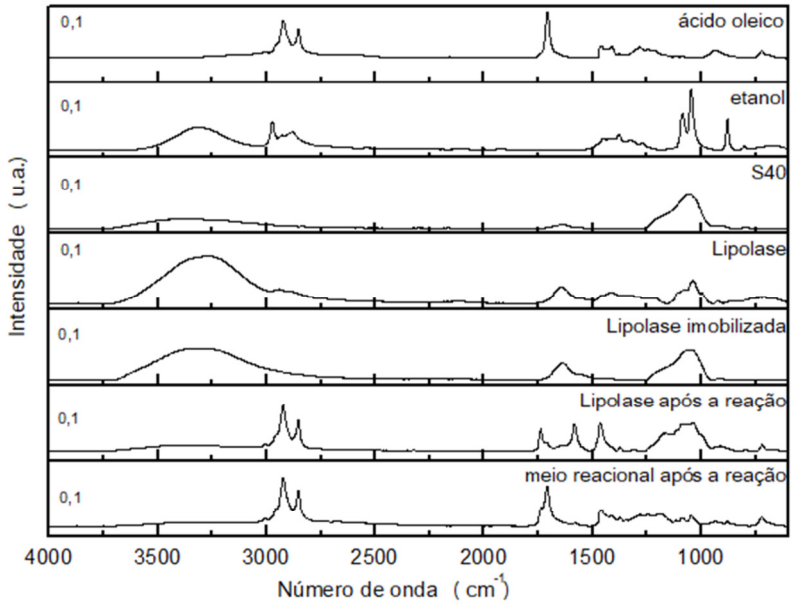
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Figura 57- Espectro FTIR do ácido oleico, do etanol, do suporte Siral 20, da lipase Palatase 20000L em sua forma livre e imobilizada na Siral 20, após ser utilizada na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanole do meio reacional após a retirada da enzima imobilizada



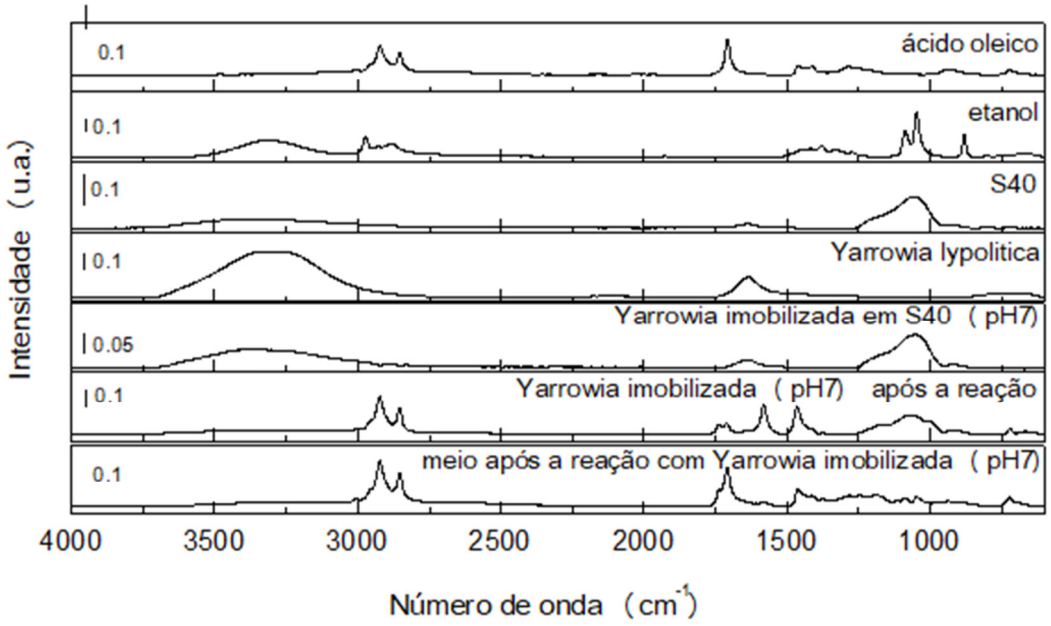
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Figura 58 - Espectro FTIR do ácido oleico, do etanol, suporte Siral 40, da lipase Lipolase 100L em sua forma livre e imobilizada na Siral 40 e após ser utilizada na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanole do meio reacional após a retirada da enzima imobilizada



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Figura 59 - Espectro FTIR do ácido oleico, do etanol, do suporte Siral 40, da lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em sua forma livre e imobilizada na Siral 40 e após ser utilizada na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanole do meio reacional após a retirada da enzima imobilizada



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Nas Figuras 56 a 59, pode ser observado que o espectro da enzima imobilizada é igual ao do suporte (Siral 20 ou Siral 40), o que sugere que não foi possível identificar a imobilização das enzimas por esta técnica.

Os resultados do presente trabalho diferem dos relatados na literatura por Foresti e colaboradores (2010) que, a partir da segunda derivada dos espectros de FTIR, obtiveram informações quantitativas sobre a contribuição relativa dos elementos estruturais que constituem a estrutura secundária da lipase (α-hélices, folhas β, dobras e estruturas não ordenadas) durante o processo de imobilização da lipase CALB em dióxido de titânio (TiO_2). A análise revelou que a conformação da lipase sofreu uma pequena mudança durante a adsorção e que a água associada à lipase pode interagir de várias maneiras com a superfície do óxido hidratado.

As alterações na estrutura da lipase de *Rhizomucor miehei* durante o processo de imobilização em suportes a base de quitosana foram investigadas por Collis, Lassalle e Ferreira (2011) empregando espectros de FTIR-ATR. Foi possível observar que a lipase sofreu pequenas alterações em sua estrutura secundária quando imobilizada em suportes a base de quitosana. No presente estudo não foi possível observar alterações na enzima a partir dos espectros de FTIR.

No caso dos espectros das enzimas imobilizadas após a reação observam-se bandas já identificadas do ácido oleico, do meio reacional e do suporte, indicando que a lavagem realizada não removeu completamente os produtos e reagentes adsorvidos, o que poderia justificar a queda na atividade observada no reuso.

Na Tabela 20 são apresentadas as atribuições das bandas observadas nos espectros do acido oleico, do etanol, do meio reacional após a reação, dos suportes Siral 20 e Siral 40 e das lipases CALB, Palatase 20000L, Lipolase 100L e *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.

Tabela 20 – Atribuições das bandas observadas nos espectros do ácido oleico, do etanol, do meio reacional após a reação, dos suportes Siral 20 e Siral 40 e das enzimas estudadas

	N° de onda (cm^{-1})	**Atribuição**	**Referência**
Ácido Oleico	2950-2800	Estiramento simétrico e assimétrico de C-H sobreposto ao estiramento O-H da carboxila	SHURVELL, 2006
	1705	Estiramento da carbonila	SHURVELL, 2006
Etanol	3300 (larga)	Estiramento do grupo OH	SHURVELL, 2006
	2950-2800	Estiramento simétrico e assimétrico de C-H	SHURVELL, 2006
	1050	Estiramento C-O álcool primário	SHURVELL, 2006
Meio reacional após a reação	2950-2800	Estiramento simétrico e assimétrico de C-H sobreposto ao estiramento O-H da carboxila	SHURVELL, 2006
	1750-1740	Estiramento da carbonila presente nos ésteres	SHURVELL, 2006
	1710-1690	Estiramento da carboxila presente nos ácidos carboxílicos	SHURVELL, 2006
	1475-1450	Deformação angular do CH de carbono saturado	SHURVELL, 2006
	1050	Estiramento CO de álcool primário	SHURVELL, 2006
Siral 20 e Siral 40	3750 – 3000	Estiramento dos grupos OH	SHURVELL, 2006
	1100-1000	Estiramento do Si-O-Si	SHURVELL, 2006
	1100-800	Estiramento Si-O	SHURVELL, 2006
CALB, Palatase 20000L, Lipolase 100 e *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682	3600-2900	Estiramento do OH da carboxila sobreposto ao estiramento –NH das amidas e aminas	VAN DE WEERT et al., 2001; BARTH e ZSCHERP, 2002; BARTH, 2007
	1700-1600	Estiramento do peptídeo do grupo carbonila presente na proteína (Banda da Amida I)	HARIS e SEVERCAN, 1999; VAN DE WEERT et al., 2001; BARTH e ZSCHERP, 2002; BARTH, 2007
	1400-1200	Estiramento do NH com CN, com uma pequena contribuição do estiramento do CO e CC	FABIAN e MANTELE, 2002; NOINVILLE et al., 2002 BARTH, 2007; KONG e YU, 2007;

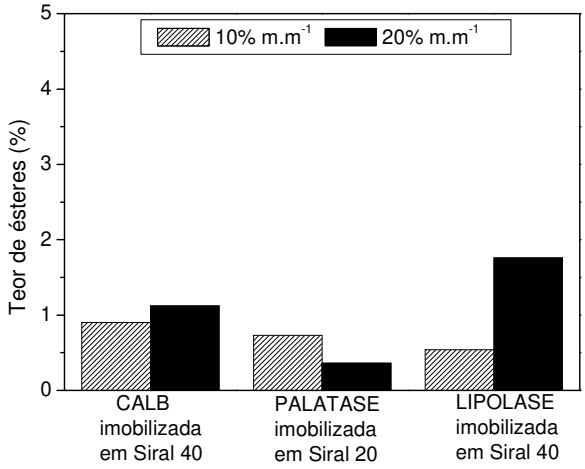
Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

3.6 Reações de transesterificação empregando as preparações enzimáticas imobilizadas

A fim de avaliar se a imobilização das preparações enzimáticas comerciais CALB e Lipolase em Siral 40 e Palatase 20000L em Siral 20 conferiu uma melhora no seu desempenho nas reações de transesterificação, a reação de transesterificação do óleo de soja

foi realizada, estudando o efeito da concentração enzimática (10 e 20% m.v^{-1}). Os resultados são apresentados na Figura 60.

Figura 60 - Efeito da concentração enzimática na reação de transesterificação do óleo de soja com o etanol, empregando razão molar óleo de soja: etanol 1:3, adição escalonada do etanol (1/3 do volume total adicionado nos tempos 0, 0,5 e 1 h, a 30°C, e as lipases CALB imobilizada em Siral 40; Palatase 20000 L imobilizada em Siral 20 e Lipolase 100L imobilizada em Siral 40



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

O teor de biodiesel obtido com os biocatalisadores enzimáticos foi menor do que 2% m.m^{-1}. Cabe ressaltar, que a quantidade de proteína presente no biocatalisador imobilizado foi bem maior do que a presente no catalisador em sua forma livre. As quantidades de proteína em mg para os teores de 10% m.m^{-1} para as preparações imobilizadas CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L foram de: 4,96; 3,46 e 19,15, respectivamente.

Para as lipases líquidas Palatase 20000L e Lipolase 100L, a concentração usada nas reações com as maiores conversões foi de 10% v.v^{-1}, que equivale a 4,48 e 31,43 mg de proteína, respectivamente. Para a CALB, independente do teor utilizado, os teores em biodiesel obtidos foram inferiores a 2%.

A perda da atividade catalítica dos biocatalisadores imobilizados, quando comparados a sua forma livre, pode ser atribuída ao tipo de suporte utilizado na imobilização e à adsorção do glicerol (gerado durante a reação) ao suporte. O glicerol gerado na reação de transesterificação pode ser adsorvido no suporte de imobilização da lipase, proporcionando uma modificação do microambiente da enzima que ocasiona um decréscimo na sua atividade (XU, DU e LIU, 2005).

Dossat e colaboradores (1999) observaram que o glicerol formou uma camada hidrofílica ao redor da enzima, impedindo a transferência de massa de substratos hidrofóbicos

durante a transesterificação do óleo de girassol por Lipozyme RM IM (lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em Duolite A568).

No presente trabalho as lipases Palatase 20000L (lipase de *Rhizomucor miehei*) e Lipolase 100L (lipase de *Thermomyces lanuginosus*) imobilizadas nos suportes da família Siral não se mostraram eficientes na transesterificação do óleo de soja com o etanol, provavelmente devido à inativação das mesmas que pode ser atribuída ao tipo de suporte utilizado na imobilização e à adsorção do glicerol (gerado durante a reação) ao suporte. Soumanou e Bornscheuer (2003) também observaram a perda de atividade das lipases Lipozyme RM IM (lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada na resina de troca iônica Duolite A568) e Lipozyme TL IM (lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em sílica granulada) na reação de transesterificação do óleo de algodão com o metanol. Esta inativação pode ser atribuída a diferentes fatores como a inativação da enzima na fase hidrofóbica (óleo), já que a presença do glicerol pode inibir a reação através da limitação difusional do produto e substrato, devido a sua insolubilidade no óleo, tipo de suporte utilizado na imobilização da enzima ou sensibilidade da enzima à longa exposição ao metanol.

Rosset e colaboradores (2011) investigaram a etanólise do óleo de soja com Novozym 435 (lipase B de *Candida antarctica*) para produzir ésteres etílicos (biodiesel). O maior rendimento em biodiesel (82,9%) foi obtido após 24 h de reação a 32°C, empregando 5% ($m.m^{-1}$) de lipase imobilizada. A enzima imobilizada manteve sua atividade após cinco ciclos de reação. Os resultados obtidos são melhores do que o presente estudo, por se tratar de uma enzima comercial imobilizada em uma resina macroporosa amplamente estudada e aprimorada.

A síntese de ésteres metílicos foi estudada por Poppe et al. (2013), utilizando 25% de CALB imobilizada em esferas de estireno-divinilbenzeno e foi obtido um rendimento de 99,03% após 72 h de reação. Comparando com os resultados obtidos no presente trabalho, a lipase CALB imobilizada em Siral 40 não se mostrou adequada para a síntese de ésteres etílicos.

Pode-se concluir que as preparações enzimáticas CALB e Lipolase 100L imobilizadas na Siral 40 e a Palatase 20000L imobilizada na Siral 20 não mostraram atividade na reação de transesterificação do óleo de soja, provavelmente devido à inativação das mesmas que pode ser atribuída ao tipo de suporte utilizado na imobilização e à adsorção do glicerol (gerado durante a reação) ao suporte.

CONCLUSÕES

A maior conversão obtida na síntese de oleato de etila (74,2%) foi obtida a 40°C empregando 30% $v.v^{-1}$ da lipase Palatase 20000L. Este biocatalisador possui o maior potencial para remoção de ácido graxos livres presentes em óleos com elevado índice de acidez.

A utilização da lipase comercial líquida Lipolase 100L na reação de transesterificação de óleo de soja empregando 10% $v.v^{-1}$ desta lipase e 30°C possibilitou a obtenção do maior teor de ésteres etílicos (97,3%).

A avaliação da influência da acidez do óleo de soja revelou que elevadas conversões de ácido (> 85%) são obtidas usando os biocatalisadores CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L. A escolha da preparação enzimática mais indicada é feita de acordo com a acidez do óleo empregado.

Os suportes da família Siral mostraram-se mais indicados para imobilização das preparações enzimáticas CALB, Palatase 20000L, Lipolase 100L e *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 usando tampão fosfato de sódio 5 mM, em pH 7 e placa agitadora de rolos.

A imobilização conferiu uma maior estabilidade térmica aos biocatalisadores obtidos a partir da imobilização das preparações enzimáticas CALB, Palatase 20000L, Lipolase 100L e *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em suportes da família Siral, quando estes foram empregados nas reações de síntese de oleato de etila.

As lipases CALB, Lipolase 100L e Palatase 20000L imobilizada em suportes da família Siral puderam ser reutilizadas mantendo cerca de 30% da conversão inicial da reação após 3 bateladas, já para o extrato enzimático de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 imobilizado em Siral 40 a conversão obtida após a 3ª batelada foi de 13%.

A utilização das lipases CALB, Palatase 20000L e Lipolase 100L imobilizadas nos suportes da família Siral não se mostrou adequada na reação de transesterificação do óleo de soja refinado com etanol.

Tanto as lipases comerciais líquidas (CALB, Lipolase 100L e Palatase 20000L) quanto às preparações obtidas a partir da imobilização destas lipases comerciais em suportes da família Siral apresentaram atividade de esterificação. Dentre essas se destaca a Palatase, que levou a conversões de cerca de 80%, tanto na sua forma livre como imobilizada e poderia ser

utilizada para remoção de ácidos graxos em etapas preliminares de adequação da matéria-prima ácida (óleos ácidos) para síntese de biodiesel.

SUGESTÕES

Investigar o efeito do tipo de solvente no processo de lavagem das lipases comerciais imobilizadas em suportes da família Siral, a fim de possibilitar a remoção dos produtos e reagentes que possam estar adsorvidos no suporte da enzima, aumentando a estabilidade da enzima durante o processo de reutilização.

Avaliar a dessorção da lipase após a reação por diferentes métodos.

Estudar a síntese de oleato de etila a partir da esterificação do ácido oleico em sistema contínuo empregando as lipases CALB e Lipolase 100L imobilizadas em Siral 40 e Palatase 20000L imobilizada em Siral 20.

Avaliar a utilização das lipases comerciais imobilizadas em suportes da família Siral na síntese de biodiesel a partir de óleos ácidos.

Testar a imobilização de mistura de lipases nos suportes da família Siral e avaliar seu desempenho em reações de esterificação e de transesterificação, tanto em sistema batelada, quanto contínuo.

REFERÊNCIAS

AARTHY, M, et al. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: an overview. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 92, n. 8, p. 1591-1601, 2014.

ABBASZAADEH, A. et al. Current biodiesel production Technologies: A comparative review. *Energy Conversion and Management*, v. 63, p. 138-148, 2012.

AGHBASLO, M. et al. Effect of an emission-reducing soluble hybrid nanocatalyst in diesel/biodiesel blends on exergetic performance of a DI diesel engine. *Renewable Energy,* 93, p. 353–368, 2016.

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Investigation of the Reuse of Immobilized Lipases in Biodiesel Synthesis: Influence of Different Solvents in Lipase Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 179, p. 485-496, 2016.

AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. *Fuel*, v. 159, p. 52-67, 2015.

AGUIEIRAS, E. C. G.; SOUZA, S. L.; LANGONE, M. A. P. Estudo do comportamento da lipase comercial lipozyme RM IM em reações de esterificação para obtenção de biodiesel. *Química Nova*, v. 36, n. 5, p. 646-650, 2013.

AKIL, E. et al. Accessing regio-and typo-selectivity of *Yarrowia lipolytica* lipase in its free form and immobilized onto magnetic nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal*, v. 109, p. 101-110, 2016.

ALLOUE, W. A. M. et al. Comparison of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilization yield of entrapment, adsorption, and covalent bond techniques. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* v. 150, n. 1, p. 51-63, 2008.

ALOULOU, A. et al. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1761, n. 9, p. 995–1013, 2006.

AL-ZUHAIR, S. et al. Continuous production of biodiesel from fat extracted from lamb meat in supercritical CO_2 media. *Biochemical Engineering Journal*, v. 60, p. 106-110, 2012.

AMARAL, P. F. F. *Produção de Lipase de Yarrowia lipolytica em Biorreator Multifásico*. 2007. 221 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

AMINI, Z. et at. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, v. 141, p. 339-353, 2017.

ANDRADE, L. H. et al. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by diferente methodologies on superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, p. 55-62, 2010.

ANP. RESOLUÇÃO ANP Nº 30 de 23 de Junho de 2016. *Publicada no diário oficial de união em 24 de Junho de 2016*, 2016.

ANP, 2018. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado>. Acesso em: 6 jul. 2018.

ANTCZAK, M. S. et al. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, v. 34, p. 1185-1194, 2009.

ARICA, M. Y.; ALTINTAS, B.; BAYRAMOGLU, G. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly (GMA/EGDMA) beads: Application for textile dye degradation. *Bioresource Technology*, v. 100, n.2, p. 665-669, 2009.

ARROYO, M.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, n. 1-2, p. 3-12, 1999.

ATABANI, A. E. et al. A study of production and characterization of Manketti (*Ricinodendron rautonemii*) methyl ester and its blends as a potential biodiesel feedstock. *Biofuel Research Journal*, v. 4, p. 139–146, 2014.

ATABANI, A. E. et al. A comprehensive review on biodiesel as analternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, n. 4, p. 2070-2093, 2012.

AZÓCAR, L. et al. Enzymatic biodiesel production kinetics using co-solvent and an anhydrous medium: a strategy to improve lipase performance in a semi-continuous reactor. *New Biotechnology*, v. 31, n. 5, p. 422-429, 2014.

BABAKI, M. et al. Process optimization for biodiesel production from waste cooking oil using multienzyme systems through response surface methodology. *Renewable Energy*, v. 105, p. 465-472, 2017.

BAJAJ et al. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 62, p. 9-14, 2010.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007.

BARTH, A.; ZSCHERP, C. What vibrations tell us about proteins. *Quartely Reviews of Biophysics*, v. 35, n. 4, p. 369-430, 2002.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, p. 1-19, 1997.

BASSI, J. J. et al. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support andapplication in the synthesis of a lubricant ester. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 92, p. 900–909, 2016.

BATISDA, A. et al. A single step purification, immobilization and hyperativation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 58, n. 5, p. 486-493, 1998.

BATISTELLA, L. et al. Ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of soybean oil in organic solvent system. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 19, p. 452-458, 2012.

BECK, J. S. et al. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. *Journal of the American Chemical Society*, v. 114, n. 27, p. 10834-10843, 1992.

BERCHMANS, H. J.; HIRATA, S. Biodiesel production from crude *jatropha curcas L.* seed oil with a high content of free fatty acids. *Bioresource Technology,* v. 99, p. 1716-1721, 2008.

BERG, O. G. et al. Interfacial activation of triglyceride lipase from *Thermomyces (Humicola) lanuginosa*: Kinetic parameters and a basis for control of the lid. *Biochemistry*, v. 37, p. 6615–6627, 1998.

BERGAMASCO, R. et al. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. *Brazil Journal Chemical Engineering*, v. 17, p. 4-7, 2000.

BERNARDES, O. L. et al. Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136–140, p. 105-114, 2007.

BEZBRADICA, D. et al. The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, p. 97-101, 2007.

BHOSLE, B. M.; SUBRAMANIAN, R. New approaches in deacidification of edible oils—a review. *Journal of Food Engineering*, v. 69, n. 4, p. 481-494, Agosto 2005.

BLANCO, R. M. et al. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization characterization of the support and the catalysts. *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic,* v. 30, p. 83-93, 2004.

BOFFITO, D. C. et al. Free fatty acids esterification of waste cooking oil and its mixtures with rapeseed oil and diesel. *Fuel*, v. 108, p. 612-619, 2013.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. *Enzimas em biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado*, Editora Interciencia, Brasil, 2008.

BORDES, F. et al. Exploring the conformational states and rearrangements of *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biophysical Journal*, v. 99, p. 2225-2234, 2010.

BORGES, M. E.; DÍAZ, L. Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 2839-2849, 2012.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2002.

BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. *Lipases and esterases*. In: BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. Hydrolases in Organic Synthesis. Regio- and Stereoselective Biotransformations. 2nd edition. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, p. 61-183 (Chapter 5), 2006.

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

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters*, v. 31, n. 11, p. 1639-1650, 2009.

BRADY, L. et al. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. *Nature,* v. 343, n. 6260, p. 767-770, 1990.

BRAGA, A. C. *Biotransformação do óleo de rícino em aromas por Yarrowia lipolytica*. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biológica) – Universidade do Minho– Braga, 2009.

BRAHMKHATRI, V.; PATEL, A. 12-tungstophosphoric acid anchored to SBA-15: an efficient, environmentally benign reusable catalysts for biodiesel production by esterification of free fatty acids. *Applied Catalysis A: General*, v. 403, p. 161-172, 2011.

BRÍGIDA et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase b by adsorption to green coconut fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 146, p. 173-187, 2008.

BRÍGIDA, A. I. S. *Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais*. 2010. 190 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

BRÍGIDA, A. I. S. et al. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 101, p. 148-158, 2014.

BRZOZOWSKI, A.M. et al. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase–inhibitor complex. *Nature,* v. 351, p. 491–494, 1991.

BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. T. *Biocatalysts and enzyme technology.* 1. ed. [S.l.]: Wiley-VCH, 2005.

CABRERA, Z. et al. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 57, n. 1, p. 171-176, 2009.

CAI, C. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B onto SBA-15 and their application in glycerolysis for diacylglycerols synthesis. *Food Chemistry*, v. 212, p. 205-212, 2016.

CAI, Z. et al. A two-step biodiesel production process from waste cooking oil via recycling crude glycerol esterification catalyzed by alkali catalyst. *Fuel Processing Technology*, v. 137, p. 186-193, 2015.

CALGAROTO, C. et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase in zeolite MCM 22 with different Si/Al ratios. *Applied Catalysis A: General*, v. 394, p. 101-104, 2011.

CANAKCI, M.; VAN GERPEN, J. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, v. 44, p. 1429-1436, 2001.

CANILHO, N. et al. Isocyanate-mediated covalente immobilization of *Mucor miehei* lipase onto SBA-15 for transesterification reaction. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 112, p. 139-145, 2013.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, E. Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, v. 32, p. 175-187, 2009.

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. *Química Nova*, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2015.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CESARINI, S. et al. Moving towards a Competitive Fully Enzymatic Biodiesel Process. *Sustainability*, v. 7, p. 7884-7903, 2015.

CESARINI, S. et al. Combining phospholipases and a liquid lipase for one-step biodiesel production using crude oils. *Biotechnology for Biofuels*, v. 7, n. 29, 2014.

CESARINI, S.;DIAZ, P.; NIELSEN, P. M. Exploring a new, soluble lipase for FAMEs production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock. *Process Biochemistry*, v. 48, p. 484-487, 2013.

CHEN, J. W.; WU, W. T. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 95, n. 5, p. 466-469, 2003.

CHEN, H. C. et al. Continuous Production of Lipase-Catalyzed Biodiesel in a Packed-Bed Reactor: Optimization and Enzyme Reuse Study. *Journal of Biomedicine and Biotechnology,* v. 2011, p. 1-6, 2011.

CHEN, B. Q. et al. Using silk woven fabric as support for lipase immobilization: the effect of surface hydrophilicity/hydrophobicity on enzymatic activity and stability. *Biomass and Bioenergy*, v. 39, p. 59-66, 2012.

CHRISTENSEN, M. W.; KIRK, O.; PEDERSEN, C. USA Patent US20030203457, 2003.

CHRISTOPHER, L. P; HEMANATHAN, K.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: challenges and opportunities. *Applied Energy*, v. 119, p. 497–520, 2014.

CIFTCI, O. N.; TEMELLI, F. Enzymatic conversion of corn oil into biodiesel in a batch supercritical carbon dioxide reactor and kinetic modeling. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 75, p. 172-180, 2013.

CIPOLATTI, E. P. Support engineering: relation between development of new supports for immobilization of lipases and their applications. *Biotechnology Research and Innovation,* v. 1, n. 1, p. 26-34, 2017.

COELHO, M. A. Z.; AMARAL P. F. F.; BELO, I. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, p. 930-944, 2010.

COLLINS, S. E.; LASSALLE, V.; FERREIRA, M. J. FTIR-ATR characterization of free *Rhizomucor meihei* lipase (RML), Lipozyme RM IM and chitosan-immobilized RML. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 72, p. 220–228, 2011.

CORRÊA, I. N. S. et al. Enzymatic biodiesel using a byproduct obtained from palm oil refining. *Enzyme Research*, v. 2011, p. 1-8, 2011.

CORRO, G. et al. Measurements of surface acidity of solid catalysts for free fatty acids esterification in *Jatropha curcas* crude oil for biodiesel production. *Fuel,* v. 115, p. 625-628, 2014.

COSTA, I. C. R. et al. Thermal effect on the microwave assisted biodiesel synthesis catalyzed by lipase. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, n. 10, p. 1993-1998, 2011.

CREMONEZ, P. A. et al. Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 42, p. 415-428, 2015.

CUI, C. et al. Improving the activity and stability of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 by immobilization on polyethyleneimine-coated polyurethane foam. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* v. 91, p. 59– 66, 2013.

CVETKOVIC, B. S. et al. Side-stream products of edible oil refining as feedstocks in biodiesel production. *Recycling and Sustainable Development*, v. 9, p. 28-46, 2016.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. *Química Nova,* v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DENG, X. et al. Production of biodiesel from Jatropha oil catalyzed by nanosized solid basic catalyst. *Energy,* v. 36, n. 2, p. 777-784, 2011.

DEREWENDA, U. et al. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry*, v. 31, n. 5, p. 1532-1541, 1992.

DEREWENDA, Z. S.; DEREWENDA, U.; DODSON, G. G. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, v. 227, n. 3, p. 818-839, 1992.

DEREWENDA, U. et al. Current Progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Engineering,* n. 7, p. 551-557, 1994.

DIZGE' N.; KESKINLER, B.; TANRISEVENT, A. Covalent attachment of microbial lipase onto microporous styrene–divinylbenzene copolymer by means of polyglutaraldehyde. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 66, n. 1, p. 34-38, 2008.

DODSON, G. G.; LAWSON, D. M.; WINKLER, F. K. Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation. *Faraday Discuss*, v. 93, p. 95-105, 1992.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed-bed reactor: influence of the glycerol production. *Enzyme and Microbial Technology,* v. 25, n. 3-5, p. 194-200, 1999.

DUMITRIU, E. et al. Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 22, p. 119-133, 2003.

EMBRAPA. Macaúba é matéria-prima promissora para biodiesel. *Embrapa,* 2014. Disponível em: <www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2329636/macauba-e-materia-prima-promissora-para-biodiesel>. Acesso em: 2015 ago. 06.

ECHIM, C. et al. Production of biodiesel from side-stream refining products. *Energy and Environmental Science,* v. 2, p. 1131-1141, 2009.

ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION – EIA. International energy statistics. 2018. Disponível em: <https://www.eia.gov/beta/international/data/browser/#/?pa=000000g&c=ruvvvvvfvtvvvv1vvvvvvfvvvvvvfvvvsu20evvvvvvvvvvvvfuvg&ct=0&tl_id=79-A&vs=INTL.81-1-AFG-TBPD.A&cy=2015&vo=0&v=H&start=2000&end=2016 >. Acesso em 13 mar. 2018.

FABIAN, H.; MANTELE, W. *Infrared spectroscopy of proteins.* In: Handbook of Vibrational Spectroscopy, v. 3, CHALMERS, J. M. and GRIFFITHS, P. R. (Eds), Wiley, Chinchester, UK, 2002, Chichester, p. 3749–3775, 2002.

FAROBIE, O.; YANAGIDA, T.; MATSUMUR, Y. New approach of catalyst-free biodiesel production from canola oil in supercritical tert-butyl methyl ether (MTBE). *Fuel,* v. 135, p. 172-181, 2014.

FELIZARDO, P. et al. Study on the glycerolysis reaction of high free fatty acid oils for use as biodiesel feedstock. *Fuel Processing Technology*, v. 92, p. 1225-1229, 2011

FELTES, M. M. C. et al. An overview of enzyme-catalyzed reactions and alternative feedstock for biodiesel production. In: MANZANERA, M. *Alternative Fuel*, InTech, cap. 2, p. 21-46, 2011.

FERNANDES, M. L. M. et al. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30, p. 43-49, 2004.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M., SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances*, v. 31, p. 1808-1825, 2013.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 93, p. 185-197, 1998.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as na industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 62, p. 197–212, 2010.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of hydrolysis catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* v. 11, p. 649-656, 2001.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Regio-selective deprotection of peracetylated sugars via lipase hydrolysis. *Tetrahedron*, Elsevier, v. 59, n. 30, p. 5705-5711, 2003.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. *Process Biochemistry*, v. 43, n. 10, p. 1061-1067, 2008.

FICKERS, P. et al. Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, v. 5, p. 527-543, 2005.

FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 632-644, 2011.

FIRDAUS, M. Y. et al. Kinetic model of biodiesel production catalyzed by free liquid lipase from *Thermomyces lanuginosus. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 133, p. 55-64, 2016.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and Bioengeering,* v. 102, p. 1298–1315, 2009.

FORESTI, M. L. et al. FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from *Candida antarctica* immobilized onto titania at selected conditions. *Applied Surface Science*, v. 256, p. 1624–1635, 2010.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica B* adsorbed on polypropylene powder. *Catalysis Today,* v. 107-108, p. 23-30, 2005.

FREIRE, D.M.G. *Imobilização de amiloglicosidase em quitina - caracterização e testes em reatores contínuos deleito expandido*. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1988.

FREY, P. A.; ABLES, R. H. In: *Enzymatic Reaction Mechanisms*. USA: Oxyford University Press, 2007. p. 77-79.

GAN, S. et al. Heterogeneous free fatty acids esterification in waste cooking oil using ion-exchange resins. *Fuel Processing Technology*, v. 102, p. 67-72, 2012.

GAO, J. et al. Formation of lipase *Candida* sp. 99–125 CLEAs in mesoporous silica: characterization and catalytic properties. *Catalysis Science and Technology*, v. 3, n. 12, p. 3353-3359, 2013.

GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of diferente enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced synthesis & Catalysis*, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, 2011.

GERVASINI, A. Characterization of the textural properties of metal loaded ZSM-5 zeolites. *Applied Catalysis A: General,* v. 180, n. 1-2, p. 71-82, 1999.

GHALY, A. E. et al. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review. *American Journal of Biochemestry and Biotechnology*, v. 6, p. 54-76, 2010.

GIANNETTO, G. *Zeólitas- Caracateristicas, Propriedades y Aplicaciones Industriales.* Caracas, Editorial Inovacón Tecnológica, 170 p., 1990.

GIANNETTO, G.; MONTES, A.; RODRÍGUEZ-FUENTES, G. *Zeolitas: Caracteristicas, Propiedades y Aplicaciones,* Editorial Innovación Tecnológica: Caracas, 2000.

GIMBUN, J. et al. Biodiesel production from rubber seed oil using activeted cement clinker as catalyst. *Advances in Materials Physics and Chemistry,* v. 2, p. 138-141, 2012.

GOG, A. et al. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. *Renewable Energy*, v. 39, p. 10-16, 2012.

GOMEZ, L. et al. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 22-27, 2005.

GOUKA, R. J. et al. Analysis of heterologous protein production in defined recombinant *Aspergillus awamori* strains. *Applied and Environmental Microbiology,* v. 62, p. 1951-1957, 1996.

GOYAL, P.; SHARMA, M. P.; JAIN, S. Optimization of esterification and transesterification of high FFA jatropha curcas oil using response surface methodology. *Journal of Petroleum Science Research*, v. 1, p. 36-43, 2012.

GRECCO, S. T. F.; RANGEL, M. C. Zeólitas Hierarquicamente Estruturadas. *Química Nova,* v. 36, n. 1, p. 131–142, 2013.

GUIDINI, C. Z. et al. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β-galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. *Biochemical Engineering Journal*, v. 52, n. 2-3, p. 137-143, 2010.

GUIEYSSE, D. et al. New efficient lipase from *Yarrowia lipolytica* for the resolution of 2-bromoarylacetic acid esters. *Tetrahedron: Assymmetry*, v. 15, p. 3539-3543, 2004.

GULDHE, A. et al. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 41, p. 1447-1464, 2015.

GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 68, p. 1-21, 2011.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.

GÜRSEL, A. et al. Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers. *Reactive & Functional Polymers,* v. 57, p. 57-65, 2003.

GUSTAFSSON, H. et al. Immobilization of lipase from *Mucor miehei* and *Rhizopus oryzae* into mesoporous silica - The effect of varied particle size and morphology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 100, p. 22-30, 2012.

HALIM, S. F. A. et al. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 710-716, 2009.

HAMA, S. et al. Enzymatic production of biodiesel from waste cooking oil in a packed-bed reactor: An engineering approach to separation of hydrophilic impurities. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 417–421, 2013.

HAN, Y.; LEE, S. S.; YING, J. Y. Pressure-Driven Enzyme Entrapment in Siliceous Mesocellular Foam. *Chemistry of Materials*, v. 18, n. 3, p. 643–649, 2006.

HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009.

HARIS, P. I.; SEVERCAN, F. FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 7, n. 1–4, p. 207-221, 1999.

HE, J. et al. Formation of a mesoporous bioreactor based on SBA-15 and porcine pancreatic lipase by chemical modification following the uptake of enzymes. *Journal of Materials Chemistry*, v. 16, n. 44, p. 4307-4315, 2006.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. *Bioresource Technology,* v. 99, p. 277-286, 2008.

HERRGARD, S.; GIBAS, C. J.; SUBRAMANIAM, S. Role of an electrostatic network of residues in the enzymatic action of the *Rhizomucor miehei* lipase family. *Biochemistry*, v. 39, n. 11, p. 2921-2930, 2000.

HIRATA, G. F. et al. Liquid–liquid equilibrium of fatty systems: A new approach for adjusting UNIFAC interaction parameters. *Fluid Phase Equilibria*, v. 360, p. 379-391, 2013.

HOFFMANN, F. et al. Silica-Based Mesoporous Organic–Inorganic Hybrid Materials. *Angewandte Chemie,* v. 45, p. 3216 – 3251, 2006.

HOLMQUIST, M. et al. Probing a functional role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase through transesterification reactions in organic solvent. *Journal of Protein Chemistry*, v. 14, p. 217-224, 1995.

HOU, C. Characterization of new yeast lipases. *Journal of American Oil Chemistrys' Society*, v. 74, p. 1391– 1394, 1997.

HOSSEINPOUR, S. et al. Exact estimation of biodiesel cetane number (CN) from its fatty acid methyl esters (FAMEs) profile using partial least square (PLS). *Energy Conversion and Management*, v. 124, p. 389–398, 2016.

HUANG, J. et al. Biodiesel production from microalgae oil catalyzed by a recombinant lipase. *Bioresource Technology*, v. 180, p. 47-53, 2015.

HUANG, Y.; ZHENG, H.; YAN, Y. Optimization of lipase-catalyzed transesterification of lard for biodiesel production using response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 160, p. 504-515, 2010.

IHA, O. K. et al. Potential application of *Terminalia catappa L.* and *Carapa guianensis* oils for biofuel production: Physical-chemical properties of neat vegetable oils, their methyl-esters and bio-oils (hydrocarbons). *Industrial Crops and Products*, v. 52, p. 95-98, 2014.

ILLANES, A. et al. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology*, v. 115, p. 48-57, 2012.

ILMI, M. et al. Kinetic studies on the transesterification of sunflower oil with 1-butanol catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase in a biphasic aqueous-organic system. *Biochemical Engineering Journal,* v. 114, p. 110–118, 2016.

JACOBY, J. et al. Ordered mesoporous materials containing *Mucor Miehei* lipase as biocatalyst for transesterification reaction. *Process Biochemistry*, v. 48, p. 831–837, 2013.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnology*, v. 19, n. 9, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K. E.; DIJKASTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures and biotechnology applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*, v. 53, 315-351, 1999.

JEGANNATHAN, K. R. et al. Production of biodiesel using immobilized lipase - a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 28, n. 4, p. 253-64, 2008.

JEGANNATHAN, K. R.; ENG-SENG, C.; RAVINDRA, P. Economic assessment of biodiesel production: Comparison of alkali and biocatalyst processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 745-751, 2011.

JEONG, G. T.; PARK, D. H. Lipase-Catalyzed Transesterification of Rapeseed Oil for Biodiesel Production with tert-Butanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 148, p. 131-139, 2008.

JHA, B. K. et al. Titration microcalorimetry studies of the interaction between *Humicola lanuginosa* lipase and ionic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 213, n. 1, p. 262-264, 1999.

JORGE, N.; LUZIA, D. M. M. Caracterização do óleo das sementes de *Pachira aquatica Aublet* para aproveitamento alimentar. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 42, p. 149-156, 2012.

JOSÉ, C. Investigation of the stability of Novozym® 435 in the production of biodiesel. *Catalysis Today*, v. 213, p. 73-80, 2013.

JUAN, J. C. et al. Biodiesel production from jatropha oil by catalytic and non-catalytic approaches: An overview. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 452-460, 2011.

JUN, C. et al. Thermostabilization of *Candida antarctica* lipase B by double immobilization: Adsorption on a macroporous polyacrylate carrier and R1 silaffin-mediated biosilicification. *Process Biochemistry,* v. 48, n. 8, p. 1181-1187, 2013.

KAMEL, G. et al. Adsorption of *Candida rugosa* lipase at water-polymer interface: The case of poly (DL) lactide. *Surface Science*, v. 605, p. 2017–2024, 2011.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 555-569, 2012.

KARATAY, S. E.; DONMEZ, G. Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. *Applied Energy*, v. 88, p. 3632–3635, 2011.

KHAN, N. R.; JADHAV, S. V.; RATHOD, V. K. Lipase catalysed synthesis of cetyl oleate using ultrassound: Optimisation and kinetic studies. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 27, n. 1, p. 522-529, 2015.

KHAN, F. I. et al. The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 5, n. 16, p. 1-13, 2017.

KNEZEVIC, Z.; MOJOVIC, L.; ADNADJEVIC, B. Palm oil hydrolysis by lipase from *Candida cylindracea* immobilized on zeolite type Y. *Enzyme and microbial Technology*, v. 22, p. 275-280, 1998.

KNOTHE, G. et al. *Manual do Biodiesel*. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

KOH, M. Y.; GHAZI, T. I. M. A review of biodiesel production from *Jatropha curcas L.* oil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 2240-2251, 2011.

KOKOTAILO, G. T.; LAWTON, S. L.; OLSON, D. H. Structure of synthetic zeolite ZSM-5. *Nature*, v. 272, p. 437, 1978.

KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica* et *Biophysica Sinica*, v. 39, n. 8, p. 549-559, 2007.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.

KRESGE, C. T. et al. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Letters to Nature*, v. 359, p. 710-712, 1992.

KUSS, V. V. et al. Potential of biodiesel production from palm oil at Brazilian Amazon. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 50, p. 1013-1020, 2015.

LADESMA-AMARO, R.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. *Progress in Lipid Research*, v. 61, p. 40-50, 2016.

LAGE, F. A. P. et al. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 84, p. 56–67, 2016.

LASZLO, J. A.; EVANS, K. O. Influence of self-assembled monolayer surface chemistry on *Candida antarctica* lipase B adsorption and specific activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* v. 48, n. 3–4, p. 84-89, 2007.

LEE, M. et al. Improvement of enzymatic biodiesel production by controlled substrate feeding using silica gel in solvent free system. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 49, n. 4, p. 402-406, 2011.

LEE, R. A.; LAVOIE, J. From first – to third- generation biofuels: challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers*, v. 3, p. 6-11, 2013.

LEE, A. F. et al. Heterogeneous catalysis for sustainable biodiesel production via esterification and transesterification. *Chemical Society Reviews*, v. 43, n. 22, p. 7887-7916, 2014.

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

LI, N.; BAI, N. Copper Adsorption on Chitosan-Cellulose Hydrogel Beads: Behaviors and Mechanisms. *Separation and Purification Technology*, v. 42, p. 237-247, 2005.

LI, Q.; ZHENG, J.; YAN, Y. Biodiesel preparation catalyzed by compound- lipase in co-solvent. *Fuel*, v.91, p. 1229-1234, 2010.

LI, W. et al. Synthesis of ethyl oleate by esterification in a solvent-free system using lipase immobilized on PDMS-modified nonwoven viscose fabrics. *Process Biochemistry,* v. 50, n. 11, p. 1859-1869, 2015.

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

LIN, J. et al. Rationally designed Fe-MCM-41 by protein size to enhance lipase immobilization, catalytic efficiency and performance. *Applied Catalysis A: General*, v. 478, p. 175-185, 2014.

LOPRESTO, C. G. et al. Kinetic study on the enzymatic esterification of octanoic acid and hexanol by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 110, p. 64–71, 2014.

LOZANO, P. et al. Active membranes coated with immobilized *Candida antarctica* lipase B: preparation and application for continuos butyl butyrate synthesis in organic media. *Journal of membrane science,* Elsevier, v. 201, n. 1, p. 55-64, 2002.

LU, X. et al. Deacidification and esterification of waste cooking oil: comparison of the couple process with stand-alone catalytic esterification and extraction processes. *BioResources*, v. 5, p. 147-158, 2010.

LUKOVIĆ, N.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z.; BEZBRADICA, D. Biodiesel fuel production by enzymatic transesterification of oils: recent trends, challenges and future perspectives. In: MANZANERA, M. *Alternative Fuel*, InTech, cap. 3, p. 47-72, 2011.

LUTZ, S. Engineering lipase B from *Candida antarctica. Tetrahedron: Asymmetry,* v. 15, n. 18, p. 2743-2748, 2004.

MA, H. Z. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on epoxy modified silica by sol-gel process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* v. 127, p. 76-81, 2016.

MACARIO, A. et al. Preparation of mesoporous materials as a support for the immobilisation of lipase. *Studies in Surface Science and Catalysis*, v. 142, p. 1561-1568, 2002.

MACARIO, A. et al. Immobilization of Lipase on microporous and mesoporous materials: studies of the support surfaces. *Studies in Surface Science and Catalysis,* v. 155, p. 381-394, 2005.

MACARIO, A. et al. Study of lipase immobilization on zeolitic support and transesterification reaction in a solvent free-system. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 25 (2-4), p. 328-335, 2007.

MACARIO, A. et al. Biodiesel production by immobilized lipase on zeolites and related materials. *Studies in Surface Science and Catalysis*, v. 174, part B, p. 1011-1016, 2008a.

MACARIO, A. et al. Hydrolysis of alkyl ester on Lipase/Silicalite-1 catalyst. *Catalysis Letters*, v. 122, p. 43-52, 2008b.

MACARIO, A. et al. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic–inorganic system. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 118, p. 334–340, 2009.

MACEIRAS, R. et al. Enzyme deactivation during biodiesel production. C*hemical Engineering Journal*, v. 166, p. 358–361, 2011.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R.C. Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Reviews,* v. 3, Intercept Ltda, 1985.

MAGNER, E. Immobilisation of enzymes on mesoporoussilicate materials. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, p. 6213-6222, 2013.

MAHAPATRA, P. et al. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 60, p. 57–63, 2009.

MANDOLESI de ARAÚJO, C. D. et al. Biodiesel production from used cooking oil: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 445-452, 2013.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 11, p. 1300-1311, 2007.

MARCONI, W. Immobilized enzymes: their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. *Reactive Polymers*, v. 11, n. 0, p. 1-19, 1989.

MARIANO, R. G. B. et al. Partition of Free Fatty Acids in Deacidification of Macaúba Pulp Oil by Liquid-Liquid Extraction using Ethanol/Water as Solvent. *Defect and Diffusion Forum*, v. 312-315, p. 554-559, 2011.

MARTINS, A. B. et al. Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene–divinylbenzene beads. *Bioresource Technology,* v. 134, p. 417–422, 2013.

MASCARENHAS, A. J. S.; OLIVEIRA, E. C.; PASTORE, H. O. Peneiras moleculares: Selecionando as moléculas por seu tamanho. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, p. 25-34, 2001.

MATA, T. M. et al. Fish oil acidity reduction by enzymatic esterification. *Energy Procedia*, v. 136, p. 474-480, 2017.

MATASSOLI, A. et al. Enzymatic synthesis of biodiesel via alcoholysis of palm oil. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 155, p. 347–355, 2009.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MATTE, C. R. et al. Characterization of ciclodextrin glycosyltransferase immobilized on silica microspheres via aminopropyl trimethoxysilane as a “spacer arm”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 78, p. 51-56, 2012.

MATTE, C. R. et al. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* v. 127, p. 67-75, 2016.

MCCABE, R.; RODGER, A.; TAYLOR, A. Study of the secondary structure of *Candida antarctica* lipase B using synchrotron radiation circular dichroism measurements. *Enzyme and microbial technology*, Elsevier, v. 36, n. 1, p. 70-74, 2005.

MEHRASBI, M. R. et al. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from wastecooking oil. *Renewable Energy*, v. 101, p. 593-602, 2017.

MENDES, A. A. *Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel*. Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 225 p., 2009.

MENDES, A. A. et al. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 68, p. 109–115, 2011a.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011b.

MENDES, A. A. et al. Preparation and application of epoxy–chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. *Reactive and Functional Polymers*, v. 73, n. 1, p. 160-167, 2013.

MENG, Y. et al. Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biotechnology for Biofuels*, v. 4:6, p. 1-9, 2011.

MILANO, J. et al. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 58, p. 180-197, 2016.

MILETIC, N. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on polystyrene nanoparticles. *Macromolecular Rapid Communications*, v. 31, p. 71-74, 2010.

MIRANDA, A. S.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A. Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 5, p. 372-393, 2015.

MIRANDA, J. S. et al. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. *Chemical Engineering Journal,* v. 251, p. 392-403, 2014.

MITCHELL, S.; PÉREZ-RAMÍREZ. Mesoporous zeolites as enzyme carriers: Synthesis, characterization, and application in biocatalysis. *Catalysis Today*, v. 168, p. 28-37, 2011.

MUKHERJEE, J. et al. Dual bioimprinting of *Thermomyces lanuginosus* lipase for synthesis of biodiesel. *Biotechnology Reports*, v. 10, p. 38–43, 2016.

MME, 2018. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/web/guest/pagina-inicial/outras-noticas/-/asset_publisher/32hLrOzMKwWb/content/percentual-obrigatorio-de-biodiesel-passa-para-10->Acesso em 10 mai. 2018.

MORAIS JÚNIOR, W. G. et al. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. *Protein Expression and Purification*, v. 123, p. 26–34, 2016.

NAGY, J. B. et al. *Synthesis, characterization and use of zeolitc microporous materials*. 1 ed. Hungria, Ed. DecaGenLtd., 1998. 192 p.

NAUTIYAL, P.; SUBRAMANIAN, K. A.; DASTIDAR, M. G. Production and characterization of biodiesel from algae. *Fuel Process Technology,* v. 120, p. 79–88, 2014.

NAVARRO-DÍAZ, H. J. et al. Macauba oil as an alternative feedstock for biodiesel: Characterization and ester conversion by the supercritical method. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 93, p. 130-137, 2014.

NDUWAYEZU, J. B. et al. Biodiesel production from unrefined palm oil on pilot plant scale. *International Journal of Sustainable and Green Energy*, v. 4, p. 11-21, 2015. Disponivel em: <www.anp.gov.br/?pg=59047&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1327357979291>. Acesso em: 08 Abril 2015.

NICAUD, J. M. et al. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research*, v. 2, n. 3, p. 371-379, 2002.

NIELSEN, P. M.; RANCKE-MADSEN, A. Enzymatic large-scale production of biodiesel. *Lipid Technology*, v. 23, n. 10, p. 230-233, 2011.

NORIN, M. et al. Computer modelling of substrate binding to lipases from *Rhizomucor miehei*, *Humicula lanuginosa* and *Candida rugosa*. *Protein Science*, v. 3, p. 1493-1503, 1994.

OLIVEIRA, D. et al. Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 39, p. 117-123, 2006.

OLIVEIRA, L. G, MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas**.** *Quimica Nova*, v. 32, p. 742–756, 2009.

OLIVEIRA, D. et al. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology A: Enzyme Engineering and Biotechnology*, v. 113, n. 1-3, p. 771-780, 2004.

OLIVEIRA, U. M. F. *Síntese de ésteres de interesse comercial utilizando lipases imobilizadas em quitosana.* Tese de Doutorado – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 191 f., 2012.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanism of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 27, n. (3-5), p. 187-204, 2000.

PALOMO, J. M. et al. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 19-20, p. 279-286, 2002.

PALOMO, J. M. et al. Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p. 447-454, 2005.

PATIL, K. J.; CHOPDA, M.; MAHAJAN, R. Lipase biodiversity. *Indian Journal of Science & Technology*, v. 4, n. 8, p. 971-982, 2011.

PATEL, A; BRAHMKHATRI, V.; SINGH, N. Biodiesel production by esterification of free fatty acid over sulfated zirconia. *Renewable Energy*, v. 51, p. 227-233, 2013.

PEDRO, K. C. N. R. et al. Enzymatic biodiesel synthesis from acid oil using a lipase mixture. *Química Nova*, v. 41, n. 3, p. 284-291, 2018.

PENG, L. et al. Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: Optimization using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 532-532, 2002.

PEDERSEN, A.T. et al. Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzym*atic, v. 105, p. 89-94, 2014.

PEREIRA-MEIRELLES, F. V.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; SANT'ANNA JR, G. L. A stable lipase from *Candida lipolytica*: Cultivation conditions and crude enzyme characteristics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 63-65, p. 73-85, 1997.

PETERSEN, M. T. N.; FOJAN, P.; PETERSEN, S. B. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *Journal of Biotechnology,* v. 85, n. 2, p. 115-147, 2001.

PIGNÈDE, G. et al. Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 10, p. 2802-2810, 2000.

PLEISS, J.; SCHEIB, H.; SCHMID, R. D. The His gap motif in microbial lipases: a determinant of stereoselectivity toward triacylglycerols and analogs. *Biochimie,* v. 82, p. 1043-1052, 2000.

POPPE, J. K. et al. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. *Applied Catalysis A: General*, v. 490, p. 50–56, 2015.

POPPE, J. K. et al. Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 94, p. 51– 56, 2013.

POURZOLFAGHAR, H. et al. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 61, p. 245-257, 2016.

PRATHUMPAI, W. et al. Lipase production by recombinant strains of *Aspergillus niger* expressing a lipase-encoding gene from *Thermomyces lanuginosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 65, p. 714-719, 2004.

QIAN, Z. et al. Structural redesign of lipase B from *Candida antarctica* by circular permutation and incremental truncation. *Journal of Molecular Biology*, v. 393, p. 191-201, 2009.

QUEIROZ, N. *Síntese Enantiosseletiva de Amidas e Ésteres Catalisada por Lipases.* Florianópolis: Centro de Ciências Físicas e Matemáticas; Universidade Federal de Santa Catarina, 2002. 152 p. Tese de Doutorado em Química Orgânica.

QUEIROZ, D. S. et al. Efeito do solvente na atividade enzimática de lipases comerciais imobilizadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20, 2014, Florianópolis. *Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ 2014.*São Paulo: Blucher Chemical Engineering Proceedings, 2015. v. 1, n. 2.

RAHMAN, R. N. Z. R. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Lipases: introduction. In: SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; BASRI, M. *New Lipases and Proteases*. [S.l.]: Nova Science Publishers, p. 7-9, 2006.

REIS, P. et al. Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science,* v. 147–148, p. 237–250, 2009.

REIS, P.; WITULA, T.; HOLMBERG, K. Mesoporous materials as host for an entrapped enzyme. *Microporous and Mesoporous Material*, v. 110, n. 2-3, p. 355-362, 2008.

RIBEIRO, B. D. et al. Production and use of lipase in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Research*, v. 2011, p. 1–16, 2011.

RIOS, N. S. *Estudo da imobilização da lipase do tipo B de Candida antarctica em silicato mesoporoso nanoestruturado (SBA-15) visando a aplicação em reações de elevado interesse industrial.* Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Ceará, Ceará, 107 p., 2016.

ROBLES-MEDINA, A. et al. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 4, p. 398-408, 2009.

RODRIGUES, R. C. et al. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Elsevier, v. 51, n. 3, p. 100-109, 2008.

RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization-stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 963-968, 2009.

RODRIGUES, R. C. et al. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochemistry*, v. 45, n. 8, p. 1268-1273, 2010.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, n. 1-2, p. 15-32, 2010.

RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, p. 6290-6307, 2013.

RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 682–688, 2011.

ROSSET, I. G. et al. Enzymatic esterification of oleic acid with aliphatic alcohols for the biodiesel production by *Candida antarctica* lipase. *Catalysis Letters*, v. 143, n. 9, p. 863–872, 2013.

ROSSET, I. G. et al. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and ^{1}H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) Produced. *Applied Catalysis A: General*, v. 392, p. 136–142, 2011.

ROTH, W. J.; VARTULI, J. C. Synthesis of Mesoporous Molecular Sieves. *Studies in Surface Science and Catalysis*, v. 157, p. 91, 2005.

SALIHU, A.; ALAM, MD. Z. Solvent tolerant lipases: A review. *Process Biochemistry,* v. 50, p. 86-96, 2015.

SALIS, A. et al. Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 57, p. 262–26, 2009.

SALIS, A. et al. Physical and chemical lipase adsorption on SBA-15: Effect of different interactions on enzyme loading and catalytic performance. *ChemCatChem Catalysis*, v. 2, p. 322-329, 2010.

SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; BASRI, M. *New lipases and proteases*. New York, Nova Science Publishers, Inc; 2006.

ŠÁNEK, L. et al. Biodiesel production from tannery fleshings: Feedstock pretreatment and process modeling. *Fuel*, v. 148, p. 16-24, 2015.

SANTOS, E. M. et al. Low linolenic soybeans for biodiesel: Characteristics, performance and advantages. *Fuel*, v. 104, p. 861-864, 2013.

SARAF, S.; THOMAS, B. Influence of feedstock and process chemistry on biodiesel quality. *Process Safety and Environmental Protection,* v. 85, p. 360-364, 2007.

SASOL, 2018. *Doped Aluminas*. Disponível em: <http://www.sasolgermany.de/fileadmin/doc/alumina/0271.SAS-BR-Inorganics_Siral_Siralox_WEB.pdf> Acesso em: 15 abr 2018.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie-International Edition,* v. 37, n. 12, p. 1608–1633, 1998.

SECUNDO, F. et al. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. *Microporous and Mesoporous Material*, v. 109, n. 1-3, p. 350-361, 2008.

SEGEL, I. H. *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. [S.I.] John Wiley & Sons Inc., 1993, p. 606-608.

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

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal*, v. 2014, p. 1-15, 2014.

SHRESTHA, D.; GERPEN, J. V. *Biodiesel from oilseed crops*. In: SINGH, B. P. Industrial Crops and Uses. [S.l.]: CABI, cap. parte II, p. 144-145, 2010.

SHURVELL, H. F. *Spectra–Structure Correlations in the Mid- and Far-infrared*. In: Handbook of Vibrational Spectroscopy, v. 3, CHALMERS, J. M. and GRIFFITHS, P. R. (Eds), Wiley, Chinchester, UK, 2002, p. 1783-1816.

SILVA, J. R. *Avaliação do potencial de preparado enzimático sólido de Yarrowia lipolytica em reações de síntese de ésteres alquílicos de ácidos graxos.* Dissertação de Mestrado - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 112 p., 2016.

SILVA, N. C. A. et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 82, p. 139–149, 2014.

SIM, J. H. et al. Biodiesel (FAME) productivity, catalytic, efficiency and thermal stability of Lipozyme TL IM for crude palm oil transesterification with methanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 87, p. 1027-1034, 2010.

SIMAS, A. B. C. et al. Kinetic resolution of (±)-1,2-O-isopropylidene-3,6-di-O-benzyl-myo-inositol by lipases: An experimental and theoretical study on the reaction of a key precursor of chiral inositols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 70, p. 32-40, 2011.

SITEPU, I. R. et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*, v. 32, p. 1336-1360, 2014.

SOARES, C. A. *Produção de biodiesel a partir de carga ácida por via enzimática em reator de leito fixo.* Dissertação de Mestrado - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 101 p., 2015.

SONG, H. T.; JIANG, Z. B.; MA, L. X. Expression and purification of two lipases from *Yarrowia lipolytica* AS 2.1216. *Protein Expression and Purification*, v. 47, p. 393-397, 2006.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U .T. Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 105, p. 656-660, 2003.

SOUZA M. S. et al. Biodiesel synthesis via esterification of feedstock with high content of free fatty acids. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* v. 154, p. 253-267, 2009.

SOUZA, M. C. M. *Imobilização de lipase de Candida antarctica do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres*. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Ceará, 88 p., 2013.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, p. 87-96, 2006.

STERGIOU, P. Y. et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnology Advances*, v. 31, p. 1846-1859, 2013.

STOYTCHEVA, M. et al. *The immobilized lipases in biodiesel production*. In: Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies. InTech, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/biodiesel-feedstocks-and-processing-technologies/the-immobilized-lipasesin-biodiesel-production>.

STRAATHOF, A.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current opinion in biotechnology*, v. 13, n. 6, p. 548-556, 2002.

SUN, J. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic medium. *New Biotechnology*, v. 27, n. 1, p. 53-58, 2010.

SZYMANSKA, K. et al. Application and properties of siliceous mesostructured cellular foams as enzymes carriers to obtain sufficient biocatalysts. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 99, p. 167-175, 2007.

TACIAS-PASCACIO, V. G. et al. Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. *Fuel*, v. 200, p. 1-10, 2017.

TAFESH, A.; BASHEER, S. Pretreatment methods in biodiesel production process. In: FANG, Z. *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries*. New York: Springer, 2013. Cap. 18, p. 417-434.

TAKASE, M. et al. An expatiate review of neem, jatropha, rubber and karanja as multipurpose non-edible biodiesel resources and comparison of their fuel, engine and emission properties. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 43, p. 495-520, 2015.

TALBERT, J. N; GODDARD, J. M. Enzymes on material surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 93, p. 8-19, 2012.

TALEBIAN-KIAKALAIEH, A.; AMI, N. A. S.; MAZAHERI, H. A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. *Applied Energy*, v. 104, p. 683-710, 2013.

TALUKDER, MD. M. R. et al. Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods. *Journal of Molecular. Catalysis B: Enzymatic,* v. 60, n. 3-4, p. 106-112, 2009.

TALUKDER, MD. M. R. et al. Enhanced enzymatic transesterification of palm oil to biodiesel. *Biochemical Engineering Journal*, v. 55, p. 119–122, 2011.

TAN, T. W. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances***,** v. 28, n. 6, p. 937-937, 2010.

TEIXEIRA, D. A. et al. A rapid enzyme-catalyzed pretreatment of the acidic oil of macauba (*Acrocomia aculeata*) for chemoenzymatic biodiesel production. *Process Biochemistry*, v. 53, p. 188-193, 2017.

TODERO, L. M. et al. Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles: optimization, reusability and mass transfer studies. *Bioprocess and Biosystems Engineering,* v. 38, p. 1601-1613, 2015.

TRODLER, P.; PLEISS, J. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC structural biology*, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2008.

UPPENBERG, J. et al. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, v. 2, n. 4, p. 293-308, 1994.

UPPENBERG, J., et al. Crystallographic and molecular modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry,* v. 34, p. 16838-16851, 1995.

VAN DE WEERT, M. et al. Fourier transform infrared spectrometric analysis of protein conformation: effect of sampling method and stress factors. *Analytical Biochemistry*, v. 297, n. 2, p. 160–169, 2001.

VAN GERPEN, J. Biodiesel processing and production. *Fuel Process Technology*, v. 86, n. 10, p. 1097-1107, 2005.

VASCONCELLOS, A. et al. Synergistic effect in the catalytic activity of lipase *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolites for the production of biodiesel. *Microporous and Mesoporous Materials,* v. 163, p. 343-355, 2012.

VASCONCELLOS, A. et al. Potential new biocatalysts for biofuel production: The fungal lipases of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolitic supports ion exchanged with transition metals. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 214, p. 166-180, 2015.

VELJKOVIć, V. B. et al. Biodiesel production from tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) seed oil with a high content of free fatty acids. *Fuel*, n. 85, p. 2671-2675, 2006.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts. *Trends in Biotechnology,* v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.

VILLENEUVE, P. et al. Review: Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* v. 9, n. 4-6, p. 113–148, 2000.

XU, Y.; DU, W.; LIU, D. Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 32, n. 5-6, p. 241-245, 2005.

ZHANG, D. H. et al. Improving immobilization of lipase onto magnetic microspheres with moderate hydrophobicity/hydrophilicity. *Colloids Surface B Biointerfaces*, v. 89, p. 73-78, 2012.

ZHAO, T. et al. Novel strategy for lipase-catalyzed synthesis of biodiesel using blended alcohol as an acyl acceptor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 107, p. 17–22, 2014.

ZHAO, X. et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 44, p. 182-197, 2015.

ZHENG, MM. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. *Bioresource Technology*, v. 115, n. 1, p. 141-146, 2012.

ZHOU, Z. et al. Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. *Microporous Mesoporous Material*, v. 154, n. 1, p. 133-141, 2012.

ZHU, Q.; JACKSON, E. N. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 36, p. 65-72, 2015.

ZOU, B. et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto ionic liquid modified mesoporous silica SBA-15. *Biochemical Engineering Journal*, v. 53, n. 1, p. 150-153, 2010.

WANG, X. et al. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase–nanoparticle biocomposite. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 6352-6355, 2011a.

WANG, X. et al. Immobilization and catalytic activity of lipase on mesoporous silica prepared from biocompatible gelatin organic template. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 357, n. 15, p. 3027-3032, 2011b.

WANG, C. et al. Biocatalytic esterification of caprylic acid with caprylic alcohol by immobilized lipase on amino-functionalized mesoporous silica. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,* v. 406, p. 75-83, 2012.

WANG, L. et al. Preparation of a novel carbon-based solid acid from cassava stillage residue and its use for the esterification of free fatty acids in waste cooking oil. *Bioresource Technology*, v. 158, p. 392-395, 2014.

YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A. N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. *Chemical Enginnering Journal*, v. 134, p. 262-267, 2007.

YAN, Y.; ZHANG, X.; CHEN, D. Enhanced catalysis of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 immobilized on macroporous resin and its application in enrichment of polyunsaturated fatty acids. *Bioresource Technology*, v. 131, p. 179-187, 2013.

YIN, P. et al. Efficient bifunctional catalyst lipase/organophosphonic acid-functionalized silica for biodiesel synthesis by esterification of oleic acid with ethanol. *Bioresource Technology*, v. 140, p. 146-151, 2013.

YU, D. et al. Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 519–525, 2010.

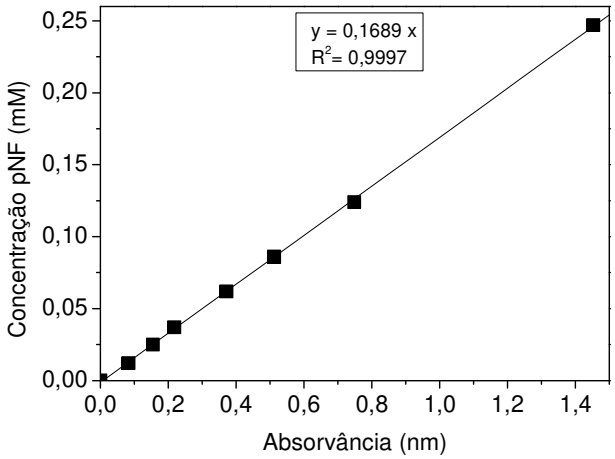
YU, M.; QIN, S.; TAN, T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 384-391, 2007.

YU, W. H. et al. Immobilization of *Candida rugosa lipase* on hexagonal mesoporous silicas and selective esterification in nonaqueous medium. *Biochemical Engineering Journal*, v. 70, p. 97-105, 2013.

YÜCEL, S.; TERZIOĞLU, P.; ÖZÇIMEN, D. Lipase applications in Biodiesel Production. In: FANG, Z. *Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications*, InTech, cap. 8, p. 209-250, 2012.

APÊNDICE A – Curva padrão para determinação da atividade hidrolítica

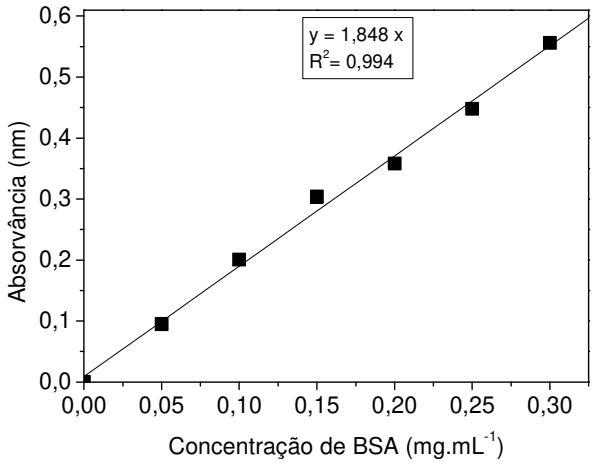
Figura 61– Curva padrão de p-nitrofenol para dosagem de atividadede lipase



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

APÊNDICE B – Curva padrão para determinação da concentração de proteína

Figura 62– Curva padrão de BSA para dosagem de proteína



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.