

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LETÍCIA PASSOS MIRANDA

COMPÓSITOS RETICULADOS DE EVERSA[®] TRANSFORM E
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS COMO
BIOCATALISADORES PARA A SÍNTESE DE BIODIESEL EM
REATOR DE FLUXO EM VÓRTICES

SÃO CARLOS-SP

2020

LETÍCIA PASSOS MIRANDA

COMPÓSITOS RETICULADOS DE EVERSA[®] TRANSFORM E
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS COMO
BIOCATALISADORES PARA A SÍNTESE DE BIODIESEL EM
REATOR DE FLUXO EM VÓRTICES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química para obtenção do título de doutor em Engenharia Química. Área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli

SÃO CARLOS-SP

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Letícia Passos Miranda, realizada em 30/10/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli (UFSCar)

Profa. Dra. Denise Maria Guimarães Freire (UFRJ)

Profa. Dra. Débora de Oliveira (UFSC)

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes (UNIFAL)

Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciotori (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

*Dedico esse trabalho a minha eterna
"Bonitinha", Vó Nonoca.
Meu maior exemplo de determinação,
sabedoria e fé.
A ela que mais se orgulha(va) dessa
conquista!
Saudades, sempre...*

AGRADECIMENTOS

À Deus por nunca ter me desamparado e sempre me ensinando que com Fé tudo se vence! Obrigada meu Senhor pela vida e pela conquista!

À minha avó Nonoca, que hoje faz morada junto ao Pai, mas acompanhou essa jornada quase toda. Quando reclamava ela sempre tinha uma palavra de consolo e incentivo, torcia a cada conquista com muito orgulho!

Aos meus pais, Odon e Aparecida, por acreditarem em mim, me incentivarem e não pouparem esforços. Pai obrigada pelas duras palavras quando necessário e mãe por me compreender sempre. As minhas irmãs Thaís e Déborah, meus exemplos de determinação e foco! Vocês são meu orgulho! Dedé obrigada pelo alto astral e parceria nos momentos de sufoco. Branquela, não existe palavras que descrevem o que fez e faz por mim, por nós, gratidão!

À Sofia, o amor incondicional da tia, minha parceirinha, a alegria das nossas vidas!

A toda minha família Passos, meu ponto de apoio físico e emocional! Vocês foram essenciais para que completasse essa jornada! Tia Dinda e Tio Léo, obrigada por tudo!

À minha avó Edith, que com seus 96 anos não via a hora desse dia chegar! Obrigada por ceder o quartinho para que eu escrevesse a Tese, pelos lanchinhos e aquela preocupação de vó!

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli pela confiança em mim depositada, pela orientação compartilhando ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pelo apoio e incentivo durante a realização da pesquisa.

Aos colegas do LabEnz 1 e 2, foram anos de muito aprendizado ao lado de todos! Obrigada pela disponibilidade e por contribuírem com este trabalho.

Aos amigos que fiz em Sanca: Laiane, Thalita, Murilo, Vitor, Thais, Cintia, Renato, Kaique, Sheyla, Manu, Taise, Mayara, Carol, Bruna, Fernanda. Obrigada pela amizade, por estarem presentes nas frustrações e nas conquistas, pelos conselhos e por toda a diversão!

A Carlota e sua família (Felipe, Felipinho, Juan e Carlos). Obrigada por me acolherem e cuidarem tão bem de mim. Foram a minha extensão de família em São Carlos e ainda ganhei um afilhado!

À “grande família” AP 35, Mateus, Josivan, Thiago, Erick, Ana, Maria Carolina, Martha, Mayerlenis, Margarita, Renata, Juliana, Ediane, Vanessa, Laís, Daniel, Gabriel, Davi,

Naty, Mariane. Obrigada por tornarem o dia a dia mais leve, com muitas tardes feliz (gordices), festinhas de aniversariantes e cafés para dar conta dos dias que pareciam eternos!

Às amigas Vanessa, Nah, Be, Tats, Fran, Sil, e Selena, e a Snard, apesar da enorme distância foram por muitas vezes meu refúgio nos desabafos e grandes incentivadores.

Aos técnicos, cujo trabalho e dedicação possibilitaram a realização deste trabalho.

A UFSCar, seus docentes e funcionários e ao PPG-EQ, sem os quais nada disso seria possível.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo número 2016/10636-8), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, projetos números 405889/2016-0 e 308212/2017-7) pelo apoio financeiro.

“Se a sua Coragem negar-lhe, vá além de sua Coragem.”
(Emily Dickinson)

RESUMO

A produção enzimática de biodiesel é uma alternativa promissora à produção convencional pela rota alcalina em meio homogêneo. O processo enzimático permite a utilização de matéria-prima com qualquer concentração de ácidos graxos livres devido à especificidade das lipases e ao menor consumo de energia, pelo fato das enzimas atuarem em condições suaves de temperatura. As formulações líquidas de lipase de *Thermomyces lanuginosus*, Eversa® Transform e Eversa® Transform 2.0 foram lançadas pela Novozymes A/S para serem usadas produção de biodiesel na sua forma livre. Após a caracterização das duas formulações, foi identificado que ambas são muito semelhantes, diferindo-se na maior estabilidade térmica da segunda formulação, sendo esta utilizada para dar segmento a este trabalho. A imobilização de enzimas pode melhorar seu desempenho na produção do biodiesel, além de viabilizar a recuperação e reuso do biocatalisador. Neste trabalho, a lipase presente na formulação de Eversa foi imobilizada pela técnica de agregados enzimáticos reticulados (CLEAs), uma técnica simples, econômica e sem suporte, capaz de gerar biocatalisadores insolúveis com alta atividade volumétrica e estabilidade aprimorada. As condições de preparo foram aprimoradas a fim de melhorar as propriedades do biocatalisador. Foram avaliados a natureza do precipitante e concentração do agente reticulante. Para melhorar a etapa de reticulação, albumina de soro bovino (BSA), proteína de soja (PS) ou polietilenoimina (PEI) foram coprecipitados e avaliados como aditivos. O amido (posteriormente degradado enzimaticamente) foi utilizado como um agente porogênico para diminuir as limitações de difusão do substrato. Nanopartículas magnéticas de sílica funcionalizadas com grupos aminos e octilas (NPMSs) também foram utilizadas para simplificar o manuseio dos CLEAs, as quais são incorporadas aos CLEAs por ligações inter e intra partícula-enzima com glutaraldeído com reagente bifuncional, mas também, uma porcentagem da enzima é adsorvida às nanopartículas antes da agregação. O melhor CLEA foi preparado com PEI, amido e NPMSs (Eversa m-CLEA). Nestas condições, obteve-se um biocatalisador com rendimento de imobilização de 98,9%, atividade recuperada de 30,1%, estrutura porosa e com uma estabilidade térmica a 70 °C 40 vezes superior à da enzima livre. Na reação de transesterificação de óleo de soja refinado com etanol anidro (razão molar óleo/etanol 1:6), o melhor desempenho obtido foi empregando 12 $U_{est}/g_{\text{óleo}}$ de Eversa m-CLEA à 40°C. Um rendimento mássico de 89,8% de ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAGs) foi encontrado após 12 h de reação, enquanto a enzima solúvel necessitou de 48 h de reação para dar o mesmo rendimento. Uma etapa de polimento cáustico do produto rendeu um biodiesel contendo 98,9% (m/m) de EEAGs e um teor de ácidos graxos livres (AGLs) inferior a 0,25% (m/m), atendendo aos padrões internacionais para que o biodiesel possa ser comercializado como biocombustível. O biocatalisador imobilizado pode ser reutilizado por pelo menos cinco ciclos de 12 h, mantendo 89,6% do rendimento do primeiro ciclo, mostrando a recuperação eficiente do catalisador pela aplicação de um campo magnético externo. A partir de um delineamento experimental (DCCR)²³, foi-se capaz de definir uma faixa de valores otimizados para a produção do biodiesel enzimático usando também o Eversa m-CLEA, porém na transesterificação de matérias-primas não refinadas, o óleo de soja degomado e etanol hidratado. A uma razão molar óleo/etanol 1:6, 4 $U_{est}/g_{\text{óleo}}$, a 40°C, foi obtido um rendimento mássico de 81,45% de EEAGs, com um teor de AGLs de 3,9% após 24 h de reação. Após o polimento cáustico obteve-se um rendimento mássico de 89,88% de EEAGs, e um teor de AGLs de 0,17% (m/m). A utilização do Eversa m-CLEA, um biocatalisador de fácil recuperação e reuso, juntamente com matérias-primas não refinadas, de menor valor agregado, é uma combinação promissora que visa contribuir com a viabilidade econômica da rota enzimática na busca de torná-la competitiva em relação a rota alcalina tradicionalmente usada.

Palavras-chave: lipases; Eversa; CLEAs magnéticos; imobilização; etanólise; biodiesel

ABSTRACT

The enzymatic production of biodiesel is a promising alternative to the conventional production by the alkaline route in a homogeneous medium. The enzymatic process allows using raw material with any concentration of free fatty acids due to the specificity of the lipases and lower energy consumption, because the enzymes act at mild temperature conditions. The liquid formulations of lipase from *Thermomyces lanuginosus*, Eversa® Transform and Eversa® Transform 2.0, were launched by Novozymes A/S to be used in the biodiesel production in their free forms. After characterizing the two formulations, it was identified that both are very similar, differing in the greater thermal stability of the second formulation, which is used to give segment to this work. The immobilization of enzymes can improve their performance in the production of biodiesel, in addition to enabling the recovery and reuse of the biocatalyst. In this work, Eversa lipase was immobilized by the technique of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), a simple, economical and unsupported technique, capable of generating insoluble biocatalysts with high volumetric activity and improved stability. The preparation conditions were optimized in order to improve the properties of the biocatalyst. The nature of the precipitant and concentration of the crosslinking agent were evaluated. To improve the crosslinking step, bovine serum albumin (BSA), soy protein (SP) or polyethyleneimine (PEI) were co-precipitated and evaluated as co-feeders and additives. Starch (later enzymatically degraded) was used as a porogenic agent to reduce the diffusion limitations of the substrate. Magnetic silica nanoparticles functionalized with amino-octyl groups (MNPS) were also used to simplify the handling of CLEA, which are incorporated into the CLEAs by inter and/or intra crosslinks particle-enzyme with glutaraldehyde as bifunctional agent, but a great percentage of enzyme could also be adsorbed on the nanoparticle surface before the aggregation step. The best CLEA was prepared using PEI, starch and MNPS (Eversa m-CLEA). Under these conditions, the biocatalyst showed an immobilization yield of 98.9%, recovered activity of 30.1%, a porous structure, and a thermal stability at 70°C around 40-fold higher than that of the free enzyme. In the transesterification reaction of refined soybean oil with anhydrous ethanol (molar ratio oil/ethanol 1:6), the best performance obtained was using 12 Uest/oil of Eversa m-CLEA at 40°C. A mass yield of 89.8% of fatty acid ethyl esters (FAEE) was found after 12 h of reaction, while the soluble enzyme required 48 h of reaction to give the same yield. A caustic polishing step of the product yielded a biodiesel containing 98.9 wt.% of FAEEs and a content of free fatty acids (FFAs) below 0.25 wt.%, meeting the international standards of a biodiesel to be commercialized as biofuel. The immobilized biocatalyst could be reused for at least five cycles of 12 h, maintaining 89.6% of the first-cycle mass yield, showing the efficient recovery of the catalyst by applying an external magnetic field. From an experimental design (DCCR)²³, it was possible to define a range of optimized values to produce enzymatic biodiesel using also Eversa m-CLEA, however in the transesterification of raw materials oil, degummed soy oil, and hydrated ethanol. At a molar ratio oil/ethanol of 1:6, 4 Uest/oil at 40 °C, a mass yield of 81.45 wt.% of FAEEs, with a FFAs content of 3.9 wt.% was obtained after 24h of reaction. After a caustic polishing, a yield of 89.88 wt.% of FAEEs with a FFAs content of 0.17 wt.% was obtained. The use of Eversa m-CLEA, a biocatalyst that is easy to recover and reuse, together with unrefined raw materials with lower added value, is a promising combination to contribute to the economic viability of the enzymatic route, aiming to make it competitive to the traditional alkaline route.

Keywords: lipases; Eversa; magnetic CLEAs; immobilization; ethanolysis; biodiesel

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Panorama geral da tese	21
Figura 2.1- Evolução da produção de biodiesel (B100) – 2010-2019.....	23
Figura 2.2 – Reações para a síntese de éster alquílico de ácido graxo (biodiesel) catalisada por lipases. A) Esterificação dos ácidos graxos e álcool. B) Transesterificação de triglicerídeos e álcool. R ₁ , R ₂ , R ₃ , R' representam as cadeias carbônicas dos ácidos graxos e álcool.....	26
Figura 2.3 – Métodos de imobilização de enzimas	29
Figura 2.4 – Preparação dos agregados enzimáticos reticulados (CLEAs).....	31
Figura 2.5- Reator de Fluxo em Vórtice.....	39
Figura 3.1 - Gel de eletroforese (SDS-PAGE 12%) de Eversa Transform e Eversa Transform 2.0.	47
Figura 3.2 - Efeito do pH nas atividades da Eversa Transform (●) e Eversa Transform 2.0 (■) livres. Atividade determinada pela hidrólise de tributirina (concentração enzimática de 5 mg/mL, 37°C, tampão fosfato de sódio, 100 mM).	48
Figura 3.3 - Efeito da temperatura nas atividades da Eversa Transform (●) e Eversa Transform 2.0 (■) livres. Atividade determinada pela hidrólise de tributirina (concentração enzimática de 5 mg/mL, pH 7,5, tampão fosfato de sódio 100 mM).	48
Figura 3.4 - Perfil de inativação térmica da Eversa Transform a 50 °C (■) e 60 °C (●). Condições de ensaio: concentração enzimática de 5 mg/mL, pH 7,0, tampão fosfato de sódio 100 mM. A atividade da solução inicial da enzima (0h) foi considerada como 100%. Atividades hidrolíticas foram medidas com a tributirina como substrato.	49
Figura 3.5 - Perfil de inativação térmica da Eversa Transform 2.0 a 60 °C (■) e 70 °C (●). Condições de ensaio: concentração enzimática de 5 mg/mL, pH 7,0, tampão fosfato de sódio 100 mM. A atividade da solução inicial da enzima (0h) foi considerada como 100%. Atividades hidrolíticas foram medidas com a tributirina como substrato.	49
Figura 3.6 - Efeito de surfactantes na atividade hidrolítica da lipase Eversa Transform. Condições de ensaio: concentração de enzima de 1,5 mg/mL em tampão de fosfato de sódio 5 mM, pH 7, 4 °C, 150 rpm. A atividade da solução inicial da enzima (sem surfactante) foi considerada como 100%.	50
Figura 4.1 - Avaliação da natureza e razão volumétrica solução enzimática/precipitante na precipitação da Eversa. (a) Rendimento de precipitação da atividade (R _{ppt} , Equação (4.1)) e (b) atividade recuperada após a redissolução dos precipitados (AR _p , Equação (4.2)). Condições de precipitação: 4 °C, 150 rpm, solução enzimática 1,5 mg/mL em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7. Nota: As médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (p <0,05). As atividades hidrolíticas foram medidas usando a tributirina como substrato (Seção 4.2.2).....	65
Figura 4.2 - (a) Rendimentos de imobilização (RI, Equação (4.3)) e (b) atividade recuperada (AR, Equação (4.4)) dos agregados enzimáticos reticulados de Eversa (CLEAs) preparados sem e com co-feeders de proteínas (soro bovino albumina (BSA), proteína de soja (PS)) ou	

com nanopartículas magnéticas de sílica (NPMSs). Condições experimentais: 5 mg/mL de solução enzimática, razão mássica proteína/co-feeder ou aditivo de 1:1. Precipitação com etanol (razão volumétrica 1:3 solução enzimática/etanol), 4 °C, 150 rpm, 30 min de precipitação, seguida de um tratamento de 2,5 horas com glutaraldeído. As atividades hidrolíticas foram medidas usando a tributirina como substrato (Seção 4.2.2).....	66
Figura 4.3 - Imagens de MEV dos CLEAs coagregados com polietilenoimina, amido e (a) nanopartículas magnéticas de sílica (razão mássica enzima/nanopartículas 1:1) ou (b) albumina de soro bovino (razão mássica enzima/BSA 1:1). Os CLEAs foram preparados nas mesmas condições.	69
Figura 4.4 - Efeito da temperatura nas atividades da Eversa solúvel (■) e Eversa-mCLEA (●). A atividade foi determinada pela hidrólise da tributirina (concentração da enzima solúvel de 5 mg/mL ou 10 mg de Eversa-mCLEA, em tampão fosfato de sódio, 100 mM pH 7,0)....	70
Figura 4.5 - Efeito do pH nas atividades da Eversa solúvel (■) e Eversa-mCLEA (●). A atividade foi determinada pela hidrólise da tributirina (concentração da enzima solúvel de 5 mg/mL ou 10 mg de Eversa-mCLEA, em tampão fosfato de sódio, 100 mM, pH 7,0).....	70
Figura 4.6 - Perfil de inativação térmica a 70 °C da Eversa solúvel (■) e Eversa-mCLEA (●). Condições de ensaio: concentração da enzima solúvel de 5 mg/mL ou 10 mg de Eversa-mCLEA, tampão fosfato de sódio, 100 mM pH 7,0. A atividade da solução inicial da enzima foi considerada como 100%. As atividades hidrolíticas foram medidas usando a tributirina como substrato.....	71
Figura 4.7 - Perfis de concentração molar de ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAGs), triglicerídeos (TAGs), diglicerídeos (DAGs) e monoglicerídeos (MAGs) determinados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV) (Seção 4.2.9) na transesterificação do óleo de soja com etanol catalisada por (a) Eversa solúvel, (b) Eversa-mCLEA e (c) Eversa-BSACLEA. (d) Perfis de rendimento mássico de EEAGs (% m/m) determinados por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID) (Seção 4.2.10). Condições de reação: 15 g de óleo de soja, razão molar óleo/etanol 1:6, 3 U _{est} /g _{óleo} , 5% (m/m _{óleo}) de água, 35 °C e 1500 rpm em reator de fluxo em vórtice. Os valores são expressos como a média de triplicados ± dp.	73
Figura 4.8 - Perfis de rendimento de EEAGs para a transesterificação do óleo de soja (15 g) com etanol (razão molar óleo/etanol de 1:6) catalisada por Eversa-mCLEA-CLEA a 40 °C e agitação de 1700-2000 rpm em um reator de fluxo em vórtice.....	74
Figura 4.9 - Perfil de rendimento de EEAGs para a transesterificação do óleo de soja (15 g) com etanol (razão molar óleo/etanol de 1:6) catalisada pela Eversa solúvel a 40 °C e 1700-2000 rpm em um reator de fluxo em vórtice usando uma carga enzimática de 7 U _{est} /g _{óleo}	75
Figura 4.10 - Ensaio de reutilização (ciclos de 12 h) do Eversa-mCLEA na transesterificação do óleo de soja (15 g) com etanol (razão molar óleo/etanol de 1:6), carga enzimática 12 U _{est} /g _{óleo} a 40 °C e 1700-2000 rpm em um reator de fluxo em vórtice. As barras representam os rendimentos de EEAGs e a curva pontilhada representa o conteúdo de AGLs.....	77
Figura 5.1 - Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento. Os resultados foram analisados pelo software Statistic e apresentados em gráfico de Pareto (95% de confiança da análise de variância (ANOVA)).	91

Figura 5.2 – Superfícies de resposta para os efeitos das variáveis independentes no rendimento de EEAG. (A) Temperatura e razão molar óleo/etanol, (B) temperatura e carga enzimática, e (C) carga enzimática e razão molar óleo/etanol.	92
Figura 5.3 - Perfil dos valores previstos/otimizados e da função de desejabilidade para o planejamento.....	93
Figura 5.4 - Avaliação da razão molar óleo/etanol hidratado no perfil de rendimento de EEAGs para a transesterificação do óleo de soja degomado (15 g) catalisado por Eversa-mCLEA, 4 U _{est} /g _{óleo} a 40 °C e agitação de 1700-2000 rpm em um reator de fluxo em vórtice.	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Algumas especificações do Biodiesel, segundo resolução EN 14214 (União Europeia).	24
Tabela 2.2 – Diferentes condições no preparo de CLEAs de lipases	34
Tabela 2.3 – Produção de biodiesel usando lipases líquidas a partir de diferentes matérias-primas e condições reacionais.	37
Tabela 3.1 - Concentração de proteínas e atividade hidrolítica das formulações de Eversa transform. Os valores são expressos como média de duplicatas \pm desvio padrão.....	47
Tabela 4.1 - Efeito do polietilenoimina (PEI), amido e dos aditivos albumina de soro bovino (BSA) ou nanopartículas magnéticas de sílica (NPMSs) sobre os rendimentos de imobilização (RIs) e atividades recuperadas (ARs) nos CLEAs de Eversa e atividade de esterificação dos biocatalisadores.	68
Tabela 5.1 - Níveis de fatores independentes para projeto composto central	85
Tabela 5.2 - Planejamento experimental da reação de transesterificação usando o biocatalisador.	89
Tabela 5.3 - Análise de variância (ANOVA) para o DCCR23 para avaliar o rendimento de ésteres etílicos de ácidos graxos por transesterificação de óleo de soja usando Eversa-mCLEA	90
Tabela 5.4 - Ensaio de validação do modelo matemático usando Eversa-mCLEA na transesterificação do óleo de soja (2 g) com etanol (razão molar óleo/etanol de 1:11), carga enzimática 4 U _{est} /g _{óleo} a 40 °C e 250 rpm em um shaker orbital.	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL: Ácido graxo livre

AR: Atividade Recuperada

ASTM: American Society for Testing and Materials

BSA: Albumina de soro bovino

CALB: Lipase B de *Candida antarctica*

CLEA: Cross-linked enzyme aggregate (agregados enzimáticos reticulados)

DAG: Diacilglicerídeo

DCCR: Delineamento composto central rotacional

EEAG: Éster etílico de ácido graxo

EMAG: Éster metílico de ácido graxo

ET: Eversa Transform

EtOH: Etanol

Eversa-BSA-CLEA: CLEA de Eversa preparado na presença de BSA

Eversa-mCLEA: CLEA de Eversa preparado na presença de NPMSs

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

IS: Índice de saponificação

KOH: Hidróxido de Potássio

MAG: Monoacilglicerídeo

MeOH: Metanol

NaOH: Hidróxido de Sódio

NPMS: Nanopartícula magnética de sílica

PEG: Polietilenoglicol

PEI: Polietilenoimina

PS: Proteína de soja

RFV: Reator de fluxo em vórtice

RI: Rendimento de imobilização

rpm: Rotação por minuto

SDS: sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio)

TAG: Triacilglicerídeo

TBU: Unidade de hidrolise de tributirina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Biodiesel.....	23
2.1.1 Biodiesel enzimático.....	25
2.2 Lipases.....	27
2.3 Imobilização de enzimas	29
2.3.1 Agregados enzimáticos reticulados (CLEAs).....	31
2.4 Lipase Eversa® Transform	35
2.5 Reator de fluxo em vórtice.....	39
3. CARACTERIZAÇÃO DAS FOMULAÇÕES LÍQUIDAS DE EVERSA® TRANSFORM E EVERSA® TRANSFORM 2.0.....	42
3.1 Introdução	42
3.2 Materiais e métodos	44
3.2.1 Materiais	44
3.2.2 Atividade Enzimática.....	44
3.2.3 Ensaio de proteína.....	44
3.2.4 Eletroforese SDS-PAGE.....	45
3.2.5 Efeito do pH e temperatura na atividade hidrolítica e estabilidade térmica das lipases solúveis	46
3.2.6 Efeito dos surfactantes na atividade da enzimática	46
3.3 Resultados e discussão	46
3.3.1 Determinação das massas moleculares	46
3.3.2 Atividades específicas das formulações	47
3.3.3 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática	47
3.3.4 Estabilidade térmica.....	48
3.4 Conclusão.....	50
4. COMPÓSITOS DE AGREGADOS RETICULADOS DE EVERSA® TRANSFORM E NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS. DESEMPENHO NA ETANÓLISE DO ÓLEO DE SOJA	51
4.1 Introdução	51
4.2 Materiais e métodos	56
4.2.1 Materiais	56
4.2.2 Atividade Enzimática.....	56
4.2.3 Seleção do agente precipitante.....	57

4.2.4	Procedimento de preparação dos CLEAs de Eversa.....	58
4.2.4.1	Ensaio Padrão	58
4.2.4.2	Avaliação de co-feeders proteicos e nanopartículas magnéticas.....	58
4.2.4.3	Avaliação do PEI como co-feeder na preparação dos CLEAs de Eversa	59
4.2.4.4	Avaliação do amido como agente porogênico	59
4.2.4.5	Efeito dos parâmetros de imobilização sobre a atividade dos CLEAs de Eversa	59
4.2.5	Microscopia Eletrônica de Varredura do CLEAs	60
4.2.6	Efeito do pH e temperatura na atividade hidrolítica e estabilidade térmica dos CLEAs de Eversa	60
4.2.7	Transesterificação do óleo de soja com etanol usando a Eversa solúvel e CLEAs	61
4.2.7.1	Estabilidade operacional do Eversa-mCLEA na reação de transesterificação.....	61
4.2.7.2	Polimento cáustico do biodiesel	62
4.2.8	Determinação dos ácidos graxos livres.....	62
4.2.9	Análise de HPLC das reações de produção de biodiesel	62
4.2.10	Análises de cromatografia gasosa das reações de produção de biodiesel	63
4.3	Resultados e discussão	64
4.3.1	Preparação de CLEAs de Eversa	64
4.3.1.1	Seleção do precipitante.....	64
4.3.1.2	Avaliação de co-feeders, aditivo e concentração de glutaraldeído na preparação de CLEAs de Eversa	65
4.3.1.3	Uso de PEI como co-feeder polimérico e amido como agente porogênico	67
4.3.2	Caracterização do Eversa-mCLEA.....	69
4.3.3	Transesterificação do óleo de soja com etanol usando Eversa solúvel e imobilizada..	71
4.3.4	Ensaio de reutilização do Eversa-mCLEA na produção de biodiesel	76
4.4	Conclusão.....	77
4.5	Material Suplementar	78
4.5.1	Perfil de adsorção da Eversa Transform 2.0 em nanopartículas magnéticas funcionalizadas com grupos octilas e aminos (NPMSs)	78
4.5.2	Perfil de inativação de Eversa Transform 2.0 solúvel	79
4.5.3	Teor de água nas reações de transesterificação de óleo de soja com etanol usando a Eversa livre e CLEA magnético de Eversa (Eversa-mCLEA).....	80
5.	ETANÓLISE DO ÓLEO DE SOJA DEGOMADO UTILIZANDO CLEA MAGNÉTICO DE EVERSA® TRANSFORM	81
5.1	Introdução	81
5.2	Materiais e Métodos.....	83
5.2.1	Materiais	83

5.2.2	Atividade enzimática	84
5.2.3	Preparo do CLEA magnético de Eversa	84
5.2.4	Planejamento experimental.....	85
5.2.5	Transesterificação do óleo de soja degomado com etanol hidratado usando Eversa-mCLEA	86
5.2.6	Reuso da fase apolar na esterificação com a Lipozyme 435	86
5.2.7	Transesterificação e esterificação simultâneas usando Eversa m-CLEA e Lipozyme 435	86
5.2.8	Polimento cáustico do biodiesel	87
5.2.9	Determinação dos ácidos graxos livres.....	87
5.2.10	Índice de saponificação.....	87
5.2.11	Análises de cromatografia gasosa das reações de produção de biodiesel	88
5.3	Resultados e Discussão	89
5.3.1	Determinação das condições ótimas de produção de biodiesel por planejamento experimental usando óleo de soja refinado e etanol anidro.....	89
5.3.2	Avaliação do óleo de soja degomado e etanol hidratado na reação de transesterificação	93
5.3.3	Estratégias para polimento das reações de transesterificação.....	96
5.4	Conclusão.....	97
6.	CONCLUSÕES GERAIS	98
7.	REFERÊNCIAS	100

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse na produção de combustíveis alternativos, como o biodiesel, tem aumentado principalmente pelos problemas ambientais associados ao uso de combustíveis fósseis: poluição e aquecimento global (ERDIWANSYAH et al., 2019; SINGH et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

No Brasil, o biodiesel foi introduzido na matriz energética pela obrigatoriedade de misturá-lo ao óleo diesel, sendo que atualmente a sua adição está em 12% em volume (ANP, 2020a; BIODIESELBR, 2014).

O biodiesel é obtido pela transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais ou esterificação de ácidos graxos com álcoois de cadeia curta, empregando um catalisador que pode ser ácido, alcalino ou enzimático (ARANSIOLA et al., 2014; ERDIWANSYAH et al., 2019). Apesar dos catalisadores alcalinos apresentarem custo inferior e resultarem em elevadas conversões, a presença de ácidos graxos livres e/ou água levam à formação de sabões que reduzem o rendimento da reação e dificultam a purificação do biodiesel. Catalisadores ácidos convertem matérias-primas com teores mais elevados de ácidos graxos livres em ésteres alquílicos (biodiesel) de maneira eficiente. Contudo, exigem um maior tempo de reação e razões molares óleo:álcool mais elevadas. Ambos catalisadores apresentam um elevado consumo de energia e água nas etapas de tratamento pós-reação (ERDIWANSYAH et al., 2019; MOAZENI; CHEN; ZHANG, 2019; NORJANNAH et al., 2016).

Em contraste, a catálise enzimática permite contornar alguns problemas associados à rota química de produção do biodiesel, pois devido à especificidade e seletividade das enzimas (neste caso as lipases), não há geração de subprodutos, facilitando assim a recuperação do produto. Além disso, as lipases catalisam eficientemente reações de transesterificação/esterificação em condições brandas de temperatura, contribuindo assim para a redução de custos com energia no processo. Outra vantagem associada ao uso das lipases é a possibilidade de utilizar óleos com alto índice de acidez (ARANSIOLA et al., 2014; BISEN et al., 2010; CORTEZ et al., 2018; TAN et al., 2010; VARGAS et al., 2018). Essas vantagens tornam a produção de biodiesel catalisada por lipases uma alternativa promissora comparada ao processo químico. No entanto, a rota enzimática ainda apresenta várias restrições, como alto custo da enzima, taxa de reação lenta e desativação enzimática (NORJANNAH et al., 2016; THANGARAJ et al., 2019).

A fim de contornar alguns problemas associados à rota enzimática, a imobilização de enzimas tem sido geralmente utilizada para obter derivados enzimáticos insolúveis no meio

reacional, que além de serem facilmente recuperados e reutilizados, podem apresentar maior estabilidade em relação à temperatura, à desnaturação química, bem como à desnaturação por cisalhamento (BAJAJ et al., 2010; RODRIGUES et al., 2019; SHELDON, 2007; URRUTIA et al., 2018).

A técnica de imobilização por formação de agregados reticulados (CLEAs, do inglês cross-linked enzyme aggregates) consiste na agregação/precipitação das proteínas presentes na solução enzimática induzida por sais, solventes orgânicos, polímeros, etc., seguida pela reticulação com um reagente bifuncional ou multifuncional, usualmente glutaraldeído (CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000; SCHOEVAART et al., 2004; TALEKAR et al., 2013). O uso de CLEAs apresenta vantagens para aplicações industriais como atividade enzimática altamente concentrada, simplicidade de preparação, e baixos custos de obtenção devido à ausência de um suporte sólido (CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000). Alguns problemas encontrados no preparo de CLEAs como baixa disponibilidade de grupos aminos na superfície da enzima para um entrecruzamento eficiente e problemas de limitações difusionais (GARCIA-GALAN et al., 2011; SHELDON, 2011a, 2011b) podem ser contornados com emprego de co-feeders, tais como, proteína de soro bovino (BSA) (AMARAL-FONSECA et al., 2018; ARAUJO-SILVA et al., 2018; GUAUQUE TORRES; FORESTI; FERREIRA, 2014; SHAH; SHARMA; GUPTA, 2006), proteínas de soja (PS) (ARAUJO-SILVA et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2018; MAFRA et al., 2018; RAMOS et al., 2018), polímeros aminados como o polietilenoimina (PEI) (AMARAL-FONSECA et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2018; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017), e ainda nanopartículas magnéticas funcionalizadas com grupos aminos, que além de contribuírem para um entrecruzamento mais eficiente, podem facilitar a recuperação do catalisador pela aplicação de uma campo magnético externo, minimizando a compactação dos agregados supramoleculares e, portanto, evitando que os poros dos CLEAs fiquem obstruídos e ocorra problemas de transferência de massa (formação de clusters) (AMARAL-FONSECA et al., 2018; CRUZ-IZQUIERDO et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2018; KOPP et al., 2015). O uso de amido também tem sido avaliado como agente porogênico visando à redução de problemas difusionais intrapartícula (AMARAL-FONSECA et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2018; WANG et al., 2011).

Devido ao interesse industrial por lipases de menor custo e que possam ser aplicadas na produção do biodiesel, a Novozymes A/S anunciou em 2014 a Eversa® Transform como uma formulação enzimática líquida disponível comercialmente para produção de biodiesel, sendo em 2016 uma nova versão lançada no mercado, Eversa® Transform 2.0 (NOVOZYMES, 2016). Essas formulações foram avaliadas principalmente em sua forma líquida na produção de

biodiesel com bons rendimentos (75%-97%) (ANDRADE; ERRICO; CHRISTENSEN, 2017a, 2019, 2017b; CESARINI; DIAZ; NIELSEN, 2013; FIRDAUS et al., 2016; MIBIELLI et al., 2019; NGUYEN et al., 2018; NIELSEN et al., 2016; REMONATTO et al., 2016; WANCURA et al., 2019a). No entanto, seu uso na forma imobilizada ainda é pouco explorado (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2018; BRESOLIN et al., 2020; LEE et al., 2019; MARTÍNEZ-SANCHEZ et al., 2020; REMONATTO et al., 2018), não sendo encontrado relatos na literatura científica sobre a imobilização da Eversa® Transform como CLEAs.

Ao utilizar derivados enzimáticos produzidos na ausência de um suporte, como no caso dos CLEAs, deve-se observar as configurações do reator, uma vez que as partículas do biocatalisador são sensíveis ao cisalhamento. Os reatores de fluxo em vórtice (RFVs) são especialmente úteis quando se trata de biocatalisadores frágeis, já que esse tipo de reator promove uma agitação eficiente, menos agressiva à obtida com agitadores convencionais, reduzindo danos ao biocatalisador (GIORDANO, ROBERTO CAMPOS GIORDANO, 2006; RESENDE et al., 2001).

Neste contexto este trabalho teve como objetivo a coimobilização da lipase de Eversa® Transform e nanopartículas magnéticas de sílica funcionalizadas com grupos aminos e octilas pela técnica CLEA e a aplicação do biocatalisador imobilizado na produção de biodiesel em RFV, usando óleo de soja (refinado e degomado) e etanol (anidro e hidratado) como matérias-primas.

Para atender aos objetivos deste trabalho, as seguintes etapas foram realizadas:

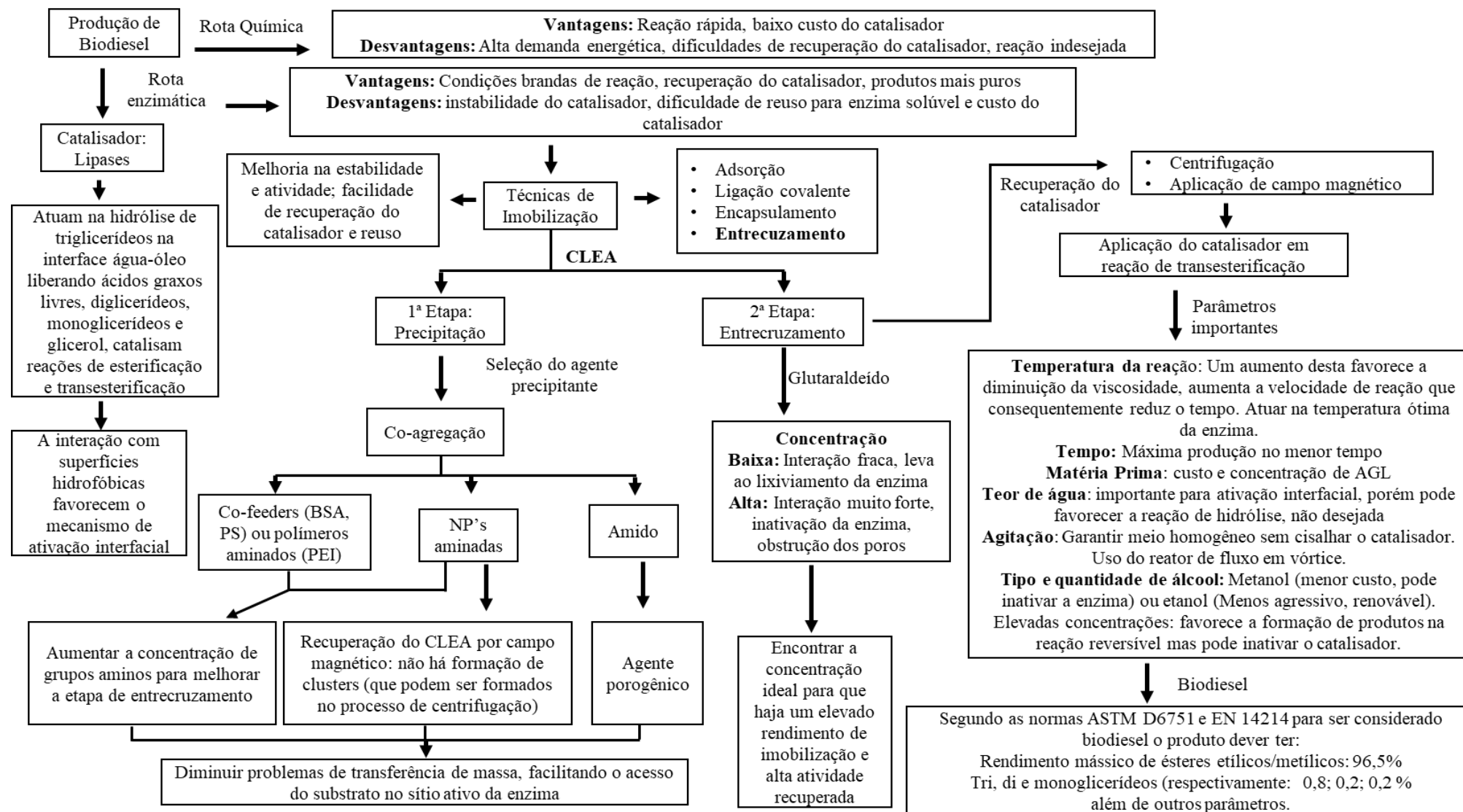
- a) Caracterização das lipases das duas formulações líquidas de Eversa Transform e Eversa Transform 2.0 quanto à atividade de hidrólise, teor de proteína, massa molecular, efeitos do pH e temperatura na atividade enzimática e estabilidade térmica;
- b) Imobilização da lipase de Eversa Transform pela técnica CLEA, avaliando a concentração e o agente precipitante, a concentração de glutaraldeído como agente de reticulação, a adição de BSA, PS, PEI e amido para melhorar a etapa de reticulação e evitar ou reduzir os problemas de transferência de massa, e o uso de NPMS funcionalizadas com grupos aminos e octilas visando facilitar a separação e reuso do biocatalisador;
- c) Caracterização do biocatalisador imobilizado quanto aos efeitos do pH e da temperatura na atividade enzimática e estabilidade térmica e desempenho na reação

de transesterificação de óleo de soja refinado e etanol, e estabilidade operacional (reuso);

- d) Produção de biodiesel etílico em reator de fluxo em vórtice catalisada por biocatalisador magnético: otimização dos parâmetros de reação (razão óleo/etanol, teor de água, temperatura e concentração de catalisador) visando a produção de um biodiesel que atenda as normas internacionais de qualidade;
- e) Avaliação do uso de óleo não refinados (óleo de soja degomado) e etanol hidratado nas condições otimizadas de processo, visando contribuir para a viabilidade econômica da rota enzimática de produção de biodiesel

Um panorama geral da Tese com os principais temas envolvidos e as principais etapas realizadas é mostrado na Figura 1.1.

Figura 1.1 - Panorama geral da tese



Na sequência serão apresentados uma revisão da literatura científica, as metodologias utilizadas e os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento da Tese de Doutorado, a qual foi estruturada em capítulos, como segue:

Capítulo 2: “Revisão da Literatura” abordando os principais tópicos envolvidos neste trabalho.

Capítulo 3: “Caracterização das formulações líquidas de Eversa[®] Transform e Eversa[®] transform 2.0”. Neste capítulo são apresentadas as principais características das duas formulações de lipase disponíveis para o trabalho e a escolha da segunda versão para dar segmento aos experimentos.

Capítulo 4: “Compósitos de agregados reticulados de Eversa[®] Transform e nanopartículas magnéticas. Desempenho na etanólise do óleo de soja”. Este capítulo, em forma de artigo científico, foi publicado na revista Catalysts (MIRANDA et al., 2020), doi:10.3390/catal10080817. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/10/8/817> . Neste capítulo é apresentado os resultados das estratégias de imobilização da lipase, a caracterização do derivado e sua aplicação na otimização e obtenção do biodiesel, além do reuso do biocatalisador.

Capítulo 5: “Etanólise do óleo de soja degomado utilizando CLEA magnético de Eversa[®] Transform”. Neste capítulo é abordado a utilização de substratos não refinados para a produção do biodiesel utilizando o biocatalisador Eversa-mCLEA apresentado no capítulo 4. As condições do processo foram otimizadas a partir de um planejamento experimental usando óleo de soja refinado e etanol anidro, posteriormente aplicadas à produção de biodiesel a partir de óleo de soja degomado e etanol hidratado em um reator de fluxo em vórtice operado no modo batelada.

Capítulo 6: “Conclusões Gerais” a partir dos principais resultados obtidos neste trabalho.

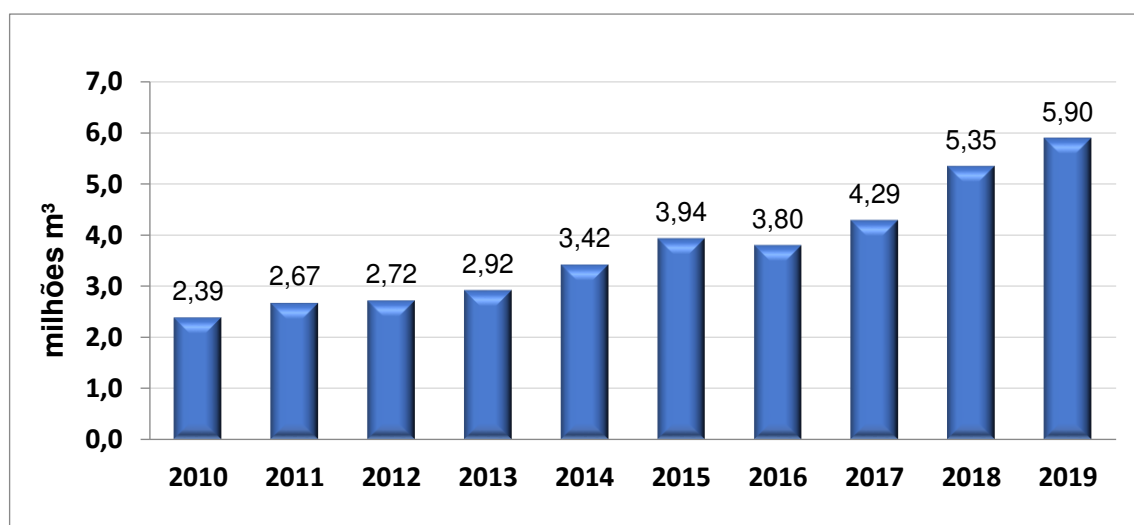
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiesel

Devido as crescentes preocupações com o aquecimento global e ao contínuo esgotamento dos combustíveis fósseis a atenção mundial está se voltando para processos que usam matéria-prima sustentável e ambientalmente correta para produzir energia renovável, como os biocombustíveis, dentre eles, o biodiesel. (JAMIL et al., 2018). Uma alternativa promissora, o biodiesel é feito de fontes renováveis não tóxicas, biodegradáveis, sendo um biocombustível substituto do óleo diesel de petróleo, contribuindo com menores emissões de dióxido e monóxido de carbono, podendo ser utilizado diretamente em motores de combustão interna sem modificações adicionais (CHUAH et al., 2017; SINGH et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

No Brasil, o governo federal lançou em 2004 o “Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB)”, que teve como objetivo introduzir o biodiesel na matriz energética brasileira. O primeiro percentual de mistura do biodiesel ao diesel foi de 2%, em caráter facultativo, mas a partir de 2008 passou a ser obrigatória. Com a evolução do mercado brasileiro esse percentual já foi ampliado ao longo dos anos, sendo em março de 2020 estabelecido 12%. Consequentemente, a produção do biocombustível vem aumentando ano a ano (Figura 2.1) (ANP, 2016).

Figura 2.1- Evolução da produção de biodiesel (B100) – 2010-2019



Fonte: (ANP, 2020b) - (tabela 4.10)

O Brasil está entre os maiores produtores de biodiesel no mundo, ocupando o terceiro lugar com uma produção de 5,9 bilhões de litros em 2019, ficando atrás da Indonésia e dos Estados Unidos com produções de 7,9 e 6,5 bilhões de litros, respectivamente (TISEO, 2020).

De acordo com a ASTM (American Society for Testing and Materials) o biodiesel é definido como um éster monoalquílico de ácidos graxos de cadeia longa derivados de óleos vegetais ou gorduras animais. É produzido principalmente a partir da reação de transesterificação de um triglicerídeo com um álcool, geralmente metanol ou etanol, na presença de um catalisador (alcalino, ácido ou enzimático) (CESARINI et al., 2015; ZHANG et al., 2019). Após passar por processos de purificação para adequação a especificação da qualidade o biodiesel pode ser comercializado (ANP, 2016).

Para que o biodiesel seja usado como combustível para motor ou misturado ao diesel de petróleo, ele deve estar em conformidade com as especificações do padrão de qualidade americano elaborado pela ASTM, através da norma D6751 e/ou o estabelecido pelo Comitê Europeu de Padronização através da norma EN-14214 (DUVEKOT, 2011; LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009; MCCURRY; WANG, 2007; SINGH et al., 2019). A Tabela 2.1 mostra alguns parâmetros que devem ser atendidos.

No Brasil as especificações do biodiesel B100 (100% éster monoalquílico de ácido graxo), a ser misturado com o diesel mineral, são estabelecidas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), através da Resolução nº 45 de 2014 (RANP 45-2014). Os padrões de qualidades presentes nesta resolução foram constituídos com base nas normas ASTM D6751 e EN 14214 (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

Tabela 2.1 – Algumas especificações do Biodiesel, segundo resolução EN 14214 (União Europeia).

Propriedades	Unidade	EN 14214
Teor de éster	%massa, mín	96,5
Triglicerídeos	%massa, máx.	0,2
Diglicerídeos	%massa, máx.	0,2
Monoglicerídeos	%massa, máx.	0,8
Glicerol total	%massa, máx.	0,25
Índice de Ácidez	%massa, máx.	0,25
Água	ppm, máx	500

Fonte: (MCCURRY; WANG, 2007; SINGH et al., 2019; WANCURA et al., 2019c)

Apesar dos vários benefícios em relação ao diesel convencional, alguns desafios na produção do biodiesel precisam ser resolvidos. Entre eles estão o custo do óleo, a seleção de catalisadores e o desenvolvimento de uma técnica adequada para a síntese econômica e eficiente de biodiesel a partir da vasta gama de matérias-primas disponíveis (ATHAR; ZAIDI, 2020).

A transesterificação química usando um processo de catálise alcalina é a rota mais tradicional para a produção do biodiesel (JAMIL et al., 2018). Ela apresenta altos níveis de conversão de triglicerídeos em ésteres em tempos curtos de reação e um catalisador de baixo custo, entretanto tem uma alta demanda energética, difícil recuperação do glicerol, o catalisador precisa ser removido do produto, apresenta geração de efluente durante a lavagem e ocorrência de reações indesejadas devido a presença de ácidos graxos livres (AGLs) e água provenientes das matérias-primas (ATHAR; ZAIDI, 2020; LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009; MEHER; VIDYASAGAR; NAIK, 2006; ZHANG et al., 2019). Um alto teor de AGLs, acima de 3%, e a presença de água favorecem a reação de saponificação durante o processo, o que causa dificuldades na separação do produtos e queda no rendimento da produção do biodiesel (SINGH et al., 2019).

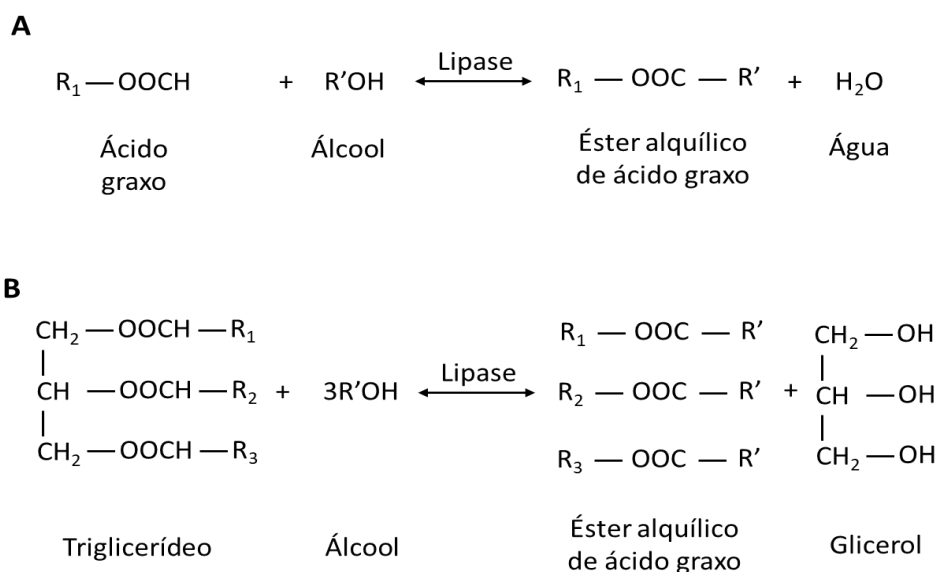
A qualidade da matéria prima é então um parâmetro muito importante para a rota alcalina, sendo preterida o uso de óleos refinados devido aos baixos teores de AGLs. Entretanto o custo da matéria-prima chega a representar entre 60-80% do custo final da produção do biodiesel (ATHAR; ZAIDI, 2020; HAAS et al., 2006; MENG et al., 2009; NGUYEN et al., 2018).

O uso de catalisadores enzimáticos é uma alternativa que viabiliza o utilização de óleos ou gorduras não refinadas ou residuais com diferentes teores de AGLs, devido à elevada seletividade das enzimas, dispensando etapas de pré-tratamento, lavagem e purificação para obtenção do biodiesel, assim como não promovendo a geração de reações indesejáveis (ATHAR; ZAIDI, 2020; CESARINI et al., 2015).

2.1.1 Biodiesel enzimático

A produção de biodiesel a partir da rota enzimática permite contornar os problemas enfrentados quando catalisadores convencionais são empregados. As reações são catalisadas pelas lipases (Figura 2.2) e ocorrem em condições brandas de reação, permitem a utilização de insumos de baixo custo que contêm água e AGLs, por exemplo, óleos não comestíveis e óleos usados, evitando reações indesejadas e apresenta um elevado grau de pureza dos produtos (ARANSIOLA et al., 2014; LOTTI et al., 2018).

Figura 2.2 – Reações para a síntese de éster alquílico de ácido graxo (biodiesel) catalisada por lipases. A) Esterificação dos ácidos graxos e álcool. B) Transesterificação de triglicerídeos e álcool. R₁, R₂, R₃, R' representam as cadeias carbônicas dos ácidos graxos e álcool.



Na síntese do biodiesel enzimático um excesso de álcool é empregado nas reações devido a reversibilidade das mesmas, deslocando assim o equilíbrio em direção a formação do biodiesel, para a maximização do rendimento. Entretanto, uma concentração de álcool no meio muito acima da que é necessária ocasiona custos adicionais ao processo, além de levar a uma inativação do catalisador (TOFTGAARD PEDERSEN et al., 2014).

O biodiesel pode ser sintetizado a partir de diferentes tipos de álcoois, como etanol e butanol, além de metanol, que é o álcool convencionalmente adotado devido à fácil separação do produto, maior taxa de reação e maior rendimento de biodiesel (JAMIL et al., 2018). Entretanto, as lipases sofrem inativação quando o metanol é adicionado integralmente ao processo, sendo a adição gradual do álcool durante a reação uma maneira de contornar esta limitação (LOTTI et al., 2018). Em substituição, o etanol, apesar de ter um custo maior e ser menos reativo, é sugerido devido ser um recurso renovável, melhorando o “perfil de sustentabilidade” do biodiesel, além de ser menos agressivo às enzimas (JAMIL et al., 2018; TOFTGAARD PEDERSEN et al., 2014).

Um outro parâmetro importante nas reações de produção do biodiesel enzimático é o teor de água (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009; NGUYEN et al., 2018). A água é essencial para manter a estrutura tridimensional da enzima, principalmente quando na forma solúvel, além de ser responsável pela área interfacial de atuação das enzimas (CESARINI; DIAZ; NIELSEN, 2013; POPPE et al., 2015). Com um baixo teor de água é

necessário aumentar a agitação da mistura para atingir uma determinada área interfacial. Além disso, favorece ao aumento da concentração do álcool na fase aquosa devido a sua polaridade, o que pode levar a inativação do catalisador. No entanto, o alto teor de água (da matéria-prima e produzida a partir da esterificação de ácido graxo e álcool) favorece a reação reversa (hidrólise), diminuindo a taxa de reação e o rendimento de produção (NORJANNAH et al., 2016; TOFTGAARD PEDERSEN et al., 2014). Portanto a quantidade de água precisa ser controlada de maneira que não haja falta nem excessos.

Uma vantagem da rota enzimática está relacionada à ampla gama de possibilidades de matérias-primas adequadas para ser empregadas na reação devido à capacidade das lipases em converter triglicerídeos e ácidos graxos livres presentes no substrato em biodiesel (WANCURA et al., 2019c).

Cesarini; Diaz; Nielsen, (2013) avaliaram o uso do óleo de soja bruto, com 7,8% de ácido graxo livre na reação com metanol, catalisada pela formulação líquida de lipase Callera Trans L à 35 °C. Após 24 horas, 96% de rendimento em éster metílico de ácido graxo foi alcançado quando baixas concentrações de água foram usadas (3-5%).

Watanabe et al., (2002) relataram que, usando a lipase B imobilizada de *Candida antarctica* (Novozym 435), metanol adicionado em três etapas e o óleo de soja degomado (1,1%, m/m de AGLs) a reação permitiu um rendimento de 93,8% em ésteres metílicos. Além disso, a lipase foi reutilizada por 25 ciclos sem qualquer perda de atividade.

Remonato et al., (2016) avaliaram a formulação líquida de lipase Eversa Transform (1%, m/m) na reação com 600 g de óleo de fritura, metanol (1,5 eqv), água (2,5%, m/m), encubados em Shaker a 250 rpm e 35 °C por 16 horas. Foi obtido um rendimento de 97,29 % (m/m) em biodiesel.

Mesmo sendo uma rota bastante atrativa, a catalise enzimática ainda enfrenta algumas desvantagens como alto custo do catalisador e tempos de reação mais elevados em comparação com os sistemas de reação catalisados por base. Por isso, a recuperação e reuso do biocatalisador é importante para viabilidade comercial do biodiesel enzimático. (NORJANNAH et al., 2016; POPPE et al., 2015; POURZOLFAGHAR et al., 2016; THANGARAJ et al., 2019)

2.2 Lipases

As enzimas são macromoléculas biológicas com aplicações em diversos produtos e processos biotecnológicos, como produção de alimentos, bebidas, materiais de limpeza,

fármacos e também na produção do biodiesel, usando as lipases como catalisador da reação. As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (NELSON; COX, 2014; PRASAD; ROY, 2017; STERGIOU et al., 2013).

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) (NELSON; COX, 2014). A função natural dessas enzimas é a hidrólise de triglicerídeos na interface água-óleo, liberando AGLs, diacilglicerídeos (DAGs), monoacilglicerídeos (MAGs) e glicerol. Em meios orgânicos são capazes de catalisar reações de esterificação, transesterificação (alcoólise ou glicerólise) e interesterificação ou acidólise (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; KAPOOR; GUPTA, 2012; MOAZENI; CHEN; ZHANG, 2019).

Em aplicações industriais, a especificidade das lipases é determinante, podendo ser em relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. A seletividade produz um produto que é isento de impurezas, pois a formação de coprodutos é minimizada. E também reduz o custo do produto, reduzindo o número de etapas envolvidas na purificação do produto final. (PRASAD; ROY, 2017). As lipases podem ser classificadas com base na sua capacidade de hidrolisar triacilglicerídeos (TAGs). As lipases não-específicas liberam os ácidos graxos de qualquer posição no TAG, produzindo AGLs, glicerol, MAGs e DAGs como intermediários (por exemplo, produzidas por *Pseudomonas fluorescens* e *Candida rugosa*). As lipases 1,3-específicas liberam ácidos graxos das posições sn-1 e sn-3 para formar AGLs e DAGs e/ou MAGs (por exemplo, lipases produzidas por *Aspergillus niger*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Candida antarctica* (lipase B), *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosa* e pâncreas de porco) (CASTRO et al., 2004; KAPOOR; GUPTA, 2012; STERGIOU et al., 2013).

Reações com lipases 1,3-específicas apresentam rendimentos teóricos em torno de 66,66%, porém devido ao mecanismo de migração acila o rendimento pode aumentar. A migração acila é um processo não enzimático que envolve o movimento espontâneo do grupo acila da posição sn-2 do glicerol para outra posição adjacente (sn-1 ou sn-3). Tempos prolongados podem eventualmente resultar na hidrólise completa de TAGs em AGL e glicerol (KAPOOR; GUPTA, 2012; WANCURA et al., 2019c).

As lipases têm duas conformações diferentes devido à presença de uma cadeia polipeptídica, uma “tampa”. Na sua forma fechada, o sítio ativo da enzima encontra-se isolado, desta maneira a lipase apresenta-se inativa. Entretanto, ao interagir com uma interface hidrofóbica (por exemplo, gotas de óleos, bolhas de ar, proteínas, suportes hidrofóbicos) ocorre a mudança da sua conformação para a forma ativa (tampa aberta) expondo seu sítio ativo (BRZOZOWSKI et al., 1991; SCHRAG et al., 1997).

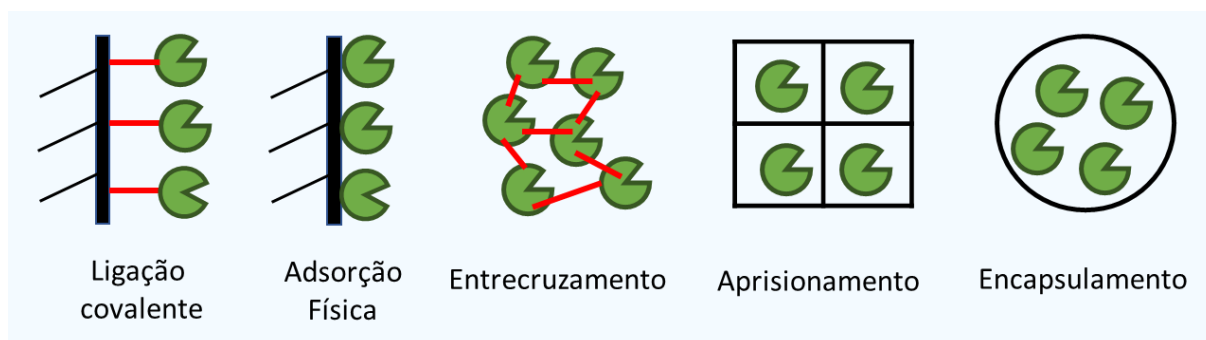
Este mecanismo, conhecido como ativação interfacial, tem sido usado para desenvolver protocolos que permitem a imobilização, purificação, estabilização e hiperativação de lipases por meio da imobilização na sua forma aberta em suportes hidrofóbicos (MANOEL et al., 2015; RODRIGUES et al., 2019).

2.3 Imobilização de enzimas

O uso da enzima livre em processos industriais apresenta desvantagens, tais como, custos elevados de isolamentos e purificação do produto, instabilidade em solução, e dificuldade de recuperação da enzima ativa após o término do processo catalítico (GARCIA-GALAN et al., 2011; ISMAIL; BAEK, 2020). A fim de contornar esses problemas, a imobilização de enzimas tem sido geralmente utilizada para obter derivados enzimáticos reutilizáveis, além de apresentar maior estabilidade em relação à temperatura, à desnaturação química, bem como à desnaturação por cisalhamento (GARCIA-GALAN et al., 2011; MATEO et al., 2007). O desempenho aprimorado da enzima imobilizada se reflete em uma maior produtividade do catalisador (kg de produto/kg de enzima) e em uma menor contribuição no custo da enzima (SHELDON, 2019).

Dentre os métodos de imobilização, estes podem ser divididos em três principais categorias: ligação ou adsorção da enzima em um suporte sólido, entrecruzamento das moléculas de enzima na ausência de suportes sólidos por meio do uso de um reagente bifuncional ou multifuncional e confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica, como mostra Figura 2.3 (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; FRANSSEN et al., 2013; SHELDON, 2007).

Figura 2.3 – Métodos de imobilização de enzimas



Fonte: Adaptado de Osbon; Kumar, (2020)

A seleção do método de imobilização mais adequado depende de alguns fatores, entre eles: resistência microbiológica, estabilidade térmica e operacional, disponibilidade de grupos funcionais reativos para ligações com a enzima e/ou modificações químicas, caráter hidrofóbico e hidrofílico, facilidade de recuperação, capacidade de carga e custo (MATEO et al., 2007; OSBON; KUMAR, 2020).

Para as lipases, devido ao fenômeno de adsorção interfacial, um dos métodos mais vantajoso para sua imobilização é a adsorção em suportes hidrofóbicos. Neste processo a atividade das lipases aumenta, uma vez que a enzima é imobilizada com a tampa aberta, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, independentemente do meio onde a enzima se encontra (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008). No entanto, as interações com o suporte são relativamente fracas e a enzima pode lixiviar devido a mudanças no pH, força iônica, temperatura ou polaridade do solvente, portanto, o catalisador deve ser usado em condições muito específicas (OSBON; KUMAR, 2020).

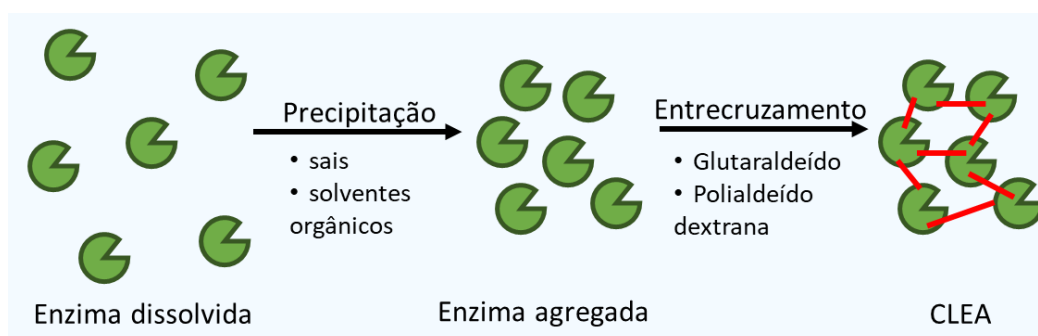
Imobilizações por ligações covalentes promovem uma ligação estável entre a enzima e o suporte, evitando a lixiviação das enzimas para o meio reacional (SHELDON; VAN PELT, 2013). A ligação covalente enzima-suporte pode ser uni ou multipontual por meio de aminoácidos de cadeias laterais, como um grupo ϵ -amino (lisina), tiol (cisteína) e carboxílico (ácidos aspártico e glutâmico) (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013) promovendo a estabilização da estrutura terciária da enzima imobilizada e conseqüentemente, aumentando a estabilidade da atividade catalítica frente a altas temperaturas, pH extremos e na presença de solventes (GUISAN, 2006). No entanto, uma desvantagem está relacionada ao forte enrijecimento da estrutura da enzima, que pode levar à perda de atividade e inativação (SHELDON, 2007). Além disso, a imobilização covalente não permite a regeneração e recarregamento do suporte e deve ser descartada com a enzima após a inativação, o que pode tornar o processo caro (SHELDON; VAN PELT, 2013).

O custo da imobilização em suportes pode aumentar o preço do biocatalisador final e uma alternativa é a aplicação da técnica de imobilização desenvolvida pelo Prof. Sheldon, onde agregados enzimáticos são reticulados de maneira simples sem a necessidade de um suporte (CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000; SCHOEVAART et al., 2004; SHELDON, 2007, 2011a, 2011b; SHELDON; SCHOEVAART; VAN LANGEN, 2005; SHELDON; VAN PELT, 2013).

2.3.1 Agregados enzimáticos reticulados (CLEAs)

A técnica de imobilização por formação de agregados reticulados (CLEAs, do inglês cross-linked enzyme aggregates) consiste na agregação/precipitação das proteínas presentes na solução enzimática pela ação de um agente precipitante (por exemplo, sais, solventes orgânicos, polímeros, etc.), seguida pela reticulação da estrutura supramolecular com um agente bifuncional, usualmente glutaraldeído, ou multifuncional (por exemplo, polialdeído dextrana) que reagem principalmente com grupos aminos das cadeias laterais dos resíduos de lisinas na superfície da enzima, Figura 2.4 (SHELDON; SCHOEVAART; VAN LANGEN, 2005; TACIAS-PASCACIO et al., 2019; TALEKAR et al., 2013).

Figura 2.4 – Preparação dos agregados enzimáticos reticulados (CLEAs)



Fonte: Adaptado de Talekar et al., (2013).

Na preparação dos CLEAs é importante avaliar o melhor agente precipitante e reticulante para o processo. Na etapa de precipitação, altos rendimentos de precipitação e altas atividades medidas no agregado redissolvido em tampão não significam que o CLEA reterá toda a sua atividade precipitada. Uma vez que os agregados formados podem estar em conformação desfavorável que é mantida na etapa de reticulação exibindo uma atividade inferior (TALEKAR et al., 2013). Amaral-Fonseca et al., (2018) avaliaram cinco agentes precipitantes no preparo de CLEA da AMG 300L (formulação de amiloglicosidase da Novozymes A/S). Acetona, etanol e isopropanol foram capazes de precipitar em torno de 80% de proteínas, retendo alta atividade dos precipitados redissolvidos (em torno de 90%), enquanto o sulfato de amônio precipitou apenas cerca de 50% das proteínas e o polietilenoglicol (PEG) não teve ação de precipitação sobre a amiloglicosidase. Foi selecionado o etanol pelo bom desempenho, baixo custo e renovabilidade.

Na etapa de reticulação, a razão molar do reticulador influencia na atividade e estabilidade do CLEA resultante. Concentrações muito baixas do agente reticulante podem ser

insuficientes para estabilizar as ligações podendo ocorrer a lixiviação das enzimas, enquanto que concentrações muito altas podem levar a uma reticulação excessiva, enrijecendo a estrutura da enzima e inativando-a (TALEKAR et al., 2013). Ramos et al., (2018) avaliaram a concentração do glutaraldeído no preparo de CLEA da lipase de pâncreas de porco (PPL). Foram avaliadas concentrações de 5, 10, 20, 30 e 40 μmol de grupos aldeídos/mg de proteína total. Com o aumento da concentração de glutaraldeído houve o aumento do rendimento de imobilização, entretanto, a atividade expressa teve um efeito ao contrário, indicando um excesso de reticulação.

A lixiviação da enzima ao preparar CLEAs também pode ocorrer quando a quantidade de grupos aminos disponíveis na superfície da enzima é pequena, tornando a reticulação fraca (SHELDON, 2019, 2011a). Este problema pode ser solucionado usando proteínas ricas em lisinas, tais como, albumina de soro bovino (BSA) (AMARAL-FONSECA et al., 2018; ARAUJO-SILVA et al., 2018; GUAUQUE TORRES; FORESTI; FERREIRA, 2014; MAFRA et al., 2016, 2019; ROJAS et al., 2019; SHAH; SHARMA; GUPTA, 2006), proteínas de soja (ARAUJO-SILVA et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2018; MAFRA et al., 2018; RAMOS et al., 2018), ou mesmo polímeros ricos em grupos aminos, como a polietilenoimina (PEI) (AMARAL-FONSECA et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2018; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005; ROJAS et al., 2019; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017; WILSON et al., 2006).

O uso de CLEAs apresenta vantagens para aplicações industriais, tais como, simplicidade de preparação, co-imobilização de diferentes enzimas, aumento da estabilidade (térmica e/ou operacional), baixos custos de obtenção devido à ausência de um suporte sólido adicional, atividade enzimática altamente concentrada uma vez que a massa do catalisador é principalmente formada por enzimas, ao contrário dos métodos que utilizam suporte, em que 90 a 99% da massa do catalisador final é atribuído ao suporte, além de não requer soluções de enzimas altamente puras (CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000; SCHOEVAART et al., 2004).

Entretanto, os CLEAs têm alguns problemas relacionados a sua baixa estabilidade mecânica que pode dificultar sua recuperação do meio e também problemas de difusão, devido ao tamanho dos seus poros que podem ser pequenos (GARCIA-GALAN et al., 2011). Porém, a coagregação das enzimas com nanopartículas magnéticas, por exemplo, resulta em um CLEA magnético que minimiza os problemas relacionados a recuperação e estabilidade mecânica. O CLEA magnético é facilmente separado do meio pela aplicação de uma campo magnético externo eliminando a necessidade de centrifugação e filtração e, assim, contornando o problema de compressão dos CLEAs e conferindo robustez ao catalisador (AMARAL-FONSECA et al.,

2018, 2020; CRUZ-IZQUIERDO et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2018; KOPP et al., 2015; TALEKAR et al., 2012b, 2013).

Por outro lado, as limitações de transferência de massa podem ser minimizadas com o aumento do tamanho dos poros das partículas de CLEAs. O uso de polímeros como amido durante as etapas de agregação e reticulação pode facilitar a formação de poros grandes durante a produção de CLEA. Como ao final da preparação do CLEA, o amido é degradado pela α -amilase e removido, esta estratégia reduz as limitações de transferência de massa interna e aumenta a eficiência catalítica (GUIMARÃES et al., 2018; WANG et al., 2011). A formação de poros maiores auxiliada por um agente porogênico foi inicialmente estudada por Wang et al., (2011), que coprecipitou a enzima Papaína com amido (0,3%, m/v), e após a reticulação seguiu-se pela degradação do amido por uma α -amilase e lavagem para obtenção dos CLEAs. Essa estratégia permitiu produzir CLEAs da papaína com poros maiores em comparação aos CLEAs tradicionais, reduzindo as limitações internas de transferência de massa e aumentando a eficiência catalítica. Talekar et al., (2012a) prepararam CLEAs de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* variando a concentração do amido como agente porogênico. A maior eficiência catalítica foi obtida com 0,4% (m/v) de amido. A análise de microscopia eletrônica de varredura mostrou uma estrutura porosa que resultou em uma melhor transferência de massa interna de sacarose para os p-CLEAs (“porous-CLEAs”). Guimarães et al., (2018) também avaliaram o amido como agente porogênico na preparação de CLEAs da lipase de pâncreas suína. Eles relataram um aumento na atividade expressa do biocatalisador após a hidrólise do amido com uma α -amilase. Ao usar uma concentração de 0,8% (m/v) de amido obteve-se um biocatalisador com 100% de rendimento de imobilização e retenção catalítica máxima de 67% (mais que o dobro da atividade recuperada sem amido).

CLEAs de várias lipases foram relatados na literatura (GUAUQUE TORRES; FORESTI; FERREIRA, 2013; SCHOEVAART et al., 2004; SHAH; SHARMA; GUPTA, 2006), incluindo trabalhos do grupo de pesquisa do LabEnz/DEQ-UFSCar com lipases de pâncreas de porco e *Thermomyces lanuginosus* (GUIMARÃES et al., 2018; RAMOS et al., 2018, 2019), Tabela 2.2. Entretanto, CLEAs da Eversa Transform foi primeiramente reportado a partir dos resultados obtidos nessa Tese de Doutorado (MIRANDA et al., 2020).

Tabela 2.2 – Diferentes condições no preparo de CLEAs de lipases

Lipase	Co-feeder/ Aditivos	Agente precipitante	Entrecruzante	AR (%)	Referência
CALB	BSA	Sulfato de amônio	Glutaraldeído	188	(GUAUQUE TORRES; FORESTI; FERREIRA, 2014)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	BSA	Acetona	Glutaraldeído	100	(SHAH; SHARMA; GUPTA, 2006)
Pâncreas de Porco	PS	Etanol	Glutaraldeído	40	(RAMOS et al., 2018)
Pâncreas de Porco	PS, Amido, NPMS, PEI	Etanol	Glutaraldeído	80	(GUIMARÃES et al., 2018)
<i>Candida antarctica</i> lipase A	-	Sulfato de amônio	Glutaraldeído	98	
CALB	-	Sulfato de amônio	Glutaraldeído	93	(LÓPEZ-SERRANO et al., 2002)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	-	Sulfato de amônio	Glutaraldeído	17	
<i>Rhizomucor miehei</i>	-	Sulfato de amônio	Glutaraldeído	152	
CALB	NP-funcionalizadas com grupos aminos	Sulfato de amônio	Glutaraldeído	99	(CRUZ-IZQUIERDO et al., 2014)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	SDS	Sulfato de amônio	Glutaraldeído	137	(GUPTA et al., 2009)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	SDS	Etanol hidratado	Glutaraldeído	119	(RAMOS et al., 2019)
Lipase PS from <i>Burkholderia cepacia</i>	BSA	Acetona	Aldeído dextrana	46,8	(VALDÉS; SOTO; ARCAJA, 2011)

2.4 Lipase Eversa[®] Transform

Como já mencionado a produção enzimática do biodiesel é catalisada por lipases, sendo as mais comumente usadas as lipases de: *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica* (lipase B), *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia* e *Thermomyces lanuginosus*, (ATHAR; ZAIDI, 2020; BISEN et al., 2010; RIBEIRO et al., 2011).

Com a crescente demanda do biodiesel, a busca por lipases mais baratas e que possam ser utilizadas na sua produção tem sido alvo de interesse das empresas. Diante disso, a Novozymes lançou uma formulação líquida de lipase de *Thermomyces lanuginosus* sob o nome comercial Callera[™] Trans, mais tarde chamada de Eversa[®] Transform, que foi projetada especificamente para ser aplicada na produção de biodiesel (MONTEIRO; et al., 2020). Em 2014, foi anunciada a primeira formulação da Eversa[®] Transform (NOVOZYMES, 2014) e em 2016 lançada a segunda versão Eversa[®] Transform 2.0 (RANCKE-MADSEN, 2016). Elas são comercializadas em fase aquosa e apresentam elevada atividade na transesterificação de glicerídeos e na esterificação de ácidos graxos livres (NOVOZYMES, 2016).

Ambas são formulações geneticamente modificadas da lipase de *Thermomyces lanuginosus* com uma estabilidade térmica melhorada na segunda formulação (GUTIERREZ-LAZARO et al., 2018; RANCKE-MADSEN, 2016). Por ser uma enzima em contínua evolução, a literatura também reporta essa formulação líquida com o nome de NS-40116 (MONTEIRO; et al., 2020).

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* produzida por uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus oryzae* (PINHOLT et al., 2010) é uma enzima monomérica com 269 resíduos de aminoácidos, dos quais quatro são resíduos Trp (89, 117, 221 e 260). A massa molar desta lipase é de aproximadamente 30 kDa, mas uma pós-glicosilação tradicional em Asn33 aumenta sua massa molar para cerca de 32 kDa (PINHOLT et al., 2010). Remonato, (2017) encontrou uma massa molecular de 30 KDa para ambas formulações de Eversa. Fraga et al., (2019) determinou a massa molar da NS-40116 correspondendo a 31,578 kDa.

Segundo o fabricante a lipase é estabilizada por água, e sua formulação garante alta estabilidade e longa vida útil (pelo menos dois meses de vida útil a <25 °C). Além disso, a enzima tem produtividade máxima a 40 °C, mas torna-se instável em temperaturas acima de 45 °C (NOVOZYMES, 2016).

Visando a produção de biodiesel, a Eversa Transform e suas variações foram avaliadas na sua forma líquida em diferentes condições reacionais. A Tabela 2.3 mostra a versatilidade dessas enzimas, capazes de atuar frente a diferentes substratos em condições brandas de reação,

utilizando diferentes cargas do catalisador e na presença de água. Os rendimentos das reações variam conforme as estratégias usadas, mas como já mencionado, para ser classificado como biodiesel o produto final precisa atender as especificações internacionais com um rendimento em éster acima de 96,5% (m/m).

Com relação a Eversa imobilizada, há na literatura o relato de alguns trabalhos que abordam diferentes estratégias de imobilização (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2018; HONAISSER et al., 2019; LEE et al., 2019). Como biocatalisador para a produção de biodiesel, Remonato et al., (2018) imobilizaram a Eversa em um suporte hidrofóbico, Sepabeads C-18. O biocatalisador foi usado na reação de transesterificação usando óleo de girassol, razão molar etanol:óleo 4:1, hexano como solvente, 10 % (m/m) de catalisador à 40 °C, numa reação de 3 horas. Foi obtido 99% de conversão e o biocatalisador imobilizado manteve 75% da atividade após quatro ciclos de transesterificação.

Dantas et al., (2019), imobilizaram a NS-40116 em partículas de poliestireno não porosas. A lipase imobilizada apresentou melhor estabilidade térmica e de pH quando comparada à lipase NS-40116 livre, com aumento de 84% na atividade hidrolítica em pH 12. O uso de gordura abdominal de frango como fonte de ácidos graxos e metanol 1,5 eqv permitiu conversão de 54% em 16 h usando o biocatalisador imobilizado, enquanto para enzima solúvel foi obtida uma conversão de 49%.

Martínez-Sánchez et al., (2020) imobilizaram a Eversa Transform em matrizes de octadecil metacrilato. Esse biocatalisador foi usado para produzir biodiesel a partir de óleo de girassol e metanol na razão molar metanol:óleo de 3:1 em meio com terc-butanol como cosolvente. Após 25 horas de reação foi obtido um rendimento de 60% em ésteres metílicos de ácidos graxos.

Bresolin et al., (2019) imobilizaram a lipase NS-40116 em espuma de poliuretano. O biocatalisador imobilizado foi mais estável do que a enzima livre, principalmente em valores de pH ácidos. O derivado enzimático também foi utilizado para reações de esterificação e conversões em torno de 66% em ésteres metílicos de ácidos graxos foram obtidas utilizando gordura abdominal de frango, metanol 3 eqv, 5% (m/m) do biotalsador, 2% (m/m) de água, a 30 °C, durante 24 horas. Sob essas condições, a conversão foi mantida até o quarto reuso do derivado enzimático.

Como reportado anteriormente, há poucos trabalhos de imobilização de Eversa disponíveis na literatura científica. Particularmente, a técnica de imobilização por CLEA usando a lipase de Eversa ou suas variantes ainda não havia sido relatada na literatura.

O capítulo 4 deste trabalho explora o potencial dessa técnica que permitiu melhorar as características da enzima e obter um biocatalisador com aplicação na produção do biodiesel.

Tabela 2.3 – Produção de biodiesel usando lipases líquidas a partir de diferentes matérias-primas e condições reacionais.

Lipase	Óleo/gordura	T (°C)	Álcool	% (m/m) lipase	% (m/m) água	Tempo reação (h)	Rendimento em ésteres alquílicos de ácidos graxos (%, m/m)	Referência
Callera™ Trans L	Óleo de soja bruto	35	16 %m/m MeOH	1	3	24	96,3	(CESARINI; DIAZ; NIELSEN, 2013)
	Óleo de canola	35	Razão molar EtOH:óleo 4,5:1	2	20	24	98	(TOFTGAARD PEDERSEN et al., 2014)
	Óleo de canola com 5% AGLs	35	Razão molar MeOH:óleo 4,5:1	0,5	5	24	95,4	(NORDBLAD et al., 2014)
	Óleo de soja bruto 10 ppm NaOH, 24 h	35	Razão molar MeOH:óleo 4,5:1	1	3,5	24	>95	(CESARINI et al., 2014)
	Óleo de soja degomado	35	Razão molar MeOH:óleo 4,5:1	1,45	6	24	96,9	(WANCURA et al., 2018b)
	Sebo	35	Razão molar MeOH:óleo 4,5:1	1,45	6	8	84,6	(WANCURA et al., 2018a)
NS40116	Gordura abdominal de frango	30	Razão molar MeOH:óleo 4,5:1	0,3	2	24	77	(DA SILVA et al., 2018)
	Óleo de soja degomado	35	Razão molar MeOH:óleo 4,5:1	0,5	15	12	94,3	(ROSSET et al., 2019)
	Óleo de soja degomado	35	Razão molar MeOH:óleo 6,3:1	0,7	8	8	97,1	(WANCURA et al., 2019b)

Continuação...Tabela 2.1– Produção de biodiesel usando lipases líquidas a partir de diferentes matérias-primas e condições reacionais

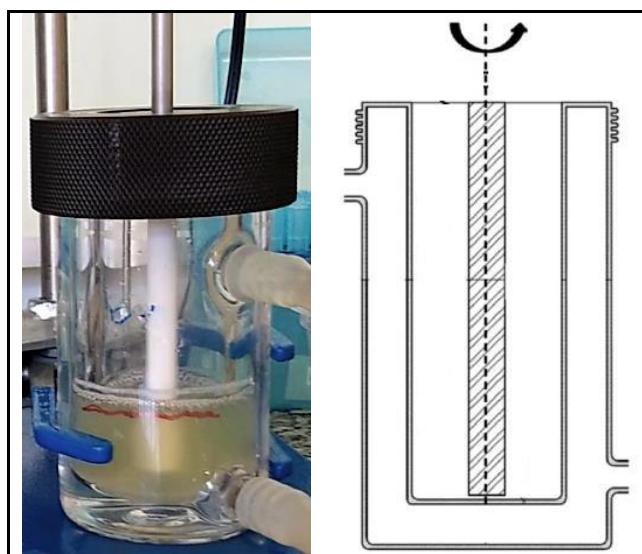
Lipase	Óleo/gordura	T (°C)	Álcool	% (m/m) lipase	% (m/m) água	Tempo reação (h)	Rendimento em ésteres alquílicos de ácidos graxos (%, m/m)	Referência
	Óleo de soja refinado Óleo de soja com 25, 50 e 75% de AGLs Óleo residual de cozinha Óleo de macaúba	35	Razão molar MeOH:óleo 4,5:1	1	2,5	16	75,30-97,3	(REMONATTO et al., 2016)
	Óleo de soja refinado	35	Razão molar MeOH:óleo 4,5:1	0,2	3	24	95	(NIELSEN et al., 2016)
Eversa Transform	Óleo de mamona	35	Razão molar MeOH:óleo 6:1	5	3	8	Reuso total 94,21% 1º ciclo 68,39% 2º ciclo 33,35% 3º ciclo	(ANDRADE; ERRICO; CHRISTENSEN, 2017b)
	Sebo	35	Razão molar MeOH:óleo 4,5:1	1	6	8	Reuso parcial 88,36 após 3 ciclos 85,1	(WANCURA et al., 2019a)
	Óleo de soja refinado com 91,4 % (m/m) ácido oleico 100 ppm de NaOH	45	MeOH 2 eqv	0,2	2	24	97	(MIBIELLI et al., 2019)

2.5 Reator de fluxo em vórtice

Os reatores de fluxo em vórtices (RFV) são especialmente adequados para trabalhar com partículas sensíveis ao cisalhamento, devido às características de agitação suaves e eficientes dos vórtices de Taylor, sendo vantajoso quando empregado para cultivos de células frágeis ou com partículas sensíveis, como matrizes gelatinosas de enzimas imobilizadas, em reações ou separações bioquímicas (GIORDANO, ROBERTO CAMPOS GIORDANO, 2006; GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000; RESENDE et al., 2001).

O RFV é constituído por dois cilindros concêntricos, onde o cilindro externo é fixo e o interno gira induzindo pela sua rotação um fluxo em vórtice. Há uma distância mínima entre o fundo dos dois cilindros para evitar o atrito entre as partes e a maceração das partículas que ficam dispersas no meio (Figura 2.5) (RAMOS, 2017; SILVA, 2015b).

Figura 2.5- Reator de Fluxo em Vórtice



Fonte: Adaptada Ramos et al., (2018).

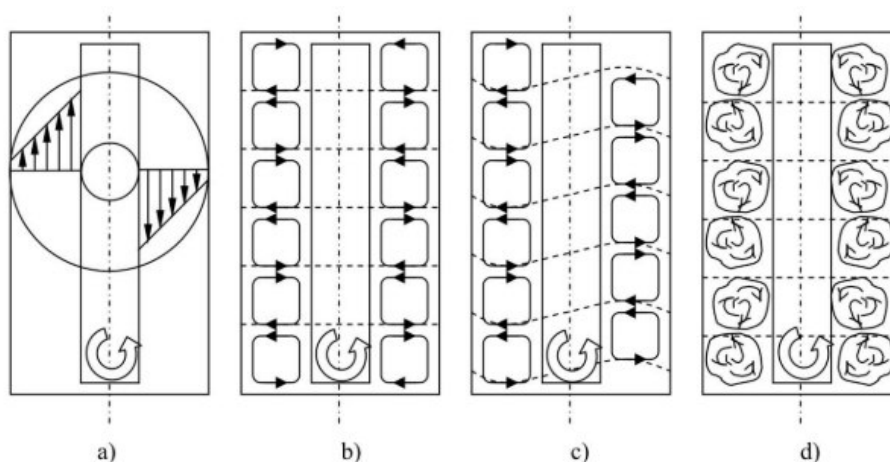
Os regimes de operação do reator podem variar de acordo com a alteração da velocidade de rotação do cilindro interno, indo do laminar ao turbulento (GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000). Uma vantagem do reator Taylor-Couette é que a intensidade da mistura, ao contrário de um reator de tanque agitado, é constante ao longo da altura do reator (KIT, [s.d.]).

O fluxo de Taylor é um padrão de fluxo secundário que ocorre na lacuna entre os dois cilindros concêntricos. Com baixas velocidades de rotação do cilindro interno apresenta-se o denominado fluxo laminar-Couette (Figura 2.6a). Esse padrão de fluxo não apresenta

velocidade axial, portanto o transporte de massa que ocorre na direção axial é dado somente por mecanismos de difusão, assemelhando-se com um reator de fluxo em pistão. Acima de uma taxa de rotação crítica o fluxo circular de Couette torna-se instável e uma série de vórtices toroidais alternados em contra-rotação aparecem (Figura 2.6b). Estas condições permitem um acréscimo de transferência de massa, sendo semelhante a um sistema de CSTRs conectados em série, com uma adequada transferência de massa entre os vórtices (RAMOS, 2017; RESENDE et al., 2001).

Um novo aumento na velocidade de rotação gera um terceiro padrão de fluxo oscilante, gerando ondas que viajam em torno do cilindro interno, conhecido como fluxo de vórtices “wavy” (Figura 2.6c). E mais um incremento na rotação do cilindro interno torna o sistema turbulento (Figura 2.6d). Nestes casos, a transferência de massa entre vórtices torna-se dominante e todo o reator com fluxo de vórtice se comporta como um CSTR (CURRAN; BLACK, 2004; RAMOS, 2017; RESENDE et al., 2001).

Figura 2.6 – Regime de fluxos no Reator de Fluxo em Vórtice: (a) Regime de Couette laminar, (b) regime de Taylor laminar, (c) regime de vórtices “wavy”, (d) e turbulento.



Fonte: KIT, ([s.d.])

Ramos et al., (2018) compararam a configuração do RFV e de um reator tipo cesto sob agitação magnética usando enzima imobilizada pela técnica de CLEA. Os rendimentos de transesterificação nesses reatores foram comparados aos realizados em frascos fechados agitados em um agitador orbital, uma configuração típica usada em laboratório. Ambos os frascos fechados e o reator de fluxo de vórtice mostraram comportamento semelhante, rendendo concentração de ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAGs em % mássica) de 57 e 57,9, respectivamente. No entanto, a concentração de EEAGs alcançada no reator do tipo cesto foi

de apenas 31 % (m/m), após tempos de reação semelhantes. Embora tenha sido relatado que os reatores de cesta podem ser considerados como uma ferramenta promissora para o uso de CLEAs em aplicações de biotecnologia, nesta aplicação particular, a natureza viscosa dos substratos provavelmente impediu a transferência de massa para a camada externa do biocatalisador que conduziu a uma taxa de reação muito menor (RAMOS et al., 2018).

3. CARACTERIZAÇÃO DAS FOMULAÇÕES LÍQUIDAS DE EVERSA® TRANSFORM E EVERSA® TRANSFORM 2.0

3.1 Introdução

Enzimas são macromoléculas de alta massa molecular formada por unidades monoméricas conhecidas por aminoácidos, unidos por ligações peptídicas e sua função é de catalisar as reações (NELSON; COX, 2014). Por serem altamente específicas quanto aos substratos e aos produtos de suas reações, as enzimas apresentam baixo impacto ambiental e toxicológico nos processos e também atuam em condições brandas de reação, fatores importantes considerando aspectos de eficiência do processo, sustentabilidade e questões ambientais. (KAPOOR; GUPTA, 2012; MONTEIRO; et al., 2020).

As lipases, pertencem a classe das hidrolases, uma das seis classes em que as enzimas são classificadas (NELSON; COX, 2014). Sua função natural é a hidrólise de ésteres de triacilgliceróis, mas em meios microaquosos são capazes de catalisar reações de esterificação, transesterificação (alcoólise ou glicerólise), acidólise, ou interesterificação (BAJAJ et al., 2010; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; KAPOOR; GUPTA, 2012; MONTEIRO; et al., 2020; RIBEIRO et al., 2011; STERGIOU et al., 2013).

As lipases apresentam um mecanismo denominado “ativação interfacial”, que favorece o aumento da atividade catalítica na presença de substâncias hidrofóbicas dispersas em fase aquosa. Na ausência de uma interface hidrofóbica, a enzima apresenta-se na sua “conformação fechada”, enquanto que na presença desta interface a “tampa” (cadeia oligopeptídica que cobre o sítio ativo da enzima) altera-se para a “conformação aberta”, possibilitando o acesso do substrato ao sítio ativo. (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; URRUTIA et al., 2018).

Lipases são biocatalisadores que podem ser utilizados em diversas aplicações industriais como produtos farmacêuticos, detergentes, cosméticos, biocombustíveis, alimentos e bebidas. (ADLERCREUTZ, 2013; ANDUALEMA; GESSESSE, 2012; ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016; CASTRO et al., 2004; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; GUERRAND, 2017; HASAN et al., 2010; MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012; PANDEY et al., 1999; RIBEIRO et al., 2011; RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). As lipases são as enzimas mais populares para a produção do biodiesel, que é uma mistura de ésteres de ácidos graxos obtidos a partir dos triglicerídeos. O uso dessas enzimas permite o uso de matérias primas não refinadas, de baixo custo, uma alternativa a rota química.

(ARANSIOLA et al., 2014; BAJAJ et al., 2010; CHRISTOPHER; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, 2014; RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008; TAN et al., 2010; WANCURA et al., 2019c).

Em 2014 a Novozymes A/S anunciou o lançamento de uma formulação líquida de lipase (Eversa[®] Transform) para produzir biodiesel a partir de óleos residuais, reduzindo assim custos com a matéria-prima dos produtores (NOVOZYMES, 2014). Alguns anos depois, em 2016, a empresa lançou a segunda versão mais termoestável, disponível comercialmente, a Eversa[®] Transform 2.0. Uma enzima proveniente de *Thermomyces lanuginosus*, produzida por fermentação submersa de uma cepa de *Aspergillus oryzae* geneticamente modificada (MONTEIRO; et al., 2020; NOVOZYMES, 2016; RANCKE-MADSEN, 2016). Ambas são comercializadas em fase aquosa e apresentam elevada atividade na transesterificação de glicerídeos e na esterificação de ácidos graxos livres (NOVOZYMES, 2016). Segundo o fabricante a lipase é estabilizada por água, e sua formulação garante alta estabilidade e longa vida útil (pelo menos dois meses de vida útil a <25 °C). Além disso, a enzima tem produtividade máxima a 40 °C, mas torna-se instável em temperaturas acima de 45 °C (NOVOZYMES, 2016).

Devido a contínua evolução dessa lipase, ela também aparece com os nomes de CalleraTM Trans e NS-40116 (MONTEIRO; et al., 2020). Todas as formulações já foram avaliadas para produção de biodiesel, onde foram encontrados diferentes rendimentos dependendo das condições avaliadas (CESARINI; DIAZ; NIELSEN, 2013; NIELSEN et al., 2016; REMONATTO et al., 2016; ROSSET et al., 2019; WANCURA et al., 2018a, 2018b, 2019a, 2019b).

Inicialmente para o desenvolvimento deste trabalho seria utilizado a primeira versão da formulação de Eversa, doada gentilmente pelo seu fabricante. Porém, com a disponibilidade comercial da segunda versão está foi adquirida para também ser avaliada no trabalho. Neste capítulo será apresentado o estudo de caracterização das duas formulações Eversa[®] Transform (ET) e Eversa[®] Transform 2.0 (ET 2.0), quanto as suas massas moleculares, efeito do pH e da temperatura em suas atividades hidrolíticas e estabilidade térmica. Também avaliou-se o uso de surfactantes no meio reacional afim de estabilizar a lipase em sua conformação ativa e, assim, favorecer o aumento de sua atividade.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Materiais

Formulação líquida de lipase de *T. lanuginosus* (Eversa[®] Transform (ET) foi gentilmente fornecida pela Novozymes Latin America Ltda (Araucária, PR, Brasil). Eversa[®] Transform 2.0 (ET 2.0, formulação líquida produzida pela Novozymes A/S), albumina de soro bovino (BSA), tributirina 97% (m/m), e reagente de Bradford foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros produtos químicos e solventes foram de qualidade analítica e usados conforme recebidos.

3.2.2 Atividade Enzimática

A atividade hidrolítica foi medida de acordo com Beisson et al., (2000) com pequenas modificações. Um volume de 50 µL da solução enzimática foi adicionado a um meio reacional contendo 6,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, 1,5 mL de tributirina e 16,5 mL de água destilada. A reação foi realizada a 37 °C e a mistura reacional foi agitada a 500 rpm durante 5 min. A hidrólise da tributirina foi monitorada por titulometria em um titulador Titrino 907 (Metrohm, Herisau, Suíça) usando uma solução de KOH 20 mM como agente de titulação. A atividade hidrolítica foi calculada a partir do consumo de KOH necessário para neutralizar o ácido butírico liberado na reação. Uma unidade de tributirina (TBU) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido butírico por minuto nas condições descritas.

3.2.3 Ensaio de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Albumina de soro bovino (BSA) (0,2 a 1 mg/mL) foi usada como proteína padrão para construir uma curva de calibração (concentração “mg/mL” versus absorvância). Em 25µL da solução enzimática foi adicionado 1 mL do reagente de Bradford, o branco continha apenas 1 mL do reagente de Bradford. Após agitar a mistura, foi deixada em repouso por 7 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 595 nm.

3.2.4 Eletroforese SDS-PAGE

As lipases ET e ET 2.0 foram avaliadas por eletroforese SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 12%) seguindo as condições desnaturantes descritas por Laemmli, (1970) e Silva, (2015) em sistema MiniProtean (Bio-Rad).

O gel de poliacrilamida 12% (m/v) (gel de separação) foi preparado utilizando 3,3 mL de solução de acrilamida-bisacrilamida 10% (m/v), 2,5 mL de tampão de separação (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8), 50 µL de solução SDS 10% (m/v), 4,1 mL de água Milli-Q, 10 µL de TEMED (tetrametiletilenodiamina) e 100 µL de PSA (persulfato de amônia) 10% (m/v). A solução foi então cuidadosamente inserida entre as placas de eletroforese, deixando-se 1 cm livre na extremidade superior, onde foi adicionado isopropanol para nivelar o gel. Enquanto ocorria a polimerização do gel, preparou-se o gel de poliacrilamida 4% (m/v) (gel de empilhamento) contendo 0,65 mL de solução de acrilamida-bisacrilamida 10%, 1,25 mL de tampão de empilhamento (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8), 50 µL de solução SDS 10% (m/v), 3,05 mL de água ultrapura, 10 µL de TEMED (tetrametiletilenodiamina) e 50 µL de PSA (persulfato de amônio) 10% (m/v). Após a remoção do isopropanol do gel de separação, completou-se o espaço entre as placas de eletroforese com a solução de empilhamento, deixando o sistema em repouso para a polimerização do gel de empilhamento. 15 µL das amostras das soluções enzimáticas (1 mg/mL) foram aquecidas (98 °C) por 5 min em tampão de ruptura (Tris-HCl 75 mM, β-mercaptoetanol 5% (v/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,01% (v/v), pH 6,8) e aplicadas em canaletas pré-formadas no gel de empilhamento.

A corrida do gel foi realizada por 90 minutos a uma tensão de 160 V em cuba de eletroforese vertical, conectada a uma fonte de alimentação (Power PAC 1.000, BIORAD-USA) contendo tampão de corrida (Tris base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% m/v, pH 8,3). Após as corridas das amostras, o gel foi corado com uma solução de 0,25% (m/m) de Coomassie Brilliant Blue, 5% (v/v) de etanol e 1% (v/v) de ácido acético. Depois o gel foi descorado com uma solução de 30% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido acético por 1 hora. A distribuição da massa molecular das amostras foi determinada usando um marcador molecular Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit (Mw de 14,4-97 kDa, GE Healthcare Brasil, Barueri, SP, Brasil).

3.2.5 Efeito do pH e temperatura na atividade hidrolítica e estabilidade térmica das lipases solúveis

A atividade hidrolítica foi determinada em diferentes valores de pH a 37 °C, usando diferentes tampões a 100 mM: acetato de sódio em pH 5,0, fosfato de sódio em valores de pH de 6,0 a 8,0 e carbonato de sódio em pH 9,0 e 10,0.

Para determinar o efeito da temperatura na atividade enzimática das duas formulações de Eversa, a atividade hidrolítica foi medida usando tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,5 em uma faixa de temperatura de 10 a 60 °C para a ET e 10 a 70 °C para a ET 2.0.

Para os ensaios de estabilidade térmica, a ET foi incubada a 50 e 60°C e a ET 2.0 a 60 e 70 °C em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0. Em intervalos regulares de tempo, as amostras foram retiradas para medir sua atividade hidrolítica, conforme descrito na seção 3.2.2

3.2.6 Efeito dos surfactantes na atividade da enzimática

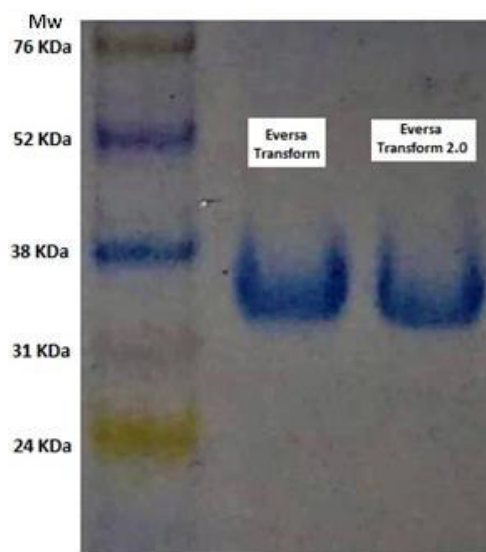
Um mililitro de uma solução enzimática de Eversa Transform (1,5 mg de proteína/mL em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0), contendo Tween 80 ou Triton X-100 (0,1 ou 1%, v/v) foi incubado em um Shaker orbital a 150 rpm, 4 °C por 24 h. Foram medidas as atividades hidrolíticas em 0, 12 e 24 h. As atividades relativas foram calculadas como a razão entre a atividade total medida em cada momento e a atividade da solução enzimática inicial sem adição de surfactante nas mesmas condições de reação, ambas em TBU (atividade de tributirina, seção 3.2.2).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Determinação das massas moleculares

A eletroforese SDS-PAGE da ET e ET 2.0 (Figura 3.1) mostra que as preparações de lipases apresentam uma pureza elevada, não sendo compostas por uma mistura de proteínas visto que apenas uma banda foi detectada para cada uma das formulações. Ambas têm massas moleculares em torno de 33 kDa, valor bem próximo ao encontrado por Remonato, (2017) para as duas lipases e por Martínez-Sanchez et al., (2020) para a ETL 2.0

Figura 3.1 - Gel de eletroforese (SDS-PAGE 12%) de Eversa Transform e Eversa Transform 2.0.



3.3.2 Atividades específicas das formulações

As atividades hidrolíticas e as concentrações de proteínas dessas formulações são mostradas na Tabela 3.1. Ambas formulações têm atividades específicas semelhantes, embora a formulação de ET 2.0 seja mais concentrada.

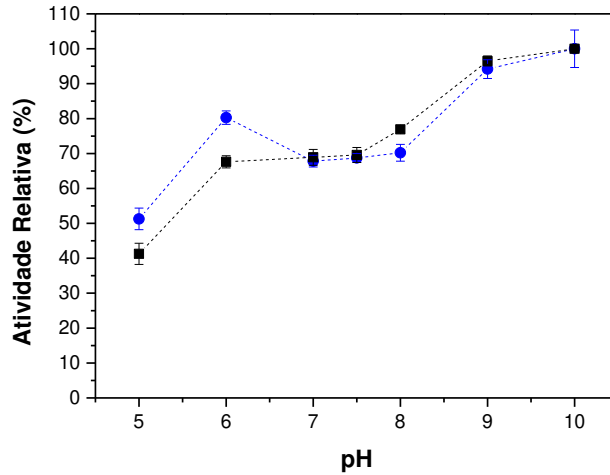
Tabela 3.1 - Concentração de proteínas e atividade hidrolítica das formulações de Eversa Transform. Os valores são expressos como média de duplicatas \pm desvio padrão.

Lipase	Concentração de proteína (mg/mL)	Atividade hidrolítica (TBU/mL)	Atividade específica (TBU/mg)
Eversa Transform	19,89 \pm 0,69	49258,37 \pm 1074,13	2477,42
Eversa Transform 2.0	32,75 \pm 1,49	96616,60 \pm 6556,47	2949,76

3.3.3 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática

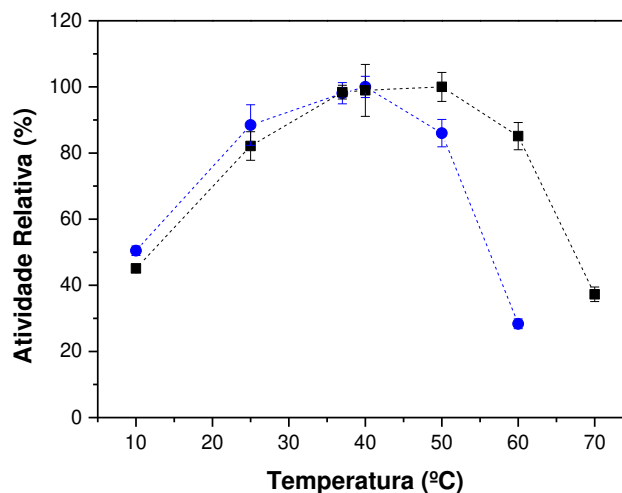
O efeito do pH nas atividades hidrolíticas das duas formulações de lipase (Figura 3.2) mostrou que ambas tinham perfis muito semelhantes, com as maiores atividades em valores de pH alcalinos. Resultados semelhantes foram relatados por Bresolin et al., (2019) para a lipase NS-40116 (uma formulação da lipase de *Thermomyces lanuginosus*) e por Arana-peña; Lokha; Fernández-Lafuente, (2018) para a Eversa Transform 2.0.

Figura 3.2 - Efeito do pH nas atividades da Eversa Transform (●) e Eversa Transform 2.0 (■) livres. Atividade determinada pela hidrólise de tributirina (concentração enzimática de 5 mg/mL, 37°C, tampão fosfato de sódio, 100 mM).



A Figura 3.3 mostra que a ET possui atividade máxima na faixa de 35 a 40°C, enquanto a ET 2.0 na faixa de 35°C a 50°C, confirmando que a última foi formulada para ser mais estável em altas temperaturas (RANCKE-MADSEN, 2016). A 60 °C, enquanto ET tem menos de 30% da atividade máxima, a ET 2.0 tem mais de 80%.

Figura 3.3 - Efeito da temperatura nas atividades da Eversa Transform (●) e Eversa Transform 2.0 (■) livres. Atividade determinada pela hidrólise de tributirina (concentração enzimática de 5 mg/mL, pH 7,5, tampão fosfato de sódio 100 mM).

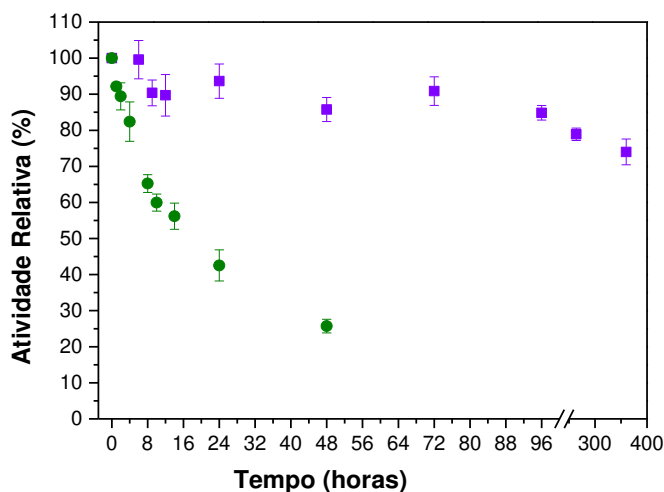


3.3.4 Estabilidade térmica

A Figura 3.4 mostra os perfis de inativação térmica para ET a 50 e 60 °C (pH 7,0). A enzima apresentou alta estabilidade a 50 °C, retendo cerca de 75% de sua atividade inicial após

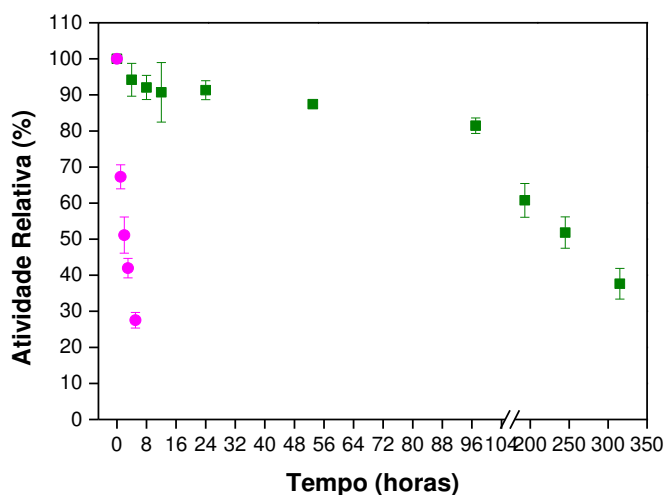
360 h de incubação. Porém, a 60°C a enzima reteve apenas 25% de sua atividade inicial após 48 h de incubação. Nessa temperatura, a enzima teve uma meia-vida em torno de 16 h.

Figura 3.4 - Perfil de inativação térmica da Eversa Transform a 50 °C (■) e 60 °C (●). Condições de ensaio: concentração enzimática de 5 mg/mL, pH 7,0, tampão fosfato de sódio 100 mM. A atividade da solução inicial da enzima (0h) foi considerada como 100%. Atividades hidrolíticas foram medidas com a tributirina como substrato.



A formulação líquida ET 2.0 foi mais estável em temperaturas mais altas (Figura 3.5). A 60 °C, a enzima exibia meia-vida em torno de 250 h, retendo cerca de 80% e 37% de sua atividade inicial após 96 e 315 h de incubação, respectivamente. Além disso, a 70 °C também foi possível detectar cerca de 27% de sua atividade inicial após 5 h de incubação.

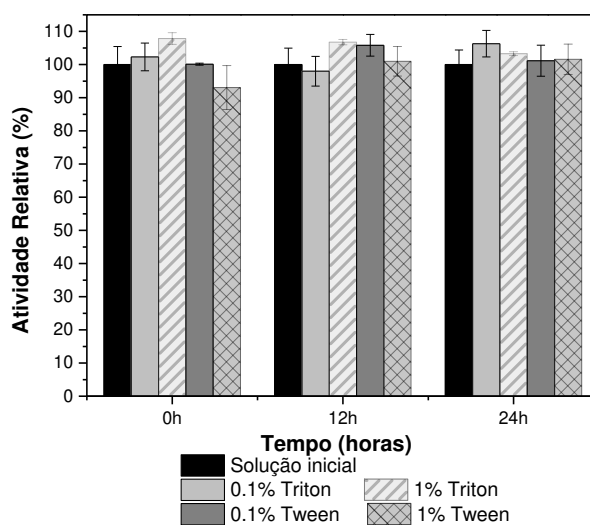
Figura 3.5 - Perfil de inativação térmica da Eversa Transform 2.0 a 60 °C (■) e 70 °C (●). Condições de ensaio: concentração enzimática de 5 mg/mL, pH 7,0, tampão fosfato de sódio 100 mM. A atividade da solução inicial da enzima (0h) foi considerada como 100%. Atividades hidrolíticas foram medidas com a tributirina como substrato.



O uso de surfactantes no meio reacional pode ter o efeito de estabilizar as lipases em sua conformação aberta, ativa e, assim, favorecer o aumento de sua atividade. Dependendo da concentração utilizada os detergentes também podem se comportar como inibidores de lipase ou agentes inativadores. Dessa forma, o efeito final das adições de detergente nem sempre é positivo (CRUZ-IZQUIERDO et al., 2014; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007; MATEO et al., 2007).

A adição de Triton X-100 ou Tween 80 à solução de ET não teve efeito significativo na atividade enzimática em concentrações de 0,1 ou 1% (v/v), como mostrado na Figura 3.6. Com a similaridade das duas formulações e devido ao resultado com a ET, não foi realizado o ensaio com a ET 2.0 e os estudos adicionais para a imobilização pela técnica de CLEA (capítulo 4) foram realizados sem surfactantes.

Figura 3.6 - Efeito de surfactantes na atividade hidrolítica da lipase Eversa Transform. Condições de ensaio: concentração de enzima de 1,5 mg/mL em tampão de fosfato de sódio 5 mM, pH 7, 4 °C, 150 rpm. A atividade da solução inicial da enzima (sem surfactante) foi considerada como 100%.



3.4 Conclusão

A partir dos ensaios de caracterização conclui-se que as formulações apresentam características semelhantes, derivando da mesma lipase de *Thermomyces lanuginosus*, porém com a ET 2.0 apresentando uma maior termoestabilidade.

Para dar continuidade ao trabalho e estudar a imobilização da enzima e aplicação na produção de biodiesel a segunda versão da formulação, Eversa[®] Transform 2.0, foi selecionada. Além de ser mais resistente à temperatura, ela é disponibilizada comercialmente.

4. COMPÓSITOS DE AGREGADOS RETICULADOS DE EVERSA® TRANSFORM E NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS. DESEMPENHO NA ETANÓLISE DO ÓLEO DE SOJA

Neste capítulo será apresentado e reproduzido na sua versão em português o estudo publicado como artigo científico na revista *Catalysts* (MIRANDA et al., 2020), doi:10.3390/catal10080817. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/10/8/817>

Resumo: A lipase de Eversa® Transform 2.0 foi lançada para ser usada na forma livre, mas a sua imobilização pode melhorar seu desempenho. Este trabalho teve como objetivo otimizar a imobilização da Eversa® Transform 2.0 pela técnica de agregados enzimáticos reticulados (CLEAs), utilizando quase todas as ferramentas disponíveis para melhorar seu desempenho. Diversas variáveis na preparação dos CLEAs foram otimizadas para melhorar a atividade recuperada, como natureza do precipitante e concentração do agente reticulante. Além disso, alguns co-feeders e aditivos foram coprecipitados para melhorar a etapa de reticulação, como albumina de soro bovino, proteína de soja ou polietilenoimina. O amido (posteriormente degradado enzimaticamente) foi utilizado como um agente porogênico para diminuir as limitações de difusão do substrato. Nanopartículas magnéticas de sílica também foram utilizadas para simplificar o manuseio do CLEA, mas foi descoberto que uma grande porcentagem da Eversa poderia ser imobilizada nessas nanopartículas antes da agregação. O melhor protocolo na produção do CLEA obteve um rendimento de imobilização de 98,9% e 30,1% de atividade recuperada, exibiu uma estrutura porosa e um excelente desempenho na transesterificação do óleo de soja com etanol: um rendimento mássico de 89,8% de ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAGs) após 12 h de reação, enquanto a enzima solúvel necessitou de 48 h de reação para dar o mesmo rendimento. Uma etapa de polimento cáustico do produto rendeu um biodiesel contendo 98,9% (m/m) de EEAGs e um teor de ácidos graxos livres inferior a 0,25%, portanto, o produto final atendeu aos padrões internacionais para biodiesel. O biocatalisador imobilizado pode ser reutilizado por pelo menos cinco ciclos de 12 h, mantendo 89,6% do rendimento do primeiro ciclo, mostrando a recuperação eficiente do catalisador pela aplicação de um campo magnético externo.

4.1 Introdução

A atual preocupação com o aquecimento global e a redução das fontes de combustível fóssil tem impulsionado a busca por combustíveis menos poluentes e renováveis (ERDIWANSYAH et al., 2019; JAMIL et al., 2018; MEHER; VIDYASAGAR; NAIK, 2006; SINGH et al., 2019; VARGAS et al., 2018; ZHANG et al., 2019). O biodiesel, obtido por esterificação de ácidos graxos ou transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais com álcoois de cadeia curta, tornou-se um combustível alternativo atraente (ERDIWANSYAH et al., 2019; JAMIL et al., 2018; SINGH et al., 2019; TAN et al., 2010; VARGAS et al., 2018; ZHANG et al., 2019).

Atualmente, a produção de biodiesel em larga escala utiliza ácidos ou álcalis como catalisadores (MOAZENI; CHEN; ZHANG, 2019; ZHANG et al., 2019), mas a substituição de catalisadores químicos por enzimáticos tem sido amplamente estudada (ARANSIOLA et al., 2014; CORTEZ et al., 2018; LOTTI et al., 2018; TAN et al., 2010; VARGAS et al., 2018). A produção enzimática de biodiesel pode superar algumas desvantagens da rota química, como a alta demanda energética, o uso de matéria-prima com alta pureza (por exemplo, álcoois anidros e óleos de baixa acidez), a complexidade da recuperação e purificação do produto, e a necessidade de tratamento dos efluentes (ARANSIOLA et al., 2014; BISEN et al., 2010; LOTTI et al., 2018; MOAZENI; CHEN; ZHANG, 2019; TAN et al., 2010). No entanto, as principais desvantagens do uso de lipases são o custo mais elevado do biocatalisador e o tempo de reação, mais longo em comparação com a rota química (NORJANNAH et al., 2016; POPPE et al., 2015; POURZOLFAGHAR et al., 2016; THANGARAJ et al., 2019). Outro problema das lipases é que elas têm especificidade de substrato, portanto, uma lipase específica pode não reconhecer o alto número de substratos prováveis contidos em um óleo, que é um substrato heterogêneo (ARANA-PEÑA et al., 2020; RAMOS et al., 2019).

As enzimas utilizadas na produção de biodiesel são as lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) (GUMBA et al., 2016; MOAZENI; CHEN; ZHANG, 2019; THANGARAJ et al., 2019). A função natural dessas enzimas é a hidrólise de triglicerídeos na interface água-óleo, liberando ácidos graxos livres, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol. No entanto, elas também são capazes de catalisar reações de esterificação e transesterificação em meios orgânicos (com conteúdo de água restrito) (CORTEZ et al., 2018; KAPOOR; GUPTA, 2012; NORJANNAH et al., 2016). As lipases têm duas conformações diferentes devido à presença de uma cadeia polipeptídica (“tampa”). Sua interação com uma superfície hidrofóbica faz com que a enzima se mova de sua conformação inativa (tampa fechada) para ativa (tampa aberta), expondo seu sítio ativo, conferindo atividade catalítica e livre acesso ao substrato. Este mecanismo catalítico da lipase é conhecido como ativação interfacial (BRZOZOWSKI et al., 1991; SCHRAG et al., 1997). Este mecanismo tem sido usado para desenvolver protocolos que permitem a imobilização, purificação, estabilização e hiperativação de lipases por meio da imobilização de sua forma aberta em suportes hidrofóbicos (MANOEL et al., 2015; RODRIGUES et al., 2019).

A Eversa[®] Transform foi anunciada em 2014 como a primeira formulação enzimática líquida disponível comercialmente para produção de biodiesel, e em 2016 uma nova versão foi lançada no mercado, Eversa[®] Transform 2.0 (NOVOZYMES, 2016). Ambas são variantes geneticamente modificadas da lipase de *Thermomyces lanuginosus* com uma estabilidade

térmica melhorada (GUTIERREZ-LAZARO et al., 2018; RANCKE-MADSEN, 2016). Essas formulações foram avaliadas principalmente em sua forma líquida na produção de biodiesel com bons rendimentos (83%–97%) (ANDRADE; ERRICO; CHRISTENSEN, 2017a, 2019, 2017b; FIRDAUS et al., 2016; NGUYEN et al., 2018; NIELSEN et al., 2016; REMONATTO et al., 2016; WANCURA et al., 2019a). No entanto, seu uso na forma imobilizada ainda é pouco explorado (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2018; BRESOLIN et al., 2020; LEE et al., 2019; REMONATTO et al., 2018). Recentemente, a comparação entre Eversa[®] Transform 2.0 e lipase de *Thermomyces lanuginosus* mostrou que, embora ambas as enzimas sejam semelhantes em sua sequência, suas propriedades funcionais podem ser bastante diferentes, e isso justifica o fato de que o mesmo tratamento para ambas as enzimas pode oferecer resultados bastante diferentes (MARTÍNEZ-SANCHEZ et al., 2020).

A imobilização enzimática, se adequadamente projetada, pode aumentar a estabilidade operacional do biocatalisador, facilitando sua recuperação e permitindo sua reutilização (BRESOLIN et al., 2019; FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; GARCIA-GALAN et al., 2011; LIMA et al., 2015; MANOEL et al., 2015; MATEO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2019; URRUTIA et al., 2018). No entanto, o custo desses suportes pode aumentar o preço do biocatalisador final. Como alternativa ao uso de suportes sólidos, o professor Sheldon desenvolveu uma técnica de imobilização sem suportes muito simples, os agregados enzimáticos reticulados (CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000; SCHOEVAART et al., 2004; SHELDON, 2007, 2011a, 2011b; SHELDON; SCHOEVAART; VAN LANGEN, 2005; SHELDON; VAN PELT, 2013).

A técnica de imobilização enzimática de agregados enzimáticos reticulados (CLEAs) permite a produção de um biocatalisador com alta atividade volumétrica, não requer soluções de enzimas altamente puras e permite a co-imobilização de diferentes enzimas (CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000). No entanto, apresenta alguns problemas, como baixa resistência mecânica e limitações difusionais (GARCIA-GALAN et al., 2011). Para preparar um CLEA, a proteína é precipitada pela ação de um agente precipitante (por exemplo, sais, solventes orgânicos, polímeros, etc.), seguido por uma reticulação química com agentes bifuncionais (geralmente glutaraldeído) ou polifuncionais (por exemplo, polialdeído dextrana) (TACIAS-PASCACIO et al., 2019), que reagem principalmente com grupos amino da cadeia lateral dos resíduos de lisina na superfície da enzima (CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000; MATEO et al., 2004; TALEKAR et al., 2013). CLEAs de várias lipases foram relatados na literatura (GUAUQUE TORRES; FORESTI; FERREIRA, 2013; SCHOEVAART et al., 2004; SHAH; SHARMA; GUPTA, 2006), incluindo relatos de nosso grupo (GUIMARÃES et

al., 2018; RAMOS et al., 2018, 2019). No entanto, até onde sabemos, não há relatos na literatura científica sobre a imobilização da Eversa[®] Transform como CLEAs.

Um dos problemas na preparação de CLEAs está relacionado à quantidade de grupos amino disponíveis na superfície da enzima para uma reticulação eficiente. Uma pequena quantidade desses resíduos torna a reticulação fraca, levando à lixiviação da enzima (SHELDON, 2011a). Para superar este problema, a enzima pode ser coagregada com proteínas ricas em lisina, como albumina de soro bovino (BSA) (AMARAL-FONSECA et al., 2018; ARAUJO-SILVA et al., 2018; GUAUQUE TORRES; FORESTI; FERREIRA, 2014; MAFRA et al., 2016, 2019; ROJAS et al., 2019; SHAH; SHARMA; GUPTA, 2006), proteína de soja (ARAUJO-SILVA et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2018; MAFRA et al., 2018; RAMOS et al., 2018), ou mesmo polímeros ricos em grupos aminos, como a polietilenoimina (PEI) (AMARAL-FONSECA et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2018; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005; ROJAS et al., 2019; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017; WILSON et al., 2006).

As limitações de transferência de massa são uma das principais desvantagens dos CLEAs devido à baixa porosidade de suas estruturas supramoleculares altamente compactas (CUI; JIA, 2015; GARCIA-GALAN et al., 2011; MONTORO-GARCÍA et al., 2010). Algumas estratégias têm sido relatadas para aumentar o tamanho dos poros das partículas de CLEAs com o objetivo de reduzir ou prevenir problemas de difusão. A formação de poros maiores auxiliada por um agente porogênico foi inicialmente estudada por Wang et al., (2011), que co-precipitou a enzima com amido, e após a reticulação seguiu-se pela degradação do amido por uma α -amilase e lavagem para obtenção dos CLEAs. Essa estratégia permitiu produzir CLEAs com poros maiores em comparação aos CLEAs tradicionais, reduzindo as limitações internas de transferência de massa e aumentando a eficiência catalítica. Recentemente, Guimarães et al., (2018) também avaliaram o amido como agente porogênico na preparação de CLEAs da lipase de pâncreas suína. Eles relataram um aumento na atividade expressa do biocatalisador após a hidrólise do amido com uma α -amilase.

Outro problema do uso de CLEAs é sua recuperação do meio de reação devido ao seu pequeno tamanho e baixa resistência mecânica (GARCIA-GALAN et al., 2011). Uma recuperação mais fácil de CLEAs do meio de reação pode ser alcançada pela coagregação das enzimas com nanopartículas magnéticas, resultando em um CLEA magnético que pode ser facilmente separado do meio pela aplicação de um campo magnético externo (AMARAL-FONSECA et al., 2018, 2020; CRUZ-IZQUIERDO et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2018). Além disso, o tamanho e a funcionalização das partículas magnéticas podem determinar as propriedades finais dos CLEAs magnéticos (KOPP et al., 2015). Nesse sentido, suportes

contendo grupos acilas e aminos têm sido propostos como mais adequados para imobilização de lipase (RUEDA et al., 2016). Os grupos acilas podem permitir a adsorção interfacial da enzima ou promover um ambiente favorável à lipase (MANOEL et al., 2015; RODRIGUES et al., 2019), e os grupos aminos, além de permitir a ligação da enzima por troca iônica, podem permitir a inclusão da nanopartícula na estrutura covalente do CLEA.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo preparar CLEAs de Eversa com propriedades magnéticas para serem utilizados na síntese de biodiesel pela transesterificação de óleo de soja com etanol. Dentre o conjunto de parâmetros avaliados para a preparação de CLEA, avaliou-se a concentração e a natureza do agente precipitante, a concentração de glutaraldeído como agente de reticulação e o uso de co-feeders (proteínas ou polímeros químicos) ou nanopartículas magnéticas funcionalizadas com grupos aminos e octilas e amido para melhorar a etapa de reticulação e evitar ou reduzir problemas de transferência de massa. As propriedades funcionais do melhor biocatalisador foram posteriormente caracterizadas.

Para atender aos padrões internacionais, o biodiesel (B100) deve ter (em base mássica) um mínimo (mín.) de 96,5% de ésteres de ácidos graxos (EEAGs), máximo (máx.) de 0,8% de monoacilglicerídeos (MAGs), 0,2% de diacilglicerídeos (DAGs) e triacilglicerídeos (TAGs) e máx. 0,25% de ácidos graxos livres (AGLs) (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009; MCCURRY; WANG, 2007; SINGH et al., 2019). Nielsen et al., (2016) relataram duas estratégias para aumentar a porcentagem de ésteres no biodiesel, visando a produção de um biodiesel enzimático dentro dessas especificações. A primeira estratégia consistiu na esterificação dos AGLs residuais com a enzima Lipozyme CALB-L (formulação líquida da lipase B de *Candida antarctica*), o que permitiu a redução dos AGLs de 1,2% para <0,25% após 17 h de reação, e ao mesmo tempo, os conteúdos de MAGs e TAGs também foram significativamente reduzidos. A segunda estratégia consistiu em um polimento cáustico direto na mistura reacional (ainda com excesso de álcool) para neutralizar os AGLs, que foram separados como sabão por centrifugação. Os autores chamaram esse processo “one-pot polishing”, porque pode ser realizado no mesmo reator da transesterificação. Neste processo, os AGLs foram reduzidos para <0,25% após 30 min de incubação a 60 °C, a glicerina ligada foi reduzida para <0,22% e, ao mesmo tempo, o conteúdo de MAGs foi reduzido de 0,9% para 0,6%. Após o polimento, as fases do produto se separaram facilmente devido à ausência de uma fase emulsionada entre a fase de biodiesel e a fase pesada. Usando este processo, eles relataram uma porcentagem mássica de ésteres de ácidos graxos de 97,5% (NIELSEN et al., 2016). Dessa forma, adotou-se neste trabalho o polimento cáustico do biodiesel produzido para garantir que o produto atendesse aos requisitos industriais.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Materiais

Eversa[®] Transform 2.0 (uma formulação líquida de uma variante da lipase de *Thermomyces lanuginosus* expressa em *Aspergillus oryzae* pela Novozymes A/S), albumina de soro bovino (BSA), terc-butanol, tributirina 97% (m/m), PEI, peso molecular médio ~ 25000, ácido butírico \geq 99% (m/m), 1-butanol anidro 99,8% (m/m), heptadecanoato de metila, polietilenoglicol (PEG) e reagente de Bradford foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A solução de glutaraldeído (25% v/v em H₂O) foi adquirida na Êxodo Científica (Sumaré, SP, Brasil). O amido solúvel e a acetona P.A foram adquiridos da Qhemis (Jundiaí, SP, Brasil). Etanol anidro (99,8% P.A.) foi adquirido da Neon (São Paulo, SP, Brasil). Sulfato de amônio 99% (m/m) foi adquirido de JT Baker (Philadelphia, PA, EUA). Proteína de soja (PS) 90% (m/m) foi adquirida da Doremus Ingredientes (Guarulhos, SP, Brasil) e o óleo de soja (marca Liza) foi adquirido da Cargill do Brasil, PR, Brasil. As nanopartículas magnéticas de sílica (NPMSs) funcionalizadas com grupos aminos e octilas (NanoMag N (75%) - C8 (25%)) foram adquiridas da Kopp Technologies (São Carlos, SP, Brasil). De acordo com o fornecedor, as nanopartículas são não porosas e têm tamanho de 30-120 nm e aproximadamente 20 m² de área superficial/g de suporte. Todos os outros produtos químicos e solventes foram de qualidade analítica e usados conforme recebidos.

4.2.2 Atividade Enzimática

A atividade hidrolítica foi medida de acordo com Beisson et al., (2000) com pequenas modificações. Um volume de 50 μ L da solução enzimática ou suspensão de CLEA foi adicionado a um meio reacional contendo 6,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5, 1,5 mL de tributirina e 16,5 mL de água destilada. A reação foi realizada a 37 °C e a mistura reacional agitada a 500 rpm durante 5 min. A hidrólise da tributirina foi monitorada por titulometria em um titulador Titrino 907 (Metrohm, Herisau, Suíça) usando uma solução de KOH 20 mM como agente de titulação. A atividade hidrolítica foi calculada a partir do consumo de KOH necessários para neutralizar o ácido butírico liberado na reação. Uma unidade de tributirina (TBU) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido butírico por minuto nas condições descritas. Nessas condições, a solução de Eversa[®] Transform 2.0 (doravante denominada apenas Eversa) tinha $96616,60 \pm 6556,47$ TBU/mL de solução

(2949,76 TBU/mg de proteína). A concentração de proteína da formulação de lipase líquida comercial ($32,75 \pm 1,75$ mg/mL) foi determinada pelo método de Bradford, (1976) usando o BSA como a proteína padrão.

A atividade de esterificação foi medida em termos da síntese do butirato de butila seguindo a metodologia descrita por Paula et al., (2008). Cinquenta microlitros de enzima solúvel ou 50 mg de CLEAs secos foram adicionados ao meio de reação contendo 7,5 mL de heptano contendo 0,1 M de butanol e 0,1 M de ácido butírico e 0,1 g de peneira molecular de 3 Å (bastonete, tamanho 1/16”, Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A reação foi realizada em frascos de vidro fechados de 100 mL a 37 °C sob agitação de 250 rpm em agitador orbital (Modelo MA832, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Após 60 min de reação, 5 mL de etanol foram adicionados para interromper a reação, e a concentração de ácido foi medida por titulação em um titulador Titrino 907 (Metrohm, Herisau, Suíça) usando uma solução de KOH 20 mM. Uma unidade de esterificação (U_{est}) foi definida como a taxa inicial de produção de butirato de butila (em $\mu\text{mol}/\text{min}$) nas condições experimentais.

4.2.3 Seleção do agente precipitante

A precipitação da Eversa foi realizada pela adição do agente precipitante (acetona, etanol, PEG ou uma solução saturada de sulfato de amônio) à uma solução enzimática (1,5 mg de proteína/mL em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0) na razão volumétrica de 1:3 ou 1:9 (solução enzimática/precipitante) em banho de gelo. A mistura foi agitada por 30 min, 150 rpm a 4 °C em um agitador orbital (Modelo MA830, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil), a solução foi centrifugada ($10400\times g$, 4 °C por 10 min), o sobrenadante separado e o precipitado redissolvido em 1 mL de tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0. As atividades hidrolíticas (Seção 4.2.2) foram medidas na solução inicial (controle), no sobrenadante e na solução dos agregados redissolvidos. O rendimento de precipitação (R_{ppt}) e a atividade recuperada após a redissolução do precipitado (AR_p) foram calculados usando as seguintes equações:

$$R_{ppt}(\%) = \frac{A_i - A_s}{A_i} \times 100, \quad (4.1)$$

$$AR_p(\%) = \frac{A_t}{A_i} \times 100, \quad (4.2)$$

onde A_i é a atividade total inicial oferecida ao ensaio de precipitação, A_s é a atividade total medida no sobrenadante de precipitação e A_t é a atividade total medida na solução de agregados redissolvidos.

4.2.4 Procedimento de preparação dos CLEAs de Eversa

4.2.4.1 Ensaio Padrão

Uma solução inicial de Eversa (5 mg de proteína/mL) foi preparada em tampão fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0. O etanol foi adicionado à solução inicial na razão volumétrica de 1:3 (solução enzimática/etanol) em um banho de gelo. A suspensão resultante foi agitada a 150 rpm, 4 °C em um agitador orbital (Modelo MA830, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Após 30 min, o glutaraldeído foi adicionado à solução com a enzima precipitada nas concentrações finais de 25, 100, 300 e 500 mM e a solução resultante foi mantida a 4 °C, em agitação de 150 rpm durante 2,5 h. Em seguida, a suspensão foi centrifugada ($10400 \times g$ por 10 min a 4 °C) e o CLEA foi lavado duas vezes com tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,0 (usando o mesmo volume de etanol adicionado na etapa de precipitação) à temperatura ambiente. Os CLEAs resultantes foram ressuspendidos em tampão fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0 usando o mesmo volume da solução inicial.

4.2.4.2 Avaliação de co-feeders proteicos e nanopartículas magnéticas

O mesmo procedimento descrito na Seção 4.2.4.1 foi usado para avaliar a coagregação da Eversa com NPMSs como aditivo e PS ou BSA como co-feeders proteicos. Uma solução contendo NPMSs, BSA ou PS foi preparada para uma concentração final de 5 ou 15 mg/mL (em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0). Esta foi adicionada à solução enzimática, mantendo as razões mássicas de 1:1 ou 1:3 (proteína enzimática/aditivo). Os CLEAs preparados com co-feeders de proteína foram recuperados por centrifugação a $10.400 \times g$ por 10 min a 4 °C. Por outro lado, quando NPMSs foram usadas, os CLEAs foram recuperados aplicando um campo magnético externo (usando um ímã de neodímio, $50 \times 20 \times 20$ mm).

4.2.4.3 Avaliação do PEI como co-feeder na preparação dos CLEAs de Eversa

O PEI foi avaliado com o objetivo de facilitar a etapa de reticulação com o glutaraldeído. O tratamento com PEI foi realizado de acordo com López-Gallego et al., (2005), com modificações. Uma solução aquosa de 75 mg/mL de PEI foi preparada e o pH ajustado para 7,0. Um volume desta solução foi adicionado à solução de enzima (em tampão fosfato sódio 5 mM a pH 7,0) para uma razão mássica de 1:1 (mg de proteína/mg de PEI). A solução foi incubada a 25 °C e agitada em agitador 3D (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) a 150 rpm. Após 60 min, NPMSs ou BSA foram adicionados à solução enzimática (5 mg proteína/mL) para uma razão mássica de 1:1 ou 1:3 (enzima/aditivo), e as outras etapas seguiram a preparação padrão do CLEA descrita em Seção 4.2.4.1.

4.2.4.4 Avaliação do amido como agente porogênico

O amido foi adicionado nas soluções de enzima e aditivo (BSA ou NPMSs) preparadas em tampão fosfato de sódio 5,0 mM, pH 7,0, para uma concentração final de 3,2% (m/v). Em seguida, etanol foi adicionado a uma razão volumétrica de 1:3 (volume de enzima/volume de etanol). As outras etapas seguiram o protocolo de preparação padrão descrito na Seção 4.2.4.1. Após a lavagem dos CLEAs (duas vezes, usando o mesmo volume de etanol adicionado na etapa de precipitação) e ressuspensão (usando o mesmo volume da solução inicial) em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0, 50 µL de α -amilase (BAN 480L) e 50 µL de amiloglicosidase (AMG 300L), ambos da Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca), foram adicionados, e a suspensão foi incubada a 25 °C por 4 h para hidrolisar o amido em dextrinas, maltose e glicose, que podem ser facilmente removidos na lavagem dos CLEAs. Em seguida, os CLEAs foram recuperados por centrifugação ou por separação magnética (CLEAs com NPMSs), lavados duas vezes (usando o mesmo volume da solução inicial) com tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7 e secos de acordo com o protocolo descrito na Seção 4.2.4.5

4.2.4.5 Efeito dos parâmetros de imobilização sobre a atividade dos CLEAs de Eversa

As medidas de atividade na solução inicial, sobrenadante, sobrenadantes de lavagem e suspensão de CLEAs foram usadas para calcular os parâmetros: rendimento de imobilização

(RI) e atividade recuperada (também chamada de atividade expressa) (AR) (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020), usando as seguintes equações:

$$RI(\%) = \frac{A_i - (A_s + A_L)}{A_i} \times 100 \quad (4.3)$$

$$AR(\%) = \frac{A_{CLEA}}{A_i \times RI} \times 100 \quad (4.4)$$

onde as atividades totais A_i (solução inicial), A_{CLEA} (suspensão de CLEAs), A_s (sobrenadante) e A_L (sobrenadantes de lavagem) foram calculados como o produto da atividade volumétrica (usando tributirina como substrato, em TBU/mL, Seção 4.2.2) e do volume da solução ou suspensão (em mL). Em alguns casos, a AR foi calculada usando as atividades de esterificação total da enzima solúvel (oferecidas à imobilização) e imobilizadas (medidas nos CLEAs), Seção 4.2.2.

Antes de medir a atividade de esterificação e utilizá-los em reações de transesterificação, os CLEAs de Eversa foram lavados duas vezes com terc-butanol, vertidos em placas de petri e mantidos durante a noite em geladeira para desidratação. Após secarem, os CLEAs foram armazenados em tubos Falcon em geladeira para uso posterior. O terc-butanol foi escolhido porque não é tóxico e é suficientemente hidrofóbico (logP de 0,80) para prevenir a inativação da lipase (KOBAYASHI, 2011; LIMA et al., 2018).

4.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura do CLEAs

A morfologia da superfície dos CLEAs preparados com amido e BSA ou NPMSs (denominados neste trabalho Eversa-BSA-CLEA e Eversa-mCLEA, respectivamente) foram investigados por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) usando um microscópio eletrônico FEI, Magellan 400 L (Alemanha) operado a 2 kV.

4.2.6 Efeito do pH e temperatura na atividade hidrolítica e estabilidade térmica dos CLEAs de Eversa

A atividade hidrolítica da formulação líquida e do CLEA de Eversa foi determinada em diferentes valores de pH a 37 °C, usando diferentes tampões a 100 mM: acetato de sódio

em pH 5,0, fosfato de sódio em valores de pH de 6,0 a 8,0 e carbonato de sódio em pH 9,0 e 10,0.

Para determinar o efeito da temperatura na atividade da enzima solúvel e do CLEA de Eversa, a atividade hidrolítica foi medida usando tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,5 em uma faixa de temperatura de 10 a 70 °C.

Para os ensaios de estabilidade térmica, as enzimas solúvel e imobilizada foram incubadas a 70 °C em tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,0. Em intervalos regulares de tempo, as amostras foram retiradas para medir sua atividade hidrolítica (Seção 4.2.2).

4.2.7 Transesterificação do óleo de soja com etanol usando a Eversa solúvel e CLEAs

O meio reacional foi composto por 15 g de óleo de soja refinado Liza e 4,75 g de etanol anidro (razão molar óleo/etanol de 1:6), 1,6-6,6% de água (m/m_{óleo}) e 3-12 U_{est}/g_{óleo} de Eversa em formulações solúvel ou imobilizada (Eversa-BSA-CLEA e Eversa-mCLEA). A reação ocorreu em um reator de fluxo em vórtice (RAMOS et al., 2018) e foi operado a 35–40 °C por 12–72 horas, a rotação do cilindro interno foi de 1500–2000 rpm. Amostras foram retiradas para analisar glicerídeos (monoacilglicerídeos (MAGs), diacilglicerídeos (DAGs) e triacilglicerídeos (TAGs)) e ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAGs) por cromatografia líquida e gasosa (Seções 4.2.9 e 4.2.10, respectivamente). O conteúdo de água nas formulações de Eversa (solúvel e imobilizada) foi determinado por análise titulométrica de Karl Fisher (MARGRETH; SCHLINK; STEINBACH, 2010) em um titulador Titrino 907 (Metrohm, Herisau, Suíça). Os teores de AGLs nos produtos de biodiesel foram determinados de acordo com o Método Oficial AOCS Ca 5a-40 (Seção 4.2.8).

4.2.7.1 Estabilidade operacional do Eversa-mCLEA na reação de transesterificação

O biocatalisador Eversa-mCLEA foi utilizado em bateladas sucessivas de 12 h na transesterificação do óleo de soja com etanol a 40 °C em um reator de fluxo em vórtice e agitação a 1700-2000 rpm. No primeiro ciclo, a mistura reacional continha óleo de soja refinado (15 g), etanol anidro para uma razão molar de óleo/etanol de 1:6 e 12 U_{est}/g_{óleo} de Eversa-mCLEA. Após cada ciclo de 12 h, o biocatalisador foi recuperado pela aplicação de um campo magnético externo, seguido de duas lavagens com 10 mL de terc-butanol antes de ser usado no próximo ciclo. No final de cada ciclo, EEAGs, glicerol, TAGs, DAGs e MAGs foram

analisados por cromatografia gasosa (Seção 4.2.10) e AGLs de acordo com o Método Oficial AOCS Ca 5a-40 (Seção 4.2.8).

4.2.7.2 Polimento cáustico do biodiesel

O polimento cáustico do biodiesel foi realizado de acordo com Nielsen et al., (2016), com modificações. Após a reação de transesterificação catalisada pelo Eversa-mCLEA e a recuperação do catalisador, o teor de AGLs do meio de reação foi quantificado (Seção 4.2.8) e um volume de solução de NaOH a 4% (m/v) foi adicionado à mistura de biodiesel na proporção de 1,15 equivalentes molares por mol de AGLs residuais. A mistura foi mantida a 60 °C em um agitador orbital (Modelo SL-222, Solab, Piracicaba, SP, Brasil) a 60 rpm por 1 h. Em seguida, a mistura foi decantada por 10 min a 60 °C, e posteriormente, centrifugada a 10400 × g por 10 min a 25 °C. A fase leve foi recuperada, lavada com água destilada quente (utilizando o mesmo volume de amostra) e centrifugada (este protocolo foi repetido três vezes). A amostra lavada foi seca durante a noite em estufa a 60 °C. Após a secagem, a amostra foi caracterizada em termos de AGLs (Seção 4.2.8) e EEAGs, MAGs, DAGs e TAGs (Seção 4.2.10).

4.2.8 Determinação dos ácidos graxos livres

Os AGLs foram determinados de acordo com o Método Oficial AOCS Ca 5a-40, mas modificado por Rukunudin et al., (1998). Uma amostra foi misturada com etanol e titulada em um titulador Titrino 907 (Metrohm, Herisau, Suíça) usando uma solução de KOH. A concentração de AGLs foi calculada como porcentagem de ácido oleico, de acordo com a Equação 4.5:

$$AGLs (\% \text{ácido oleico}) = \frac{\text{volume KOH gasto (mL)} \times \text{Normalidade da Base} \times 28,2}{\text{massa da amostra (g)}} \quad (4.5)$$

4.2.9 Análise de HPLC das reações de produção de biodiesel

As amostras das reações de transesterificação foram centrifugadas a 14.500 × g por 5 min a 5 °C para separar as duas fases (fases polar e não polar). Em seguida, 50 µL da fase apolar (fase oleosa) foram pesados e diluídos 1.650 vezes em uma solução de 2-propanol-hexano (5:4,

v/v). Essa solução foi filtrada em um filtro microporoso de 0,22 μm e 20 μL foram injetados para análise. As concentrações de TAGs, DAGs, MAGs e EEAGs foram analisadas por cromatografia líquida utilizando a metodologia proposta por Holčapek et al., (1999), com algumas modificações. Foi utilizado um cromatógrafo E-2695 Waters (Waters, Millford, CA, EUA) equipado com um detector de UV (ajustado para 205 nm) usando uma coluna de fase reversa Ascentis® Express C18 (10 cm \times 46 mm \times 2,7 μm , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A fase móvel era composta por água (Fase A), acetonitrila (Fase B) e isopropanol:hexano (5:4, v/v) (Fase C) com vazão de 1 mL/min. A quantificação das concentrações molares de TAGs, DAGs, MAGs e EEAGs foram calculados pela Equação 4.6 (AGUILAR, 2018):

$$C_{\text{molar},i} = \frac{\%_{\text{área},i} \times m}{MM_i \times V} \quad (4.6)$$

onde i é um componente específico (acilglicerídeos ou EEAGs), $\%_{\text{área},i}$ é a porcentagem da área cromatográfica do componente i , MM_i é a massa molecular de cada componente i (g/mol), V é o volume da amostra da fase oleosa (L), e m é a massa da amostra (g).

4.2.10 Análises de cromatografia gasosa das reações de produção de biodiesel

EEAGs, glicerol, TAGs, DAGs e MAGs foram quantificados por cromatografia gasosa em um cromatógrafo Agilent 7890A (Santa Clara, CA, EUA) equipado com detector de ionização de chama.

As análises de EEAGs foram realizadas de acordo com os métodos ASTM D6751 e EN14103 (DUVEKOT, 2011), com modificações. O injetor e o detector foram ajustados para 250 °C. A separação dos EEAGs foi realizada em coluna capilar Rtx-Wax (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm , Restek Corporation, Bellefonte, PA, EUA) utilizando uma temperatura de 210 °C e hélio como gás de arraste. O heptadecanoato de metila foi utilizado como padrão interno. Para análise, 1 mL da amostra da mistura reacional foi centrifugada a 10.000 \times g por 10 min a 4 °C. A fase leve foi recuperada, lavada com água destilada quente (utilizando o mesmo volume da amostra) e centrifugada (a lavagem repetiu-se por 3 vezes), e seca durante a noite em estufa a 60 °C. As amostras de EEAGs secas (50 mg) foram diluídas em 1 mL de solução de

heptadecanoato de metila (10 mg/mL, em heptano) e 1 μ L foram injetados no equipamento. O rendimento de EEAGs (% m/m) foi calculado de acordo com a Equação 4.7:

$$\text{Rendimento EEAGs (\%, m/m)} = \frac{(\sum A) - A_{PI}}{A_{PI}} \times \frac{C_{PI} \times V_{PI}}{m} \times 100, \quad (4.7)$$

onde $\sum A$ é a soma das áreas dos picos de ésteres etílicos de ácidos graxos C14:0 a C24:0, A_{PI} é a área do pico do padrão interno (C17), C_{PI} é a concentração do padrão interno (10 mg/mL), V_{PI} é o volume da solução de padrão interno (1 mL) e m é a massa da amostra (50 mg).

Os conteúdos de glicerol livre, TAGs, DAGs e MAGs (em %, m/m) foram determinados por cromatografia gasosa em um cromatógrafo Agilent 7890A (Santa Clara, CA, EUA) equipado com um injetor automático on-column um detector de ionização de chama. Um volume de amostra de 1 μ L foi injetado em uma coluna Select Biodiesel (glicerídeos, UM + 2 mRG, 15 m \times 0,32 mm \times 0,1 μ m, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), e a seguinte rampa de temperatura foi usada: 50 $^{\circ}$ C por 1 min, aquecimento até 180 $^{\circ}$ C a 15 $^{\circ}$ C/min, 230 $^{\circ}$ C a 7 $^{\circ}$ C/min e 380 $^{\circ}$ C a 10 $^{\circ}$ C/min, mantido por 10 min. A temperatura do detector foi de 380 $^{\circ}$ C e o gás hélio foi usado como gás de arraste. Para a construção das curvas de calibração foram usados os padrões de dioleína, monooleína e trioleína, padrões internos (butanotriol e tricaprina) e derivatização usando N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA), todos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A preparação, análise e quantificação das amostras foram realizadas de acordo com os métodos ASTM D6584 e EN14105 com modificações (MCCURRY; WANG, 2007).

4.3 Resultados e discussão

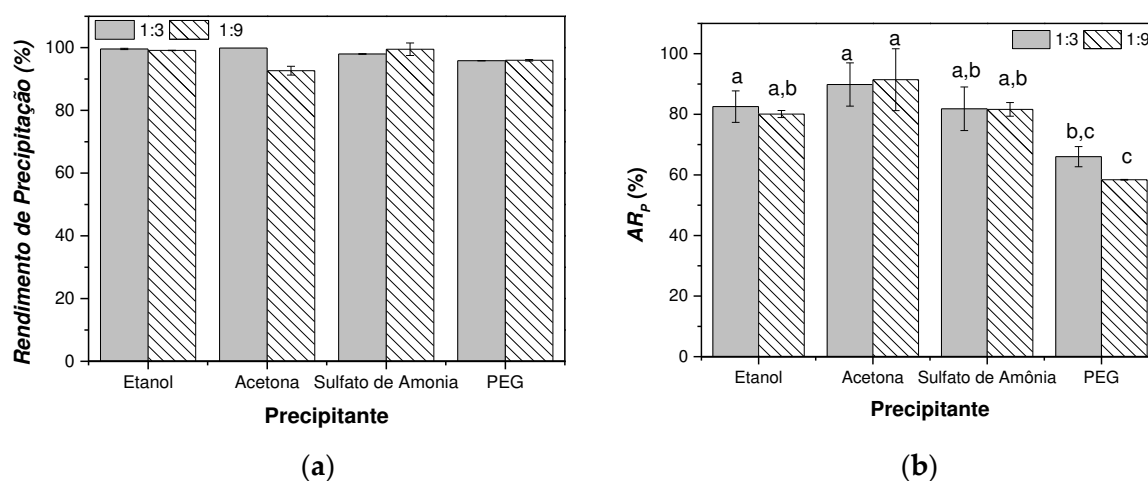
4.3.1 Preparação de CLEAs de Eversa

4.3.1.1 Seleção do precipitante

Todos os precipitantes avaliados foram capazes de precipitar mais de 95% da enzima (Figura 4.1a). No entanto, o precipitado obtido com acetona, etanol e sulfato de amônio (solução saturada) foi capaz de expressar mais de 80% da atividade após a redissolução dos precipitados (Figura 4.1b), enquanto para o polietilenoglicol (PEG), a maior atividade recuperada após a

redissolução foi de 66,0% e 58,4%, usando uma razão volumétrica solução enzimática/precipitante de 1:3 e 1:9 (v/v), respectivamente. Para todos os precipitantes, o aumento em sua concentração (razão volumétrica de 1:9) não mostrou uma melhora significativa nas atividades recuperadas após a redissolução. Assim, a razão de 1:3 foi selecionada para a preparação dos CLEAs de Eversa. O etanol foi selecionado como precipitante por suas vantagens econômicas e ambientais.

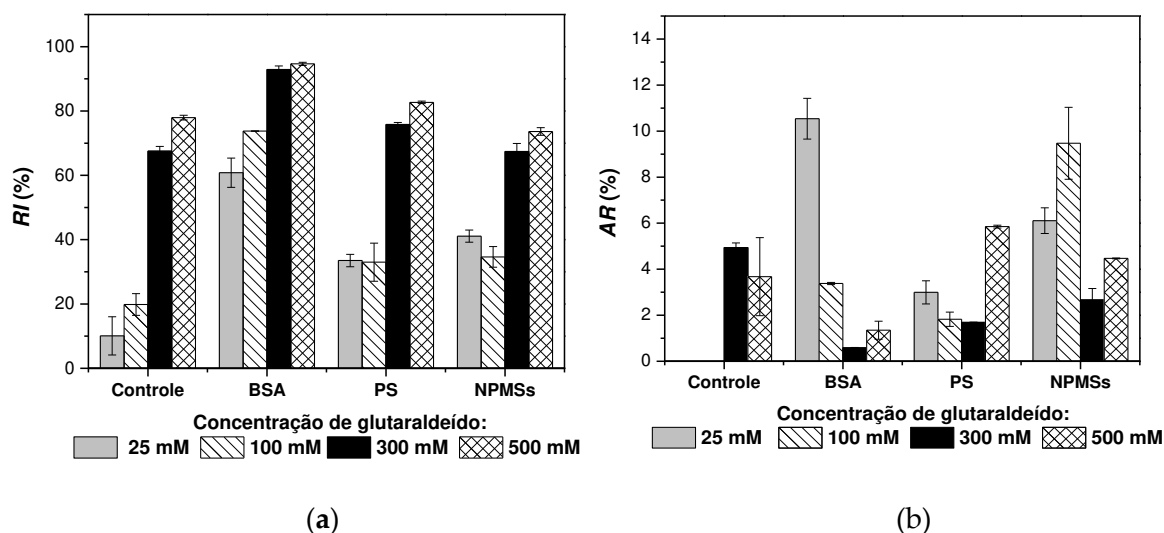
Figura 4.1 - Avaliação da natureza e razão volumétrica solução enzimática/precipitante na precipitação da Eversa. (a) Rendimento de precipitação da atividade (Rppt, Equação (4.1)) e (b) atividade recuperada após a redissolução dos precipitados (ARp, Equação (4.2)). Condições de precipitação: 4 °C, 150 rpm, solução enzimática 1,5 mg/mL em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7. Nota: As médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As atividades hidrolíticas foram medidas usando a tributirina como substrato (Seção 4.2.2).



4.3.1.2 Avaliação de co-feeders, aditivo e concentração de glutaraldeído na preparação de CLEAs de Eversa

Os CLEAs de Eversa foram preparados sem (Controle) e com co-feeders de proteínas, albumina de soro bovino (BSA) ou proteína de soja (PS), ou com nanopartículas magnéticas de sílica (NPMSs) funcionalizadas com grupos aminos e octilas, usando diferentes concentrações de glutaraldeído (25, 100, 300 e 500 mM) na etapa de reticulação. A Figura 4.2 mostra os resultados dos rendimentos de imobilização (RIs, Equação (4.3), Seção 4.2.4.5) e atividades recuperadas (ARs, Equação (4.4), Seção 4.2.4.5), respectivamente.

Figura 4.2 - (a) Rendimentos de imobilização (RI, Equação (4.3)) e (b) atividade recuperada (AR, Equação (4.4)) dos agregados enzimáticos reticulados de Eversa (CLEAs) preparados sem e com co-feeders de proteínas (soro bovino albumina (BSA), proteína de soja (PS)) ou com nanopartículas magnéticas de sílica (NPMSs). Condições experimentais: 5 mg/mL de solução enzimática, razão mássica proteína/co-feeder ou aditivo de 1:1. Precipitação com etanol (razão volumétrica 1:3 solução enzimática/etanol), 4 °C, 150 rpm, 30 min de precipitação, seguida de um tratamento de 2,5 horas com glutaraldeído. As atividades hidrolíticas foram medidas usando a tributirina como substrato (Seção 4.2.2).



Como mostrado na Figura 4.2a, os CLEAs de Eversa sem co-feeders ou aditivo (CLEAs controle) puderam ser obtidos para todas as concentrações de glutaraldeído, mas os RIs mais altos foram alcançados usando concentrações do reticulador superiores à 300 mM. Usando 500 mM, um RI de 77,9% foi alcançado. Para as concentrações mais baixas de glutaraldeído, a reticulação enzima-glutaraldeído não foi suficientemente intensa para preparar CLEAs fisicamente estáveis, permitindo a lixiviação da enzima quando os CLEAs foram lavados e ressuspensos (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005; SHELDON; SCHOEVAART; VAN LANGEN, 2005; WILSON et al., 2006).

O uso de co-feeders ricos em lisinas melhorou o RI mesmo em baixas concentrações de glutaraldeído. O uso do BSA como co-feeder permitiu um RI até seis vezes maior que o obtido para o CLEA controle com glutaraldeído à 25 mM. Além disso, o BSA apresentou melhores resultados do que a proteína de soja como co-feeder proteico. O rendimento de imobilização de 94,6% pode ser alcançado usando glutaraldeído à 500 mM na presença de BSA. Por outro lado, a adição de NPMSs (sem nenhuma adição de proteína) permitiu atingir um RI de 73,6% usando glutaraldeído à 500 mM.

Embora os CLEAs preparados com BSA ou NPMSs usando 300 ou 500 mM de glutaraldeído produzissem rendimentos de imobilização elevados, as atividades recuperadas

para todos os CLEAs foram inferiores a 10% (Figura 4.2b). A incubação da enzima solúvel (5 mg/mL de solução enzimática em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0) na presença de glutaraldeído 300 ou 500 mM (4 °C e 150 rpm) teve preservada $64,1 \pm 3,1\%$ e $68,6 \pm 2,1\%$ da atividade inicial da Eversa, respectivamente, sugerindo que a modificação química da enzima não foi o principal fator responsável pelas quedas de atividade nos CLEAs, mas talvez algumas limitações difusionais (ou seja, a taxa de difusão do substrato pode ser reduzida devido ao pequeno diâmetro dos poros do CLEA (GARCIA-GALAN et al., 2011)) ou pequenas alterações conformacionais da enzima. Nesse caso, dependendo da natureza do precipitante ou das condições de precipitação, a enzima pode precipitar em uma conformação inativa, mas sua atividade é restaurada quando redissolvida. No entanto, quando é reticulado, ele permanecerá na conformação inativa e exibirá uma atividade inferior (TALEKAR et al., 2013). Um fator adicional a ser considerado é o fato de que enquanto a enzima livre pode ser exposta a gotas de tributirina, as moléculas da enzima imobilizada no interior das partículas de CLEAs estarão atuando apenas na fração solúvel da tributirina (e a solubilidade deste composto em meio aquoso é muito baixo (HIRATA et al., 2016)). Devido aos melhores resultados com BSA e NPMSs, eles foram escolhidos para outros ensaios de preparação de CLEAs. As NPMSs foram usadas porque permitem recuperar CLEAs pelo uso de um campo magnético externo (AMARAL-FONSECA et al., 2018; CRUZ-IZQUIERDO et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2018; TALEKAR et al., 2012b). Além disso, o glutaraldeído à 500 mM permitiu a preparação de CLEAs com os rendimentos de imobilização mais elevados, sendo esta concentração escolhida para ensaios adicionais.

4.3.1.3 Uso de PEI como co-feeder polimérico e amido como agente porogênico

O efeito da incubação da enzima com PEI antes da adição do agente precipitante foi avaliado na preparação de CLEAs com ou sem BSA ou NPMSs, na presença ou ausência de amido como agente porogênico (WANG et al., 2011). A Tabela 4.1 mostra que altos RI foram alcançados para todas as condições avaliadas (mais de 97%). Novamente, os CLEAs preparados sem nenhum aditivo apresentaram uma AR muito baixa (menos de 1%). Porém, quando os CLEAs foram preparados com PEI, a AR aumentou 16,5 vezes (sem nenhum aditivo adicional). Além disso, com a adição de amido e BSA ou amido e NPMSs, um pequeno aumento foi observado nas ARs. No entanto, quando amido e NPMSs na razão mássica de 3:1 nanopartículas:enzima foram avaliados na preparação dos CLEAs, a AR aumentou em um fator de 2,3.

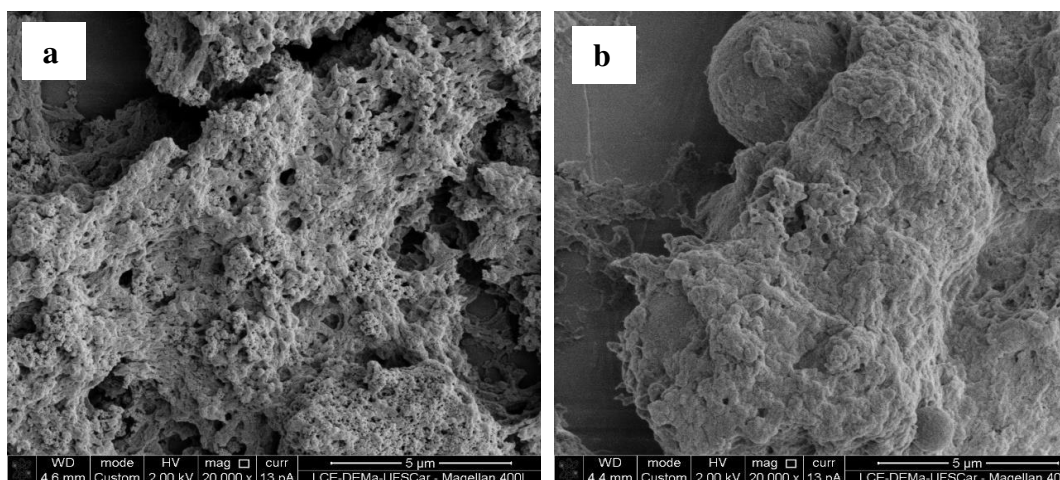
Em relação ao uso de amido como agente porogênico (WANG et al., 2011), as imagens de MEV mostraram uma estrutura mais porosa para o CLEA de Eversa preparado na presença de NPMSs (doravante denominado Eversa-mCLEA) (Figura 4.3a) após a hidrólise do amido, enquanto o CLEA preparado na presença de BSA (doravante denominado Eversa-BSA-CLEA) (Figura 4.3b) tinha uma estrutura mais compacta. As diferenças nas estruturas dos CLEAs provavelmente podem estar relacionadas ao fato da enzima ser parcialmente adsorvida nas NPMSs antes da precipitação com etanol. Foi verificado que nas condições usadas na preparação de CLEAs, cerca de 50% da atividade enzimática foi adsorvida em NPMSs após 30 min de incubação (Figura S1, Material Suplementar). Assim, os CLEAs preparados com NPMSs é uma mistura de agregados de moléculas de enzimas não adsorvidas e NPMSs contendo algumas moléculas imobilizadas de Eversa.

Tabela 4.1 - Efeito do polietilenoimina (PEI), amido e dos aditivos albumina de soro bovino (BSA) ou nanopartículas magnéticas de sílica (NPMSs) sobre os rendimentos de imobilização (RIs) e atividades recuperadas (ARs) nos CLEAs de Eversa e atividade de esterificação dos biocatalisadores.

Biocatalisador	RI (%)	AR (%)	Atividade de Esterificação $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de catalisador
1. Eversa solúvel	--	--	106,4 \pm 10,2
2. CLEA sem nenhum aditivo	99,8 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	17,9 \pm 2,1
3. CLEA na presença de PEI	97,9 \pm 0,1	13,2 \pm 0,2	95,0 \pm 1,5
4. CLEA na presença de PEI e amido	98,2 \pm 0,4	15,0 \pm 1,6	63,4 \pm 6,8
5. CLEA na presença de BSA ^a , PEI e amido	98,3 \pm 0,3	17,5 \pm 3,2	47,5 \pm 8,8
6. CLEA na presença de NPMSs ^b , PEI e amido	98,2 \pm 0,4	17,8 \pm 0,2	170,9 \pm 22,2
7. CLEA na presença de NPMSs ^c , PEI e amido	98,9 \pm 0,3	30,1 \pm 3,6	106,2 \pm 12,4

^a razão mássica enzima/BSA 1:1; razão mássica enzima/NPMSs 1:1, ^c razão mássica enzima/NPMSs 1:3. Os RIs foram calculados usando atividades hidrolíticas (usando tributirina como substrato, Equação (4.3), Seção 4.2.4.5) e ARs foram calculadas usando atividades de esterificação (taxa inicial de consumo de ácido butírico na síntese de butirato de butila, Equação (4.4), Seção 4.2.4.5). Todos os CLEAs foram preparados usando etanol como precipitante (razão volumétrica solução enzimática/etanol 1:3) e glutaraldeído 500 mM na etapa de reticulação. Os valores são expressos como a média das duplicatas \pm desvio padrão.

Figura 4.3 - Imagens de MEV dos CLEAs coagregados com polietilenoimina, amido e (a) nanopartículas magnéticas de sílica (razão mássica enzima/nanopartículas 1:1) ou (b) albumina de soro bovino (razão mássica enzima/BSA 1:1). Os CLEAs foram preparados nas mesmas condições.



Devido à sua estrutura mais porosa, o Eversa-mCLEA apresentou uma maior atividade mássica (2,2 a 3,6 vezes maior do que o Eversa-BSA-CLEA). Assim, o Eversa-mCLEA (razão mássica enzima/NPMSs de 1:3, linha 7, Tabela 4.1) foi selecionado para os próximos estudos devido a sua maior atividade recuperada (30,1%), bem como sua separação e recuperação mais rápida do meio devido a sua resposta magnética.

4.3.2 Caracterização do Eversa-mCLEA

O efeito da temperatura e do pH na atividade do Eversa-mCLEA foi comparado com os da enzima solúvel (Figuras 4.4 e 4.5).

A enzima livre apresentou um aumento na atividade até 40 °C, e depois manteve um amplo platô na faixa de temperatura de 35-50 °C, já à 60 °C sua atividade decresce, e a 70 °C apenas 40% da atividade máxima foi detectada. Já o Eversa-mCLEA aumentou a temperatura ótima para 60 °C e a 70 °C a enzima imobilizada ainda reteve cerca de 80% de sua atividade máxima (Figura 4.4). Esse comportamento pode estar associado a um aumento na rigidez da enzima (DAL MAGRO et al., 2019, 2020; RODRIGUES et al., 2013), uma vez que o CLEA é parcialmente formado por moléculas de Eversa imobilizadas via ativação interfacial (e isso produz estabilização da lipase (RODRIGUES et al., 2019)) além disso, a reticulação com glutaraldeído pode melhorar ainda mais a estabilidade da enzima, pois ela pode ocorrer tanto na enzima imobilizada nas nanopartículas ou apenas nas moléculas de enzima agregadas.

Os perfis de atividade vs. pH para lipases solúvel e imobilizada foram muito mais próximos, com as enzimas expressando atividades máximas em pH 10 (o valor de pH mais alcalino estudado) (Figura 4.5). Resultados semelhantes foram relatados por Bresolin et al., (2019) para a lipase NS-40116 (uma formulação de lipase de *Thermomyces lanuginosus*) e por Arana-Peña; Lokha; Fernández-Lafuente, (2018) para Eversa Transform 2.0.

Figura 4.4 - Efeito da temperatura nas atividades da Eversa solúvel (■) e Eversa-mCLEA (●). A atividade foi determinada pela hidrólise da tributirina (concentração da enzima solúvel de 5 mg/mL ou 10 mg de Eversa-mCLEA, em tampão fosfato de sódio, 100 mM pH 7,0).

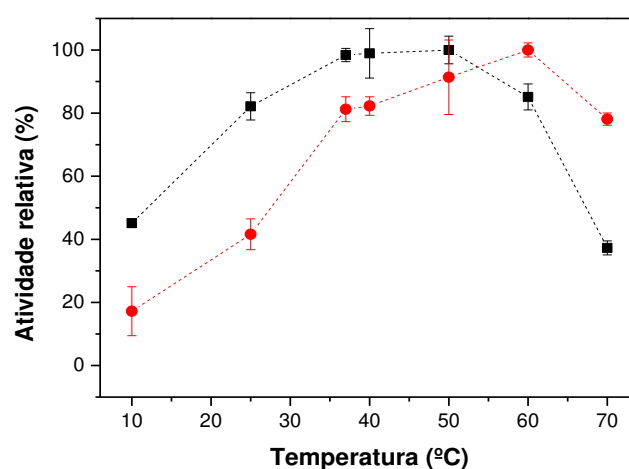
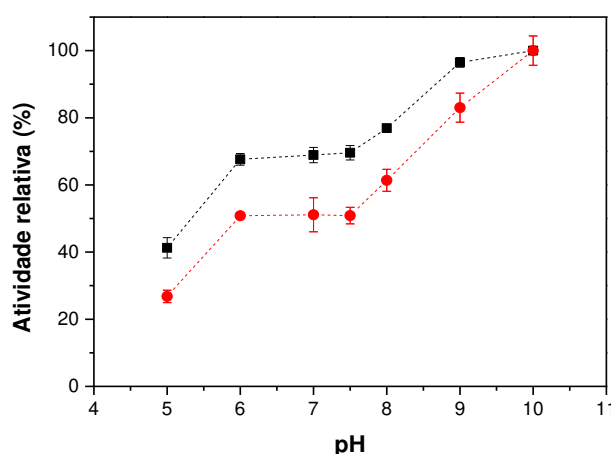


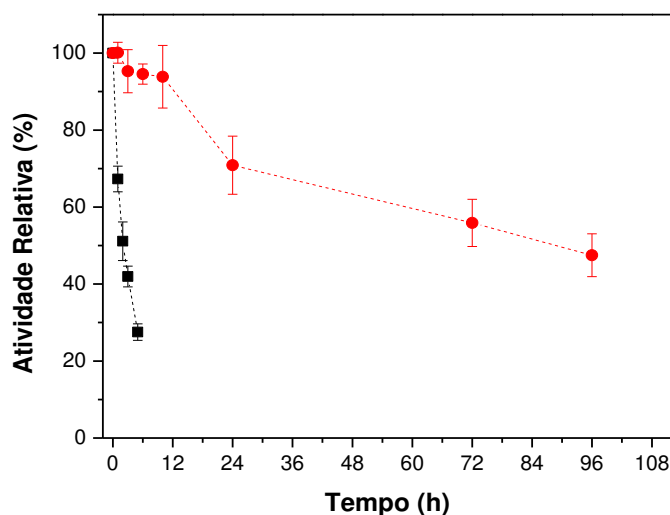
Figura 4.5 - Efeito do pH nas atividades da Eversa solúvel (■) e Eversa-mCLEA (●). A atividade foi determinada pela hidrólise da tributirina (concentração da enzima solúvel de 5 mg/mL ou 10 mg de Eversa-mCLEA, em tampão fosfato de sódio, 100 mM, pH 7,0).



A Eversa solúvel foi muito estável a 60 °C (meia-vida em torno de 250 h), na presença de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0. (KORNECKI et al., 2020; ZAAK et al., 2017) (Figura S2, Material Suplementar). Assim, as estabilidades térmicas da Eversa solúvel e imobilizada foram comparadas a 70 °C e pH 7. A Figura 4.6 mostra que a lipase imobilizada

foi cerca de 40 vezes mais estável do que a enzima solúvel (meia-vida em torno de 80 e 2 h, respectivamente).

Figura 4.6 - Perfil de inativação térmica a 70 °C da Eversa solúvel (■) e Eversa-mCLEA (●). Condições de ensaio: concentração da enzima solúvel de 5 mg/mL ou 10 mg de Eversa-mCLEA, tampão fosfato de sódio, 100 mM pH 7,0. A atividade da solução inicial da enzima foi considerada como 100%. As atividades hidrolíticas foram medidas usando a tributirina como substrato



4.3.3 Transesterificação do óleo de soja com etanol usando Eversa solúvel e imobilizada

Inicialmente, avaliou-se a transesterificação do óleo de soja com etanol a 35 °C utilizando uma razão molar óleo/etanol de 1:6 e uma carga enzimática de 3 $U_{est}/g_{\text{óleo}}$ (equivalente a 3% de Eversa solúvel, m/m_{óleo}). Essas condições foram selecionadas com base em estudos anteriores com diferentes lipases, incluindo formulações líquidas de variantes de lipases de *Thermomyces lanuginosus* (CalleraTM Trans, Eversa[®] Transform e NS-40116), em que a temperatura variou de 30 a 45 °C, a razão molar de óleo/álcool variou de 1:4 a 1:6,3, e a carga de enzima variou de 1,5% a 5% (m/m_{óleo}) (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009; MONROE et al., 2020; WANCURA et al., 2019c).

Os perfis de concentração de ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAGs), monoacilglicerídeos (MAGs), diacilglicerídeos (DAGs) e triacilglicerídeos (TAGs) gerados nas reações de transesterificação catalisados pela Eversa solúvel (Figura 4.7a) e os biocatalisadores imobilizados Eversa-mCLEA (Figuras 4.7b) e Eversa-BSA-CLEA (Figura 4.7c) foram avaliados em uma reação de 24 horas. Para a enzima solúvel e Eversa-mCLEA, os perfis de concentração de EEAGs, MAGs, DAGs e TAGs foram muito semelhantes. Após 24 h de

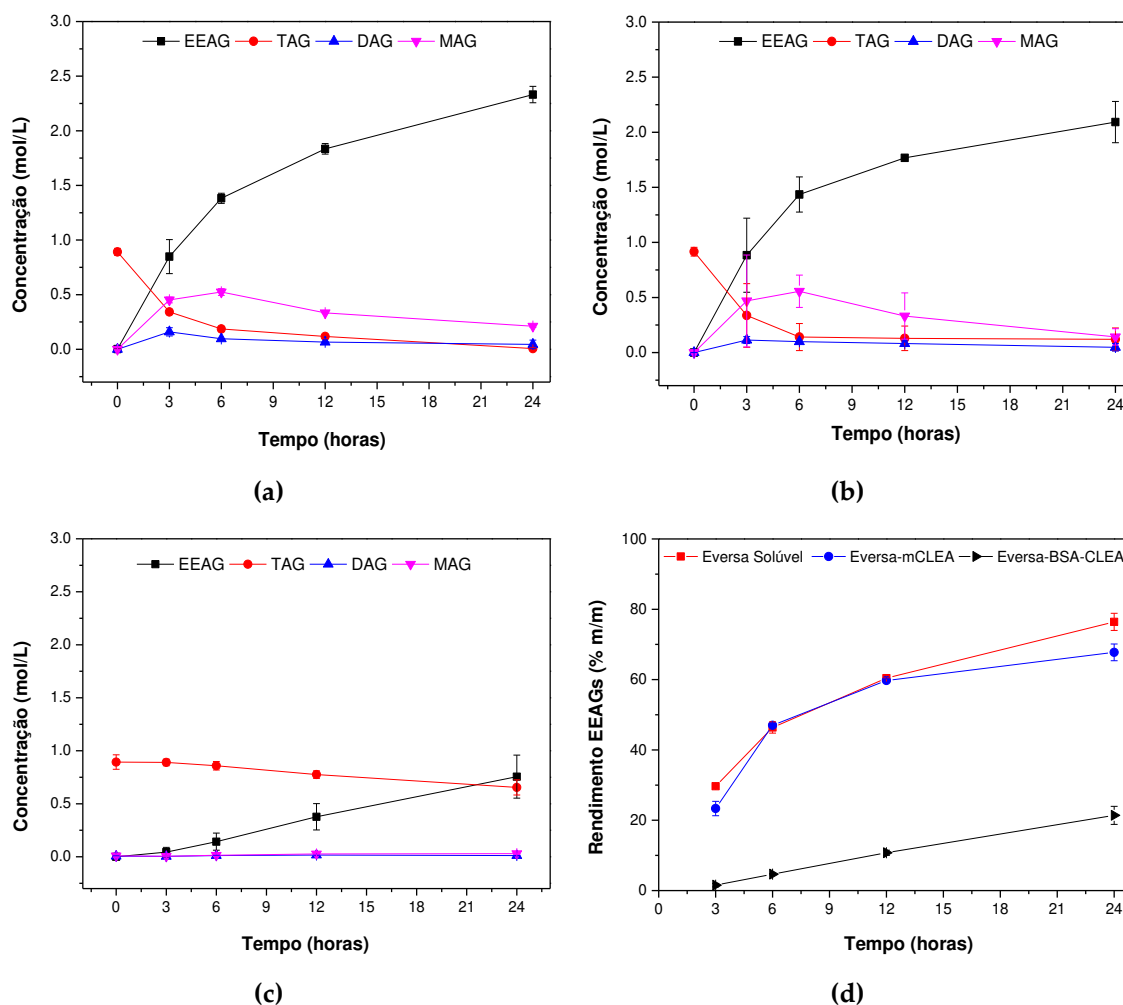
reação, principalmente EEAGs foram detectados, com desaparecimento total dos TAGs. No entanto, para Eversa-BSA-CLEA a reação foi mais lenta, com TAGs ainda correspondendo a mais de 70% de sua concentração inicial e concentração de EEAGs menor que 25% de seu valor máximo.

Os rendimentos de EEAGs (em base mássica) também foram quantificados por cromatografia gasosa (Figura 4.7d) ao longo do tempo. Após 24 h de reação, a enzima solúvel e o Eversa-mCLEA exibiram rendimentos mássicos de EEAGs de 76,4 e 67,8%, respectivamente, enquanto Eversa-BSA-CLEA teve o pior desempenho (rendimento de EEAGs de 21,4%, m/m). O melhor desempenho do Eversa-mCLEA em relação ao Eversa-BSA-CLEA pode ser devido à estrutura mais porosa do primeiro (Figura 4.3) e à presença de grupos hidrofóbicos na superfície das NPMSs, facilitando a circulação dos triglicerídeos hidrofóbicos ou ainda devido à presença de 50% de moléculas de Eversa ativadas interfacialmente (RODRIGUES et al., 2019) (Figura S1, Material Suplementar).

Com base nesses resultados, o Eversa-mCLEA foi selecionado para próximos estudos visando aumentar o rendimento de EEAGs, e tornar o biodiesel produzido um combustível (B100) que atenda as normas internacionais ASTM D6751 e EN 14214. Assim, foi avaliado a transesterificação do óleo de soja com etanol a 40 °C (temperatura em que Eversa-mCLEA exibe cerca de 80% de sua atividade máxima, Figura 4.4), e aumentando a carga enzimática (4, 7 e 12 $U_{est}/g_{óleo}$, equivalente a 3,8, 6,6, e 11,3% m/m_{óleo} de Eversa solúvel) para atingir o rendimento máximo de EEAGs em um menor tempo de reação.

Figura 4.7 - Perfis de concentração molar de ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAGs), triglicerídeos (TAGs), diglicerídeos (DAGs) e monoglicerídeos (MAGs) determinados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (HPLC-UV) (Seção 4.2.9) na transesterificação do óleo de soja com etanol catalisada por (a) Eversa solúvel, (Lb) Eversa-mCLEA e (c) Eversa-BSACLEA. (d)

Perfis de rendimento mássico de EEAGs (% m/m) determinados por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID) (Seção 4.2.10). Condições de reação: 15 g de óleo de soja, razão molar óleo/etanol 1:6, $3 U_{est}/g_{óleo}$, 5% (m/m_{óleo}) de água, 35 °C e 1500 rpm em reator de fluxo em vórtice. Os valores são expressos como a média de triplicados $\pm dp$.

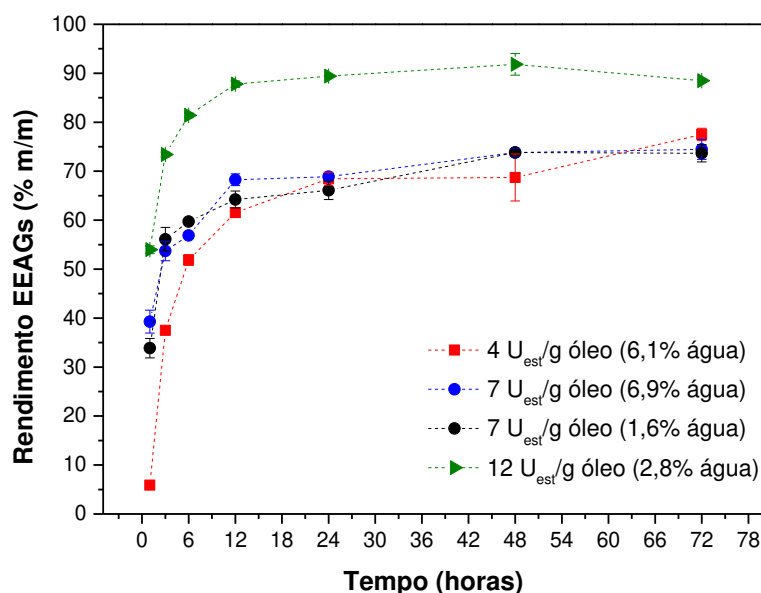


A Eversa solúvel apresentou um teor de água maior ($42,6 \pm 0,5\%$) do que o Eversa-mCLEA ($26,5 \pm 0,4\%$) devido a lavagem com terc-butanol e desidratação em geladeira na etapa de preparação do CLEAs (Seção 4.2.4.5). Assim, em alguns casos, as reações de transesterificação foram realizadas diretamente com os biocatalisadores, e em outros foi realizado um ajuste do teor de água na reação catalisada pelos CLEAs de Eversa (Tabela S1, Material Suplementar).

A Figura 4.8 mostra que, usando Eversa-mCLEA, quanto maior a carga da enzima, maior a taxa inicial de transesterificação. Usando $12 U_{est}/g_{óleo}$ de carga enzimática foi alcançado um rendimento mássico de EEAGs de $87,8 \pm 0,7\%$, após 12 h de reação. Após esse tempo,

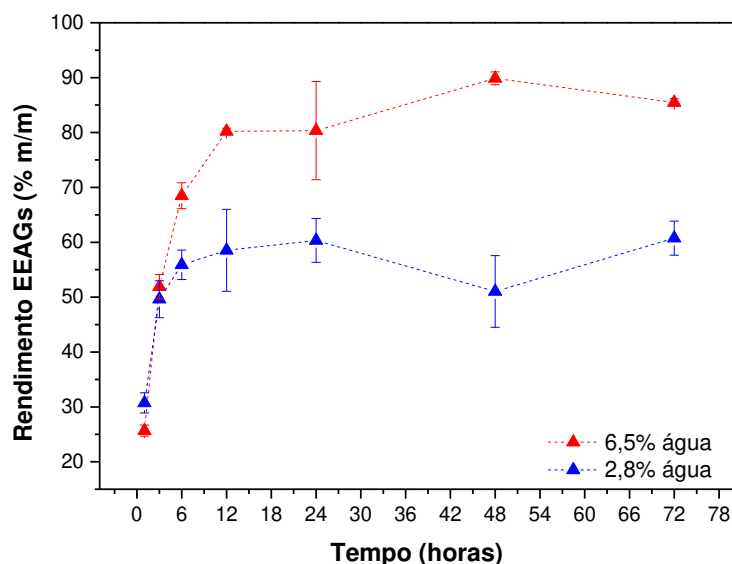
nenhum aumento significativo foi observado no rendimento de EEAGs (% m/m) ($89,4 \pm 0,1$ e $88,5 \pm 0,3\%$ após 24 e 72 h de reação, respectivamente), mas o conteúdo de AGLs (% m/m) aumentou de $1,19 \pm 0,06\%$ (12 h de reação) à $3,8 \pm 0,03\%$ (24 h de reação) e $4,06 \pm 0,31\%$ (72 h de reação). Como se trata de uma reação cineticamente controlada e o EEAG é um substrato da enzima (KASCHE, 1986), alguma hidrólise desses ésteres pode ser esperada se a termodinâmica do processo permitir. Usando Eversa-mCLEA, taxas iniciais semelhantes foram obtidas usando 1,6% ou 6,9% (m/m_{óleo}) de água, também atingindo rendimentos máximos de EEAGs semelhantes (em torno de 74-78% m/m) após 72 h de reação.

Figura 4.8 - Perfis de rendimento de EEAGs para a transesterificação do óleo de soja (15 g) com etanol (razão molar óleo/etanol de 1:6) catalisada por Eversa-mCLEA-CLEA a 40 °C e agitação de 1700-2000 rpm em um reator de fluxo em vórtice.



Por outro lado, a reação catalisada pela Eversa solúvel (Figura 4.9) foi muito influenciada pela concentração de água (rendimento de EEAGs em torno de 60 e 80% m/m para 2,8% e 6,5% de água, respectivamente), embora a taxa de transesterificação inicial não tenha sido afetada significativamente. O rendimento máximo de EEAGs foi cerca de 90% (m/m), alcançado após 48 h de reação na presença de 6,0% de água, com um teor de AGLs de $3,81 \pm 0,22\%$ (m/m).

Figura 4.9 - Perfil de rendimento de EEAGs para a transesterificação do óleo de soja (15 g) com etanol (razão molar óleo/etanol de 1:6) catalisada pela Eversa solúvel a 40 °C e 1700-2000 rpm em um reator de fluxo em vórtice usando uma carga enzimática de 7 $U_{est}/g_{óleo}$.



Em relação ao uso da Eversa solúvel, Remonatto et al., (2016) relataram um rendimento mássico de 96,7% após 16 h de reação à 35 °C na produção de ésteres metílicos usando óleo de soja, 2,5% m/m_{óleo} de água, 1,5 equivalente de metanol e 1% (m/m) de Eversa solúvel (primeira versão da formulação), enquanto Nielsen et al., (2016) relataram um rendimento de 85% (m/m) após 22 h de reação a 35 °C usando óleo de soja refinado, 0,2% (m/m) de Eversa solúvel, 3% (m/m_{óleo}) de água e 1,5 metanol equivalente.

Em relação ao uso da enzima imobilizada, Bresolin et al., (2019) imobilizaram a NS-40116 em espuma de poliuretano para ser usada na transesterificação da gordura de frango com metanol (razão molar gordura/metanol de 1:9, 2% (m/m) de água e usando uma carga de enzima de 5% (m/m_{óleo})) a 30 °C e por 24 h de reação, obtendo um rendimento de EMAG de 66% (m/m). Remonatto et al., (2018) imobilizaram a Eversa (segunda versão da formulação) em Sepabeads C-18 e aplicou o catalisador na transesterificação do óleo de girassol (razão molar óleo/etanol de 1:4, hexano como solvente e carga enzimática de 10%, m/m). Eles relataram um rendimento de EEAGs de 99% (m/m) após 3 h a 40° C e a reutilização do biocatalisador em quatro ciclos nessas condições, com uma retenção de 75% da sua atividade inicial.

Neste trabalho, a transesterificação do óleo de soja com etanol (razão molar óleo/etanol de 1:6) a 40 °C, 2,8% (m/m_{óleo}) de água e 12 $U_{est}/g_{óleo}$ (equivalente a 11,3% m/m_{óleo} de Eversa solúvel) durante 12 h deu um rendimento de EEAGs de 87,8% (m/m) (Figura 4.8). Apesar de algumas condições diferentes, este valor corrobora com aqueles relatados anteriormente.

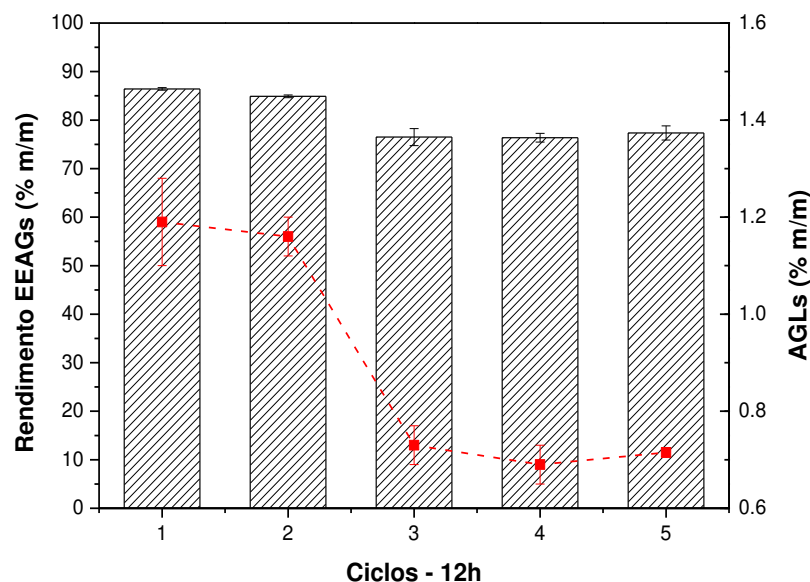
Surpreendentemente, Remonatto et al., (2018) relataram o maior rendimento de EEAGs na transesterificação de óleo de girassol com etanol após apenas 3 h de reação, mas nesse trabalho, hexano foi adicionado ao meio de reação. No entanto, deve-se ressaltar que a produção de biodiesel é realizada preferencialmente em meio sem cossolvente.

O biodiesel obtido neste trabalho, contendo 89,8% (m/m) de EEAGs, 0,27% (m/m) de MAGs, 0,18% (m/m) de DAGs, 0,01% (m/m) de TAGs e 3,8% (m/m) de AGLs, foi submetido a um polimento cáustico para eliminar o excesso de AGLs (Seção 4.2.7.2). Como uma quantidade muito baixa de NaOH foi usada, os efeitos indesejados da adição de NaOH a óleos ácidos foram significativamente reduzidos. Após a separação de fases e lavagem com água quente, um biodiesel contendo 98,92% (m/m) de EEAGs, 0,17% (m/m) de MAGs, 0,19% (m/m) de DAGs, 0,01% (m/m) de TAGs e 0,13% (m/m) de AGLs pode ser obtido, o que atende as características requeridas para o biodiesel em termos de padrões internacionais (seção Introdução).

4.3.4 Ensaio de reutilização do Eversa-mCLEA na produção de biodiesel

A Figura 4.10 mostra a reutilização do Eversa-mCLEA na transesterificação do óleo de soja. Os rendimentos de EEAGs alcançados na primeira e segunda batelada foram de 86,4 e 84,9% (m/m), respectivamente, diminuindo para 76,5% (m/m) na terceira batelada, que foi mantido até a quinta batelada (76,4 e 77,4% (m/m) para a quarta e quinta batelada, respectivamente). Um comportamento semelhante foi observado para o teor de AGLs, que diminuiu de 1,2% (m/m) (primeira batelada) para 0,7% (m/m) (quinta batelada). O uso do CLEA magnético apresentou uma fácil recuperação, já que puderam ser recuperados sem dificuldade com um ímã e após a lavagem com terc-butanol ficavam bem dispersos, permitindo sua reutilização. No entanto, parte da perda de atividade pode ser devida à liberação de alguns fragmentos não magnéticos dos CLEAs após possíveis quebras das partículas de CLEA na agitação ou manipulação do mesmo (GARCIA-GALAN et al., 2011).

Figura 4.10 - Ensaio de reutilização (ciclos de 12 h) do Eversa-mCLEA na transesterificação do óleo de soja (15 g) com etanol (razão molar óleo/etanol de 1:6), carga enzimática $12 U_{est}/g_{\text{óleo}}$ a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1700-2000 rpm em um reator de fluxo em vórtice. As barras representam os rendimentos de EEAGs e a curva pontilhada representa o conteúdo de AGLs.



4.4 Conclusão

Os CLEAs de Eversa Transform 2.0 foram relatados pela primeira vez neste trabalho, sendo que o biocatalisador mais ativo foi preparado por meio da coagregação da lipase tratada com PEI (o tratamento da enzima com PEI foi eficaz em aumentar a atividade expressa dos CLEAs), com nanopartículas magnéticas funcionalizadas com grupos aminos e octilas e na presença de amido como agente porogênico. Nessas condições, um biocatalisador foi sintetizado com 98,9% de rendimento de imobilização e 30,1% de atividade recuperada. O desempenho deste biocatalisador foi muito semelhante ao da enzima solúvel na transesterificação do óleo de soja com etanol, com rendimento mássico de 87,8% de EEAGs após 12 h de reação. A lipase imobilizada pôde ser reutilizada em cinco ciclos de 12 h na etanólise do óleo de soja, mantendo 89,6% do rendimento de EEAGs do primeiro ciclo. Um polimento cáustico do biodiesel produzido permitiu preparar um produto dentro das especificações para um biodiesel B100 quanto aos EEAGs, glicerídeos residuais (MAGs, DAGs e TAGs) e conteúdo de AGLs exigidos.

4.5 Material Suplementar

4.5.1 Perfil de adsorção da Eversa Transform 2.0 em nanopartículas magnéticas funcionalizadas com grupos octilas e aminos (NPMSs)

Foi preparada uma solução contendo PEI (seção 4.2.4.3) e enzima com uma proporção mássica de proteína/PEI de 1:1 em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0. Esta mistura foi incubada a 25 °C e agitada em agitador 3D (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) a 150 rpm. Após 60 min, para um volume final de 1 mL foi adicionado uma alíquota da mistura e NPMSs a uma razão mássica de NPMSs/enzima de 3:1 e tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0 foi adicionado para completar o volume final. Em seguida, foram adicionados 3 mL de tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0 em vez de etanol (agente de precipitação na preparação CLEA). Esta mistura foi incubada a 25 °C e agitada em agitador 3D (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) a 150 rpm. Uma solução controle foi preparada nas mesmas condições, exceto pela ausência de NPMSs. As atividades hidrolíticas (usando tributirina como substrato, seção 4.2.2) foram medidas no sobrenadante e na solução controle ao longo da reação. A atividade residual no sobrenadante foi calculada de acordo com a Eq. S1:

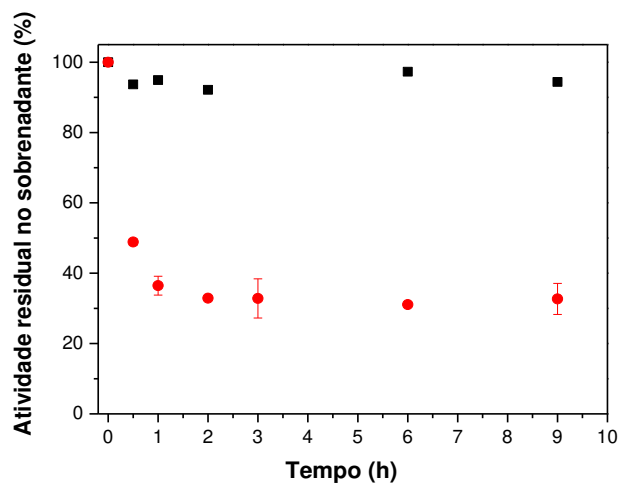
$$\text{Atividade residual no sobrenadante} = \frac{A_s}{A_{ci}} \times 100 \quad (\text{S1})$$

onde A_s é a atividade do sobrenadante e A_{ci} é a atividade inicial na solução controle

Para um ensaio de adsorção da enzima não tratada com PEI, 5 mg de proteína foram oferecidos a 1 g de NPMSs em 10 mL de tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0. Esta mistura foi incubada a 25 °C e agitada em agitador 3D (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) a 150 rpm. A solução controle foi preparada nas mesmas condições, exceto pela ausência de NPMSs. As atividades hidrolíticas (utilizando tributirina como substrato, seção 4.2.2) foram medidas no sobrenadante e na solução controle ao longo da reação. A atividade residual no sobrenadante foi calculada de acordo com a Eq. S1.

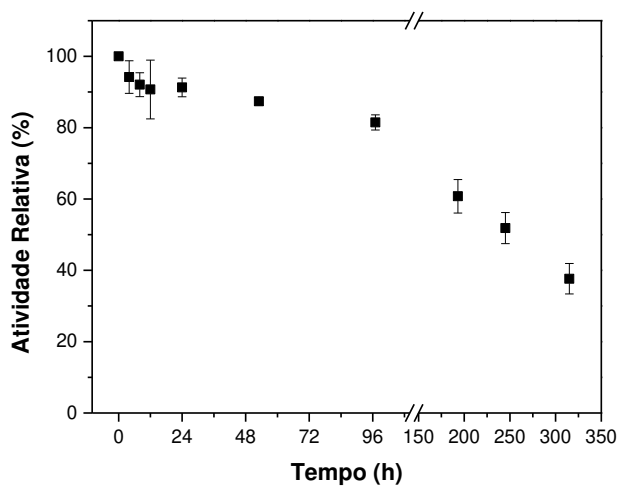
A enzima não tratada com PEI foi totalmente adsorvida nas NPMSs após 30 min de reação, enquanto a enzima tratada com PEI foi lentamente adsorvida (Figura S1), mas após 30 min de reação cerca de 50% da enzima foi adsorvida nas NPMSs, atingindo um platô de adsorção de cerca de 70%.

Figura S1 - Perfil de adsorção da Eversa Transform 2.0 tratada com polietilenoimina (seção 4.2.4.3) em nanopartículas magnéticas de sílica (NPMSs) funcionalizadas com grupos octilas e aminos a 25 °C sob agitação de 150 rpm (agitador de rolo 3D). As atividades hidrolíticas (usando tributirina como substrato, seção 4.2.2) foram medidas na solução controle (■) e no sobrenadante (●).



4.5.2 Perfil de inativação de Eversa Transform 2.0 solúvel

Figura S2 - Perfil de inativação da Eversa® Transform 2.0 livre a 60 °C e pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 100 mM), concentração enzimática de 5 mg de proteína/mL. A atividade da solução inicial da enzima foi considerada como 100%. As atividades hidrolíticas foram medidas com tributirina como substrato (seção 4.2.2).



4.5.3 Teor de água nas reações de transesterificação de óleo de soja com etanol usando a Eversa livre e CLEA magnético de Eversa (Eversa-mCLEA)

Tabela S1. Condições experimentais (carga enzimática e teor de água) para reações de transesterificação usando Eversa solúvel e imobilizada.

Catalisador	Eversa-mCLEA				Eversa solúvel	
Carga enzimática ($U_{est}/g_{\text{óleo}}$)	4,0	7,0	7,0	12,0	7,0	7,0
Água (% , m/m _{óleo})	6,1 ^a	6,9 ^a	1,6 ^b	2,8 ^b	2,8 ^b	6,5 ^a

^a Quantidade de água presente na reação (água do biocatalisador mais água adicionada à reação)

^b Reações sem adição de água. A água presente nessas reações vem do biocatalisador.

Condições de reação: 15 g de óleo de soja refinado, razão molar óleo/etanol de 1:6, 40 °C, 1700-2000 rpm em um reator de fluxo em vórtice. Atividade do biocatalisador (atividade de esterificação, U_{est}/g): Eversa solúvel = 106,36, Eversa-mCLEA = 106,17. Conteúdo de água determinado pelo método Karl Fischer (MARGRETH; SCHLINK; STEINBACH, 2010).

5. ETANÓLISE DO ÓLEO DE SOJA DEGOMADO UTILIZANDO CLEA MAGNÉTICO DE EVERSA® TRANSFORM

5.1 Introdução

O aumento na emissão de dióxido de carbono e a demanda global de energia intensifica o interesse pelo desenvolvimento de biocombustíveis. Com forte potencial de combustível alternativo ao óleo diesel, o biodiesel é de grande interesse por ser renovável, biodegradável, atóxico e reduzir as emissões de óxido de enxofre (SO_x), contribuindo para a proteção ambiental (CHUAH et al., 2017; TANG et al., 2018; ZHANG et al., 2019). Geralmente produzido a partir da reação de transesterificação, o biodiesel é resultado da reação entre óleos vegetais e gorduras animais com álcoois de cadeia curta, na presença de um catalisador (ATHAR; ZAIDI, 2020; LOTTI et al., 2018; MOAZENI; CHEN; ZHANG, 2019).

Na rota alcalina, KOH ou NaOH são empregados como catalisadores, e a presença de água e ácidos graxos livres (AGLs) pode levar a formação de sabão por meio da hidrólise dos triglicerídeos, uma reação indesejada, que reduz o rendimento do biodiesel e afeta a sua qualidade. Diante disso, matérias-primas não refinadas, com ácido graxo livre acima de 3% não são desejáveis para o processo (JAMIL et al., 2018; MEHER; VIDYASAGAR; NAIK, 2006). Entretanto, o uso de matérias-primas refinadas favorece ao aumento do custo do processo, uma vez que o custo com o óleo pode significar cerca de 60 a 80% do preço total da produção do biodiesel (ATHAR; ZAIDI, 2020; HAAS et al., 2006; MENG et al., 2009; NGUYEN et al., 2018).

Um dos gargalos da rota enzimática para a produção de biodiesel é a possibilidade do uso de matérias-primas com variados teores de AGLs, visto que as lipases são capazes de esterificar os AGLs contido nos óleos à éster, assim como transesterificar os acilglicerídeos no óleo, permitindo uma redução no custo inerente a essa rota (ARANSIOLA et al., 2014; LOTTI et al., 2018; MOAZENI; CHEN; ZHANG, 2019). Cesarini; Diaz; Nielsen, (2013) avaliaram a produção de biodiesel usando a lipase solúvel Callera Trans L e óleo de soja bruto, com concentração inicial de AGLs 7,8% (m/m), obtendo um rendimento de 96% (m/m) de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs). Remonatto et al., (2016) avaliaram a formulação líquida de Eversa Transform na reação com óleo de soja com diversos teores de AGLs (0,3-69%, m/m), permitindo obter rendimento em EMAG entre 75 e 97,30 % (m/m).

Na rota enzimática o catalisador, as lipases, podem ser utilizadas na sua forma livre ou imobilizada. Na forma livre esta apresenta a vantagem de possuir um menor custo, entretanto o catalisador imobilizado é recuperado com mais facilidade do meio reacional permitindo seu reuso, além das técnicas de imobilização favorecer ao aumento da estabilidade do biocatalisador (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; RODRIGUES et al., 2019; URRUTIA et al., 2018).

O desempenho do catalisador enzimático na produção do biodiesel é determinado pela interação de vários parâmetros do processo, como a área interfacial, a concentração da enzima e a concentração do álcool (ERDIWANSYAH et al., 2019; JAMIL et al., 2018; TANG et al., 2018; VARGAS et al., 2018). Estequiometricamente para a reação de transesterificação uma razão molar óleo/etanol de 1:3 são requeridos para a formação do biodiesel. Um aumento na quantidade do etanol desloca o equilíbrio para a conversão máxima do éster, sendo necessário um excesso de etanol porém, até certo ponto, pois um novo aumento acarretará elevação dos custos operacionais, sem melhoria no rendimento e até a inativação do catalisador (MEHER; VIDYASAGAR; NAIK, 2006; TOFTGAARD PEDERSEN et al., 2014).

O metanol é o álcool mais utilizado devido a fácil separação do produto, é mais reativo e proporciona elevados rendimentos do biodiesel, entretanto as lipases sofrem inativação quando adicionado integralmente ao processo, sendo este muitas vezes adicionados em etapas. Em substituição, o etanol, apesar de ter um custo maior e ser menos reativo, é sugerido devido ser um recurso renovável, melhorando o “perfil de sustentabilidade” do biodiesel, além de ser menos agressivo às enzimas (JAMIL et al., 2018; TOFTGAARD PEDERSEN et al., 2014).

Uma combinação entre lipases com diferentes especificidades permite ganhos no rendimento de biodiesel, já que AGLs não reagidos na transesterificação podem ser convertidos a partir da esterificação, permitindo assim um refino do produto (NIELSEN et al., 2016). Nordblad et al., (2014) combinam o uso das lipases líquida Callera Trans L (CalT), uma formulação da *Thermomyces lanuginosus* com a *Candida antarctica* A (chamada de NS88004), na reação com óleo de canola, 5% (m_{água}/m_{óleo}), 1,5 equivalente molar de metanol, à 35 °C. Ao final de 24 horas a adição de 0,1% (m/m_{óleo}) da NS88004 com 0,1% (m/m_{óleo}), de CalT ou 0,2% m/m_{óleo} de CalT permitiu um rendimento 94 e 90% (m/m) de éster metílico, respectivamente. Quando somente 0,2% (m/m_{óleo}) CalT foi utilizada o rendimento nas mesmas condições foi de 81,1% (m/m). Ramos et al., (2019) utilizaram uma mistura de CLEAs (50% de cada lipase, com base na atividade) de pâncreas suíno (PPL) e da lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL)) na reação com óleo de soja refinado, razão molar óleo/etanol 1:5, à 30°C. Enquanto usando CLEAs de PPL e TLL separadamente, os rendimentos de EEAG foram de 84,7 e 75,6% (m/m), respectivamente, sob as mesmas condições de reação, a mistura de CLEAs obteve 90,4% (m/m)

de rendimento. Uma outra opção que permite ganhos no rendimento do biodiesel é um polimento cáustico para neutralização do AGLs (MIRANDA et al., 2020; NIELSEN et al., 2016).

Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar a produção de biodiesel enzimático a partir de matéria prima não refinada, o óleo de soja degomado e etanol hidratado utilizando a lipase de Eversa[®] Transform imobilizada pela técnica de CLEA, denominado por Eversa-mCLEA (MIRANDA et al., 2020). As condições ótimas visando o máximo rendimento em biodiesel foi determinada a partir de um delineamento composto central rotacional (DCCR)²³, sendo as melhores condições previstas pelo modelo validadas. A partir dos resultados utilizando o óleo de soja refinado e etanol anidro, fez-se a substituição pelos substratos de menor custo. Foi avaliado a influência da concentração do etanol hidratado na reação e afim de aumentar o rendimento da reação de biodiesel, utilizou-se a lipase Lipozyme 435 na esterificação sequencial e simultânea à transesterificação e ainda um polimento cáustico para refino.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Materiais

Eversa[®] Transform 2.0 (uma formulação líquida de uma variante da lipase de *Thermomyces lanuginosus* expressa em *Aspergillus oryzae* produzida pela Novozymes A/S), Lipozyme 435 (lipase imobilizada de *Candida antarctica*, produzida por fermentação submersa de *Aspergillus niger* geneticamente modificado e adsorvida em uma resina macroporosa, Novozymes A/S), terc-butanol, tributirina 97% (m/m), PEI, massa molecular média ~ 25000, ácido butírico $\geq 99\%$ (m/m), 1-butanol anidro 99,8% (m/m), heptadecanoato de metila, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A solução de glutaraldeído (25%, v/v em H₂O) foi adquirida na Êxodo Científica (Sumaré, SP, Brasil). O amido solúvel foi adquirido da Qhemis (Jundiaí, SP, Brasil). Etanol anidro (99,8% P.A.) foi adquirido da Neon (São Paulo, SP, Brasil) e etanol hidratado (96 GL) foi adquirido em posto de gasolina local (São Carlos, SP, Brasil). Óleo de soja refinado (marca Liza) foi adquirido no comércio local e óleo de soja degomado foi fornecido da Cargill do Brasil (Três Lagoas, MS). As nanopartículas magnéticas de sílica (NPMSs) funcionalizadas com grupos aminos e octilas (NanoMag N (75%) - C8 (25%)) foram adquiridas da Kopp Technologies (São Carlos, SP, Brasil). De acordo com o

fornecedor, as nanopartículas são não porosas e têm tamanho de 30-120 nm e aproximadamente 20 m² de área superficial/g de suporte. Todos os outros produtos químicos e solventes foram de qualidade analítica e usados conforme recebidos.

5.2.2 Atividade enzimática

A atividade de esterificação foi medida em termos da síntese do butirato de butila seguindo a metodologia descrita por Paula et al., (2008). Cinquenta miligramas de CLEA seco foram adicionados ao meio de reação contendo 7,5 mL de heptano contendo 0,1 M de butanol e 0,1 M de ácido butírico e 0,1 g de peneira molecular de 3 Å (bastonete, tamanho 1/16 pol, Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A reação foi realizada em frascos de vidro fechados de 100 mL a 37 °C sob agitação de 250 rpm em agitador orbital (Modelo MA832, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Após 60 min de reação, 5 mL de etanol foram adicionados para interromper a reação, e a concentração de ácido foi medida por titulação em um titulador Tritrino 907 (Metrohm, Herisau, Suíça) usando uma solução de KOH 20 mM. Uma unidade de esterificação (U_{est}) foi definida como a taxa inicial de produção de butirato de butila (em $\mu\text{mol}/\text{min}$) nas condições experimentais.

5.2.3 Preparo do CLEA magnético de Eversa

Os CLEAs magnéticos, Eversa-mCLEA, foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Miranda et al., (2020). Uma solução aquosa de 75 mg/mL de PEI foi preparada e o pH ajustado para 7,0. Um volume desta solução foi adicionado à solução de enzima (em tampão fosfato sódio 5 mM a pH 7,0) para uma razão mássica de 1:1 (mg de proteína/mg de PEI). A solução foi incubada a 25 °C e agitada em agitador 3D (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) a 150 rpm. Após 60 min, NPMSs foram adicionadas a uma razão mássica de 1:3 (enzima/NPMSs) a uma concentração final de 5 mg/mL de enzima. O amido foi adicionado à solução de enzima e NPMSs preparado em tampão fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0, a uma concentração final de 3,2% (m/v). Em seguida, etanol anidro foi adicionado a uma razão volumétrica de 1:3 (solução enzimática/etanol) em um banho de gelo. A suspensão resultante foi agitada a 150 rpm, 4 °C em um agitador orbital (Modelo MA830, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Após 30 min, 500 mM de glutaraldeído foram adicionados à solução com a enzima precipitada e a solução resultante foi mantida a 4 °C, em agitação de 150 rpm

durante 2,5h. Em seguida, o CLEA foi recuperado aplicando um campo magnético externo (usando um ímã de neodímio, 50 × 20 × 20 mm) e lavado duas vezes com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0 (usando o mesmo volume de etanol adicionado na etapa de precipitação) à temperatura ambiente. Após as lavagens e ressuspensão (usando o mesmo volume da solução inicial) em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0, 50 µL de α -amilase (BAN 480L) e 50 µL de amiloglicosidase (AMG 300L), ambas da Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca), foram adicionados, e a suspensão incubada a 25 °C por 4 h para hidrolisar o amido em dextrinas, maltose e glicose, que podem ser facilmente removidos na lavagem dos CLEAs. Em seguida, os CLEAs foram recuperados por separação magnética, lavados duas vezes (usando o mesmo volume da solução inicial) com tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0. Em seguida os CLEAs de Eversa foram lavados duas vezes com terc-butanol, vertidos em placas de petri e mantidos durante a noite em geladeira para desidratação. Após secarem, os CLEAs foram armazenados em tubos Falcon em geladeira para uso posterior.

5.2.4 Planejamento experimental

Os parâmetros da reação de transesterificação foram otimizados usando um delineamento composto central rotacional (DCCR)²³ com três pontos centrais e seis pontos axiais para estudar os efeitos da temperatura (31,6–48,4 °C), razão molar óleo/etanol anidro (1:0,96–1:11,04) e carga enzimática (1,32-4,68 U_{est}/g_{óleo}) no rendimento da reação, conforme mostrado na Tabela 5.1. Para isso, as transesterificações foram realizadas utilizando 2g de óleo de soja refinado e 5% de água (m/m_{óleo}) por 12 h em frascos de vidro de 100 mL com tampa de rosca e submetidos à agitação a 250 rpm em shaker orbital. As amostras no final da reação foram retiradas para quantificar o rendimento de EEAGs por cromatografia gasosa (Seção 5.2.11).

Tabela 5.1 - Níveis de fatores independentes para projeto composto central

Variáveis		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Razão molar óleo/etanol	X ₁	1:0,96	1:3	1:6	1:9	1:11,04
Carga enzimática	X ₂	1,32	2	3	4	4,68
Temperatura	X ₃	31,6	35	40	45	48,4

O delineamento experimental e a análise dos resultados foram realizados no software Statistica (StatSoft, versão 7.0), sendo gerado um modelo matemático para prever o efeito dos fatores selecionados no rendimento de EEAGs (CALERO et al., 2019), Equação 5.1:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (5.1)$$

onde y é a variável de resposta prevista; β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} são os coeficientes de intercepto, linear, quadrático e constante de interação do modelo, respectivamente; X_i , X_j ($i = 1, 3$; $j = 1, 3$; $i \neq j$) representam as variáveis independentes codificadas (condições de reação).

5.2.5 Transesterificação do óleo de soja degomado com etanol hidratado usando Eversa-mCLEA

O meio reacional foi composto por óleo de soja degomado, razão molar óleo/etanol hidratado (1:6–1:15), 4 $U_{est}/g_{\text{óleo}}$ de Eversa-mCLEA. A reação ocorreu em um reator de fluxo em vórtice (RFV) (RAMOS et al., 2018) e foi operado a 40 °C por 24 horas, a rotação do cilindro interno foi de 1700–2000 rpm. Amostras foram retiradas para analisar EEAGs por cromatografia gasosa (Seção 5.2.11).

5.2.6 Reuso da fase apolar na esterificação com a Lipozyme 435

A partir da reação de transesterificação (Seção 5.2.5), a fase apolar foi recuperada por centrifugação ($10.400 \times g$ por 10 min a 4 °C). Uma alíquota foi retirada para quantificação de EEAGs (seção 5.2.11) e AGLs (seção (5.2.9), e o restante usado para reação de esterificação. Foi empregado 0,5% (m/m) da Lipozyme 435, razão molar óleo/etanol hidratado 1:6; à 40°C, por 24 horas em RFV, 1700-2000 rpm. Ao final da reação, o meio foi centrifugado ($10400 \times g$ por 10 min a 4 °C) e preparado para análise de EEAGs (seção 5.2.11) e AGLs (seção 5.2.9).

5.2.7 Transesterificação e esterificação simultâneas usando Eversa m-CLEA e Lipozyme 435

O meio reacional foi composto por de óleo de soja degomado, razão molar óleo/etanol hidratado 1:6, 4 $U_{est}/g_{\text{óleo}}$ de Eversa-mCLEA e 0,5% (m/m_{óleo}) Lipozyme 435. A reação ocorreu

a 40°C por 24 horas no RFV a 1700–2000 rpm. Ao final da reação, o meio foi centrifugado (10.400 × g por 10 min a 4 °C) e preparado para análise de EEAGs (seção 5.2.11) e AGLs (seção 5.2.9).

5.2.8 Polimento cáustico do biodiesel

O polimento cáustico do biodiesel foi realizado de acordo com Miranda et al., (2020) após a reação de transesterificação (seção 5.2.5) catalisada pelo Eversa-mCLEA, (seção 4.2.7.2).

5.2.9 Determinação dos ácidos graxos livres

Os AGLs foram determinados de acordo com o Método Oficial AOCS Ca 5a-40, mas modificado por Rukunudin et al., (1998). Uma amostra foi misturada com etanol e titulada em um titulador Titrino 907 (Metrohm, Herisau, Suíça) usando uma solução de KOH. A concentração de AGLs foi calculada como porcentagem de ácido oleico, de acordo com a Equação 5.2:

$$\begin{aligned} & \text{AGLs (\%ácido oleico)} \\ & = \frac{\text{volume KOH gasto (mL)} \times \text{Concentração da Base (mol/L)} \times 28,2}{\text{massa da amostra (g)}} \end{aligned} \quad (5.2)$$

5.2.10 Índice de saponificação

O índice de saponificação foi determinado segundo a norma AOCS Cd 3-25, (1990). Pesou-se a amostra em um balão de vidro e anotou-se o peso. Na sequência, adicionou-se 25 mL de solução alcoólica de KOH 40% (40 g de KOH, 20 mL de água e 980 mL de etanol). Conectou-se o balão a um condensador e ferveu-se a solução por 75 min em uma manta de aquecimento até que a amostra fosse completamente saponificada. Depois que o frasco esfriou, desconectou-se o condensador e adicionou-se 1 mL da solução indicadora de fenolftaleína. Titulou-se o conteúdo do balão com a solução de ácido clorídrico (HCl) 0,5 M até que a coloração rosa desaparecesse. Calculou-se o índice de saponificação segundo a Equação 5.3:

$$\text{Índice de Saponificação} = \frac{(V_{\text{Branco}} - V_{\text{HCl}}) \times M_{\text{HCl}} \times 56,11}{m_{\text{amostra}}} \quad (5.3)$$

onde, V_{HCl} é o volume de solução de HCl em mL gasto na titulação da amostra; V_{Branco} é o volume de solução de HCl em mL gasto na titulação do branco (composto por todos os reagentes exceto o óleo); M_{HCl} é a molaridade da solução de HCl e m_{amostra} é a massa de amostra em g.

5.2.11 Análises de cromatografia gasosa das reações de produção de biodiesel

As análises de EEAGs foram realizadas em um cromatógrafo Agilent 7890A (Santa Clara, CA, EUA) equipado com detector de ionização de chama de acordo com os métodos ASTM D6751 e EN14103 (DUVEKOT, 2011), com modificações. O injetor e o detector foram ajustados para 250 °C. A separação dos EEAGs foi realizada em coluna capilar Rtx-Wax (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Restek Corporation, Bellefonte, PA, EUA) utilizando uma temperatura de 210 °C e hélio como gás de arraste. O heptadecanoato de metila foi utilizado como padrão interno. Para análise, 1 mL da amostra da mistura reacional foi centrifugada a 10.000 × g por 10 min a 4 °C. A fase leve foi recuperada, lavada com água destilada quente (utilizando o mesmo volume da amostra) e centrifugada (a lavagem repetiu-se por 3 vezes), e seca durante a noite em estufa a 60 °C. As amostras de EEAGs secas (50 mg) foram diluídas em 1 mL de solução de heptadecanoato de metila (10 mg/mL, em heptano) e 1 μL foram injetados no equipamento. O rendimento de EEAGs (% m/m) foi calculado de acordo com a Equação 5.4:

$$\text{Rendimento EEAGs (\%, m/m)} = \frac{(\sum A) - A_{\text{PI}}}{A_{\text{PI}}} \times \frac{C_{\text{PI}} \times V_{\text{PI}}}{m} \times 100, \quad (5.4)$$

onde $\sum A$ é a soma das áreas dos picos de ésteres etílicos de ácidos graxos C14:0 a C24:0, A_{PI} é a área do pico do padrão interno (C17), C_{PI} é a concentração do padrão interno (10 mg/mL), V_{PI} é o volume da solução de padrão interno (1 mL) e m é a massa da amostra (50 mg).

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Determinação das condições ótimas de produção de biodiesel por planejamento experimental usando óleo de soja refinado e etanol anidro.

No delineamento experimental (DCCR)²³ algumas das variáveis mais relevantes que influenciam a reação de transesterificação do óleo de soja usando o biocatalisador Eversa-mCLEA foram analisadas. A faixa de valores para cada variável foi definida a partir de trabalhos da literatura (ANDRADE; ERRICO; CHRISTENSEN, 2017b; MIBIELLI et al., 2019; NIELSEN et al., 2016; REMONATTO et al., 2016; WANCURA et al., 2019a) usando a Eversa livre para produção do biodiesel. Na Tabela 5.2 estão descritos os níveis codificados e reais, assim como os resultados experimentais. Os resultados mostraram que o rendimento máximo de EEAGs foi de cerca de 66% m/m após 12 h de reação, ensaio 10.

Tabela 5.2 - Planejamento experimental da reação de transesterificação usando o biocatalisador.

Ensaio	Fatores (Níveis Codificados e Reais)			Variável resposta
	Razão molar óleo/etanol (X ₁)	Carga enzimática U _{est} /g _{óleo} (X ₂)	Temperatura, °C (X ₃)	Rendimento de EEAGs (% m/m)
1	-1 (1:3)	-1 (2)	-1 (35)	6,14
2	+1 (1:9)	-1 (2)	-1 (35)	26,19
3	-1 (1:3)	+1 (4)	-1 (35)	5,40
4	+1 (1:9)	+1 (4)	-1 (35)	53,32
5	-1 (1:3)	-1 (2)	+1 (45)	2,30
6	+1 (1:9)	-1 (2)	+1 (45)	22,75
7	-1 (1:3)	+1 (4)	+1 (45)	1,44
8	+1 (1:9)	+1 (4)	+1 (45)	50,49
9	-1,68 (1:0,96)	0 (3)	0 (40)	6,59
10	+1,68 (1:11,04)	0 (3)	0 (40)	66,47
11	0 (1:6)	-1,68 (1,32)	0 (40)	8,66
12	0 (1:6)	+1,68 (4,68)	0 (40)	54,87
13	0 (1:6)	0 (3)	-1,68 (31,6)	42,05
14	0 (1:6)	0 (3)	+1,68 (48,4)	39,81
15	0 (1:6)	0 (3)	0 (40)	54,27
16	0 (1:6)	0 (3)	0 (40)	53,30
17	0 (1:6)	0 (3)	0 (40)	57,87

Os parâmetros de reação foram otimizados usando um delineamento composto central rotacional (DCCR)²³ com três pontos centrais e seis pontos axiais. Condições experimentais: 2g de óleo de soja refinado, 5% de água (m/m_{óleo}), reação de 12 h agitada a 250 rpm.

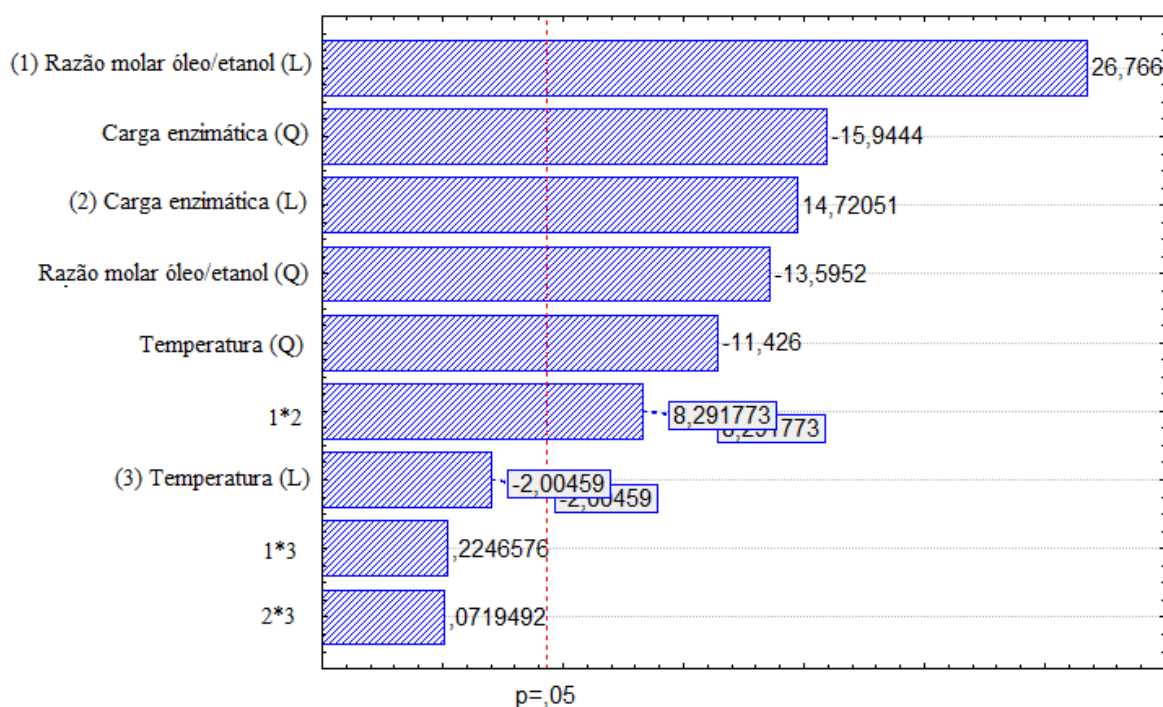
Analisando os resultados da Tabela 5.3, é possível verificar quais efeitos foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e a qualidade do ajuste do modelo aos rendimentos dos EEAGs ao nível de confiança de 95%. Percebe-se que a falta de ajuste não foi estatisticamente significativa. O coeficiente de determinação ($R^2 = 0,90264$) indica que o modelo proposto consegue explicar cerca de 90% das variabilidades experimentais, uma representação satisfatória do modelo para a etanólise de óleo de soja.

Como pode ser observado, somente os parâmetros linear e quadrático das variáveis razão molar óleo/etanol e carga enzimática, o parâmetro quadrático da variável temperatura e a interação linear entre razão molar óleo/etanol e carga enzimática foram significativos (p -valor $< 0,05$), como confirmado pelo Diagrama de Pareto (Figura 5.1)

Tabela 5.3 - Análise de variância (ANOVA) para o DCCR²³ para avaliar o rendimento de ésteres etílicos de ácidos graxos por transesterificação de óleo de soja usando Eversa-mCLEA

Fatores	Soma de quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p-valor
<i>Regressão</i>	9111,081	6	1518,513	261,9195	
(1) Razão molar óleo/etanol (L)	4153,789	1	4153,789	716,4629	0,001393
Razão molar óleo/etanol (Q)	1071,577	1	1071,577	184,8300	0,005367
(2) Carga enzimática (L)	1256,310	1	1256,310	216,6936	0,004583
Carga enzimática (Q)	1473,901	1	1473,901	254,2246	0,003910
Temperatura(Q)	756,897	1	756,897	130,5527	0,007573
1L * 2L	398,608	1	398,608	68,7535	0,014235
<i>Resíduo</i>	855,479	10	85,5479	14,75566	
Falta de Ajuste	843,884	8	105,485	18,1946	0,053124
Puro Erro	11,595	2	5,798		
Total Soma dos Quadrados	9966,559	16			

Figura 5.1 - Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento. Os resultados foram analisados pelo software Statistic e apresentados em gráfico de Pareto (95% de confiança da análise de variância (ANOVA)).



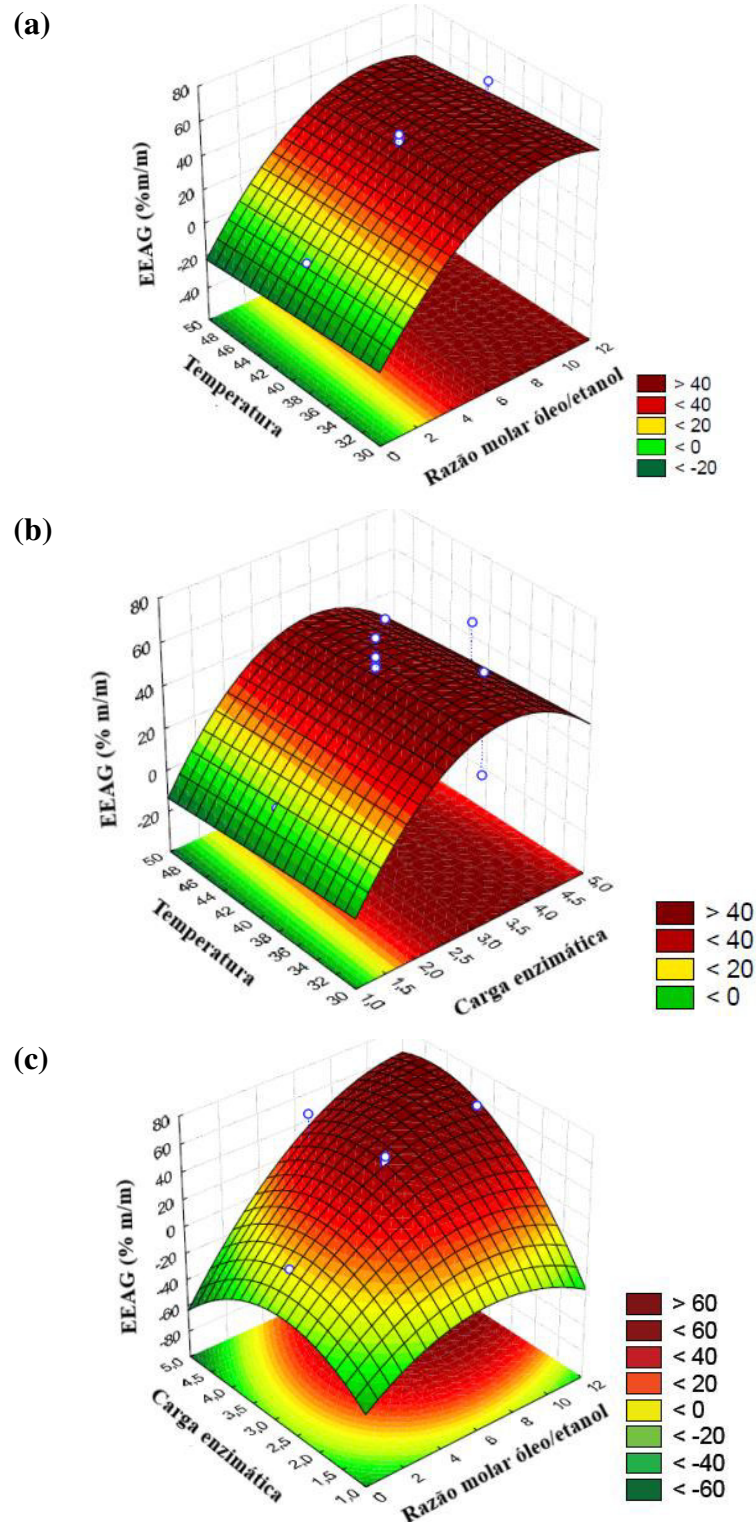
Portanto, o modelo matemático (Equação 5.1) com as variáveis significativas codificadas pode ser usado para representar os rendimentos de EEAGs para as condições estudadas (Equação 5.4):

$$\begin{aligned}
 \text{Rendimento EEAGs (\%, m/m)} &= 56,0663 + 17,4400X_1 - 9,7495X_1^2 + 9,5912X_2 - 11,4342X_2^2 \\
 &- 8,1939X_3^2 + 7,0588X_{12}
 \end{aligned} \quad (5.4)$$

A partir do modelo matemático foi possível construir as superfícies respostas para todas as variáveis investigadas, como mostra a Figura 5.2.

A Figura 5.2(a) mostra a superfície resposta para as variáveis temperatura e razão molar óleo/etanol e a Figura 5.2(b) mostra a superfície resposta para as variáveis temperatura e carga enzimática. Em ambas as figuras é possível confirmar que a temperatura não tem uma influência significativa no rendimento de EEAGs. A Figura 5.2(c) mostra a superfície resposta para as variáveis carga enzimática e razão molar óleo/etanol. Para essas variáveis um aumento nas suas concentrações favorece ao aumento do rendimento apresentando-se diretamente proporcionais para o rendimento do produto. Com essa análise foi possível identificar uma região de ótimo para o rendimento.

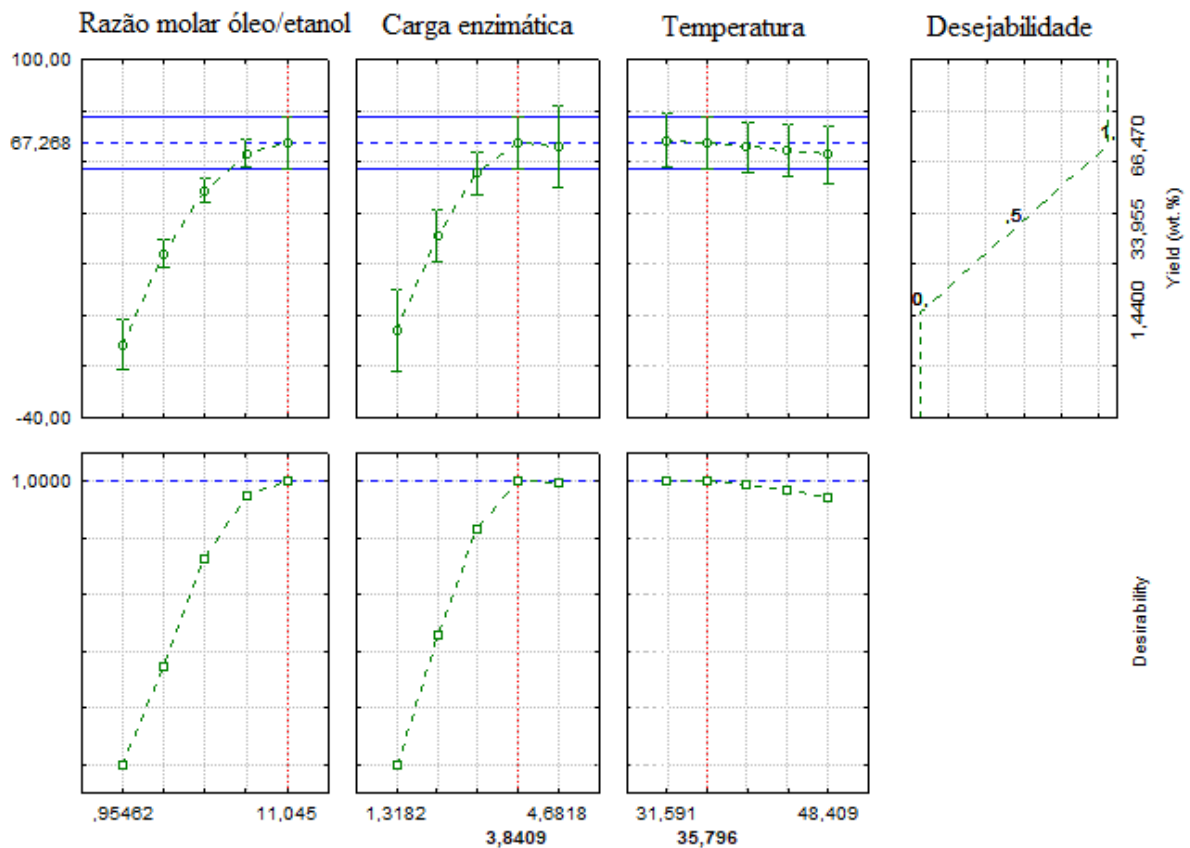
Figura 5.2 – Superfícies de resposta para os efeitos das variáveis independentes no rendimento de EEAG. (A) Temperatura e razão molar óleo/etanol, (B) temperatura e carga enzimática, e (C) carga enzimática e razão molar óleo/etanol.



A partir da Figura 5.3 é possível seleccionar a faixa de valores otimizados dos três parâmetros experimentais para o rendimento máximo em EEAGs dado pelo modelo. As linhas

verticais em vermelho correspondem aos valores ótimos para cada variável: razão molar óleo/etanol de 1:11,05, carga enzimática de 3,84 $U_{est}/g_{óleo}$ e temperatura de 35,8 °C. Nas melhores condições previstas pelo modelo, o rendimento máximo de EEAGs foi de 67,27% (m/m).

Figura 5.3 - Perfil dos valores previstos/otimizizados e da função de desejabilidade para o planejamento



5.3.2 Avaliação do óleo de soja degomado e etanol hidratado na reação de transesterificação

Sendo um dos gargalos na produção do biodiesel a redução do custo das matérias-primas, avaliou-se neste trabalho a produção de biodiesel por rota enzimática nas condições próximas às ótimas previstas pelo modelo (Seção 5.3.1) utilizando etanol hidratado em substituição ao anidro, e óleo de soja degomado, combinando com etanol anidro ou hidratado. A Tabela 5.4 mostra o resultado da conversão em EEAGs a partir da reação de transesterificação usando 2 g de óleo, 4 $U_{est}/g_{óleo}$ de carga enzimática empregando o Eversa-mCLEA, a 40 °C, visto que o catalisador apresenta um ótimo desempenho em termos de atividade e estabilidade térmica nessa temperatura (MIRANDA et al., 2020). Neste mesmo trabalho, foi observado que

não é necessário a adição de água para a reação com o catalisador imobilizado, Eversa-mCLEA, por isso o ensaio foi realizado na ausência de água.

O rendimento em EEAGs utilizando o óleo de soja refinado e etanol anidro foi de 64,37% (m/m), resultado bem próximo ao predito pelo modelo a partir da Equação 5.4 (67,86 %, m/m), validando assim o modelo. A substituição do etanol anidro pelo hidratado mostrou-se satisfatória, visto que o rendimento em EEAG foi muito similar ao usar o mesmo tipo de óleo. Ao utilizar-se o óleo degomado há um aumento de cerca de 13% no rendimento mássico em EEAGs (~73%), independentemente do álcool utilizado. Ao fazer um comparativo de custo no Brasil das matérias-primas, o preço médio dos últimos 5 anos do etanol anidro foi de R\$ 1,79/L e do etanol hidratado R\$ 1,61/L (valores sem frete, sem ICMS e sem PIS/Cofins) (CEPEA, 2020). Em relação ao óleo, em agosto de 2019, o óleo de soja refinado tinha um custo médio de R\$ 3030,00/ton e o degomado \$ 2.784,38/ton (IFAG, 2020). Assim, a substituição do óleo de soja refinado pelo degomado e uso do etanol hidratado é de relevante importância para contribuir com a viabilidade econômica da rota enzimática de produção de biodiesel, permitindo a redução de custos do processo global.

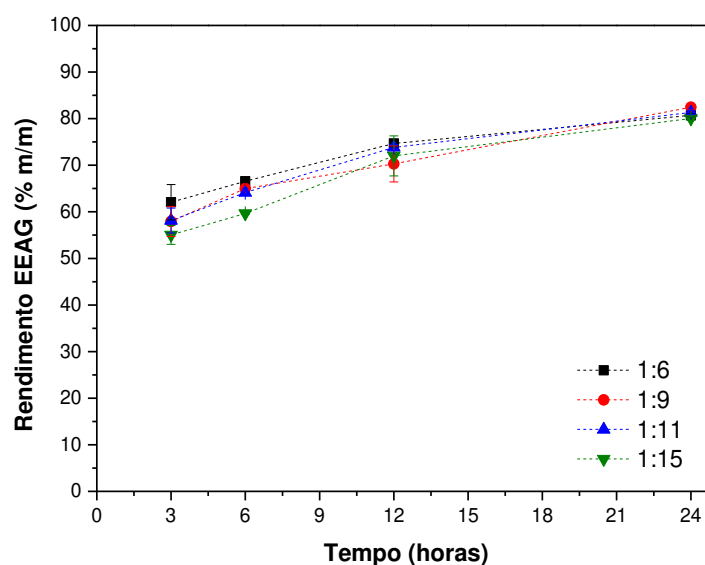
Tabela 5.4 - Ensaio de validação do modelo matemático usando Eversa-mCLEA na transesterificação do óleo de soja (2 g) com etanol (razão molar óleo/etanol de 1:11), carga enzimática $4 U_{est}/g_{\text{óleo}}$ a 40 °C e 250 rpm em um shaker orbital.

Óleo de Soja	Rendimento de EEAGs (% m/m)	
	Etanol Anidro	Etanol Hidratado
Refinado	64,37 ± 0,17	65,54 ± 0,57
Degomado	72,75 ± 0,30	73,33 ± 0,70

O óleo de soja degomado e etanol hidratado foram avaliados na reação de transesterificação em reator de fluxo em vórtice, aumentado a quantidade de óleo para 15g e mantendo a carga enzimática em $4 U_{est}/g_{\text{óleo}}$ e temperatura de reação a 40°C. A razão molar óleo/etanol foi avaliada em 4 concentrações diferentes: 1:6; 1:9; 1:11 e 1:15. Essa avaliação foi feita a fim de investigar a influência do etanol hidratado. As menores razões molares óleo:etanol, além de minimizar o custo, atendem a estequiometria da reação em excesso, normalmente empregadas nas reações de transesterificação. Entretanto, uma maior quantidade de etanol pode levar um aumento na conversão do produto, mas também pode ser prejudicial ao catalisador, levando a perda da sua atividade (ATHAR; ZAIDI, 2020; TOFTGAARD PEDERSEN et al., 2014).

Ao analisar a Figura 5.4 pode-se observar que nenhuma diferença significativa no rendimento de EEAGs foi obtida para as condições testadas. Nas 12 primeiras horas obteve-se em torno de 70-75% (m/m) de EEAGs, valor que era esperado ao se usar a razão molar óleo/etanol 1:11, e ao final das 24 horas houve um ganho no rendimento, atingindo 80-83% (m/m), também para todas as condições. A similaridade entre os resultados obtidos pode estar relacionada ao uso do reator de fluxo em vórtice (RFV) em relação ao Shaker. Uma maior velocidade de agitação aumenta o rendimento do biodiesel devido a mistura mais uniforme de óleo e álcool (PEITER et al., 2020). Nos ensaios do planejamento experimental, realizados em Shaker, um teor maior de álcool proporcionava um meio reacional mais homogêneo em relação aos meios com menor concentração, e com isso melhores resultados em termos de rendimento foram obtidos (Tabela 5.2). Já no reator, a diferença entre as concentrações de etanol não era perceptível, visto que a agitação do meio é mais alta e mais eficiente, garantindo a homogeneidade indiferente da concentração. A partir desses resultados a razão molar óleo/etanol 1:6 foi definida para utilizar nas reações. Proporções maiores não acarretam ganhos no rendimento e apenas aumentariam o custo do mesmo. (RANCKE-MADSEN, 2016). Watanabe et al., (2002) empregaram 4% m/m da lipase imobilizada de *Candida antarctica* na metanólise do óleo de soja degomado, onde o metanol foi adicionado em 3 etapas de 1/3 eq. molar por vez, à 30 °C em shaker. Após 48 horas de reação foi obtida um rendimento de 93,8% (m/m) em EMAGs e menos que 0,3% m/m de AGLs.

Figura 5.4 - Avaliação da razão molar óleo/etanol hidratado no perfil de rendimento de EEAGs para a transesterificação do óleo de soja degomado (15 g) catalisado por Eversa-mCLEA, $4 U_{est}/g_{\text{óleo}}$ a 40 °C e agitação de 1700-2000 rpm em um reator de fluxo em vórtice.



5.3.3 Estratégias para polimento das reações de transesterificação

O rendimento em EEAGs obtido ao final das 24 horas de reação ainda não atendem os padrões internacionais para que este produto possa ser classificado como biodiesel, rendimento mínimo em EEAGs de 96,5% (m/m) e máximo de 0,25% (m/m) de AGLs (MCCURRY; WANG, 2007). Diante disso, foram adotadas estratégias visando a redução da quantidade de AGLs e promover um ganho de rendimento em biodiesel.

A primeira estratégia foi uma esterificação empregando a Lipozyme 435 após a transesterificação com Eversa m-CLEA. A fase apolar proveniente da transesterificação continha $86,59 \pm 0,8\%$ (m/m) de EEAGs e $4,0 \pm 0,01\%$ (m/m) de AGLs e após 24 horas de reação com Lipozyme 435 obteve-se um rendimento em EEAGs de $85,68 \pm 0,5\%$ (m/m) e $3,6 \pm 0,09\%$ (m/m) de AGLs. A segunda estratégia consistiu no uso simultâneo do Eversa-mCLEA e da Lipozyme 435 no meio reacional. Ao final das 24 horas de reação obteve-se um rendimento de EEAGs de $85,72 \pm 0,18\%$ (m/m) e $3,50 \pm 0,19\%$ (m/m) de AGLs. Com os resultados obtidos pode-se observar que o emprego da Lipozyme 435 na reação não promoveu os resultados esperados. Uma última estratégia foi um polimento cáustico após uma reação de transesterificação. Depois de obter uma fase apolar contendo 81,45% (m/m) de EEAGs e 3,9% (m/m) de AGLs, esta foi submetida ao tratamento com NaOH, conforme Miranda et al., (2020). Ao final, a amostra lavada e seca continha 89,88% (m/m) de EEAGs e 0,17% (m/m) de AGLs. Com este tratamento pode-se obter um rendimento mássico de EEAGs mais próximo ao valor exigido pelas normas internacionais, já com um rendimento em AGLs dentro da norma.

Uma análise do índice de saponificação (IS) do óleo de soja degomado foi realizada a fim de investigar o quanto em rendimento de éster pode ser obtido a partir da matéria-prima utilizada, visto que as estratégias adotadas não conseguiram atingir o rendimento em pelo menos 96,5% (m/m) de EEAGs. Foi encontrado um IS de $180,20 \pm 0,07$ mgKOH/g que nos fornece $90,55 \pm 0,04\%$ (m/m) em ácido oleico. De acordo com a literatura, o óleo de soja bruto ou o degomado apresentam índice de saponificação em torno de 198 mgKOH/g (ABITOGUN et al., 2009), entretanto o IS do óleo degomado utilizado neste trabalho apresenta-se abaixo deste valor. Diante disso, pode-se considerar que houve alguma deterioração no óleo durante o longo tempo de estocagem no laboratório. Assim, pode-se inferir que o rendimento máximo em EEAGs que se poderia obter com essa matéria-prima seria de cerca de 90% (m/m), resultado que corrobora ao encontrado após o polimento alcalino, e também com o uso das duas estratégias com a Lipozyme 435. Uma vez que foi obtido cerca de 86% (m/m) em EEAGs e 3,5-3,64% (m/m) em AGLs com ação simultânea ou sequencial de Eversa-mCLEA e Lipozyme

435, a presença de AGLs além da quantidade permitida pelas normas de biodiesel, deveu-se, provavelmente, ao acúmulo de água no meio reacional e/ou um tempo reacional curto/baixa concentração de Lipozyme 435.

5.4 Conclusão

Diante do que foi exposto neste capítulo, conclui-se que a transesterificação do óleo de soja degomado e etanol hidratado utilizando Eversa m-CLEA, permitiu obter um bom rendimento em éster etílico de ácido graxo, e após o seu polimento cáustico foi alcançado um rendimento de 89,88% (m/m) de EEAGs e 0,17% (m/m) de AGLs. A possibilidade do uso desses substratos não refinados, combinados a um catalisador que pode ser recuperado e reutilizado, como visto no capítulo anterior, é interessante pois contribuem para a redução dos custos de processo, podendo-se assim viabilizar a produção do biodiesel pela rota enzimática.

Uma limitação encontrada ao utilizar o óleo degomado é que devido ao longo tempo de armazenamento, este sofreu alguma deterioração que comprometeu o seu potencial na reação visando o rendimento em biodiesel (EEAG > 96,5%, m/m), sendo assim, faz-se necessário uma nova investigação com a matéria-prima dentro do padrão em relação ao índice de saponificação, garantindo a qualidade da mesma.

6. CONCLUSÕES GERAIS

O trabalho desenvolvido caracterizou duas versões da formulação enzimática líquida disponível comercialmente para a produção de biodiesel, a Eversa[®] Transform. Ambas são muito similares em termos de massa molecular da enzima e atividades específicas, distinguindo-se principalmente na estabilidade térmica, sendo a segunda versão mais termotolerante.

Visando a facilidade da recuperação e possibilidade do reuso do catalisador na produção de biodiesel, a Eversa[®] Transform 2.0 foi imobilizada pela técnica CLEA. O melhor CLEA obtido, denominado Eversa m-CLEA, foi a partir da lipase tratada com PEI e coagregada com nanopartículas magnéticas funcionalizadas com grupos aminos e octilas e na presença de amido como agente porogênico. O biocatalisador obtido apresentou 98,9% de rendimento de imobilização, 30,1% de atividade recuperada e apresentou-se cerca de 40 vezes mais estável que a enzima solúvel à 70 °C, pH 7,0.

Na reação de transesterificação usando óleo de soja refinado, razão molar de óleo/álcool anidro 1:6, 12 U_{est}/g_{óleo} do Eversa m-CLEA, à 40°C em um reator de fluxo em vórtice, o rendimento mássico foi de 89,8% de EEAGs, 0,27% de MAGs, 0,18% de DAGs, 0,01% de TAGs e 3,8% de AGLs, um tratamento cáustico deste produto possibilitou obter um biodiesel dentro das normas internacionais exigidas. O biodiesel deste trabalho obteve um rendimento mássico de 98,92% em EEAGs, 0,17% em MAGs, 0,19% em DAGs, 0,01% em TAGs e 0,13% em AGLs. Além disso, o biocatalisador Eversa m-CLEA foi reutilizado em 5 ciclos de 12 h na etanólise do óleo de soja, mantendo 89,6% do rendimento de EEAGs do primeiro lote.

A partir da otimização de alguns parâmetros, foi empregado o óleo de soja degomado e etanol hidratado na reação de transesterificação. O emprego desses dois substratos contribuiu com a diminuição do custo do processo, visto que são matérias-primas não refinadas com menor valor agregado. Numa reação empregando o óleo degomado, razão molar de óleo/álcool hidratado 1:6, 4 U_{est}/g_{óleo} do Eversa m-CLEA, à 40 °C em um reator de fluxo em vórtice, um rendimento mássico de 80-85% de EEAGs foi obtido; entretanto, com uma acidez livre não adequada ao produto final (3,5-4%, m/m de AGLs). Estratégias afim de refinar o produto foram adotadas, onde a partir do polimento caustico obteve-se um produto final com 89,88% de EEAGs e 0,17% de AGLs.

Foi identificado que o óleo degomado, apesar do bom resultado obtido, não estava dentro da especificação para o índice de saponificação, que responde pela qualidade da matéria-

prima. Devido a isso, um comprometimento do rendimento em biodiesel na reação deve ser levado em consideração. Afim de investigar tal fato, sugere-se uma repetição do ensaio empregando um lote mais recente do óleo de soja degomado. Assim, um novo rendimento em biodiesel pode ser obtido almejando resultados que o classifique dentro das normas internacionais.

De maneira geral, os resultados obtidos neste trabalho mostram que a partir da técnica de CLEA pode-se obter um biocatalisador estável, com propriedades magnéticas que permitem sua fácil recuperação do meio reacional e com boa capacidade de reutilização. O emprego do Eversa m-CLEA permitiu excelentes resultados em biodiesel, demonstrando o potencial deste biocatalisador. Além disso a aplicação da lipase imobilizada com o óleo de soja degomado e etanol hidratado tornam a produção do biodiesel enzimático ainda mais atrativa tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico.

Diante dos resultados obtidos, sugere-se para trabalhos futuros:

- a) Um ensaio utilizando um novo óleo de soja degomado, para investigar se a qualidade da matéria-prima afetou o rendimento da produção do biodiesel;
- b) Avaliar a concentração da Lipozym 435 na reação de esterificação afim de promover um ganho no rendimento da reação;
- c) Realizar outras análises exigidas pelas normas internacionais para caracterizar o biodiesel obtido, como viscosidade cinemática, ponto de fulgor, teor de fósforo, enxofre, água, número de cetanos, estabilidade à oxidação, entre outras.
- d) Realizar uma avaliação técnico-econômica do processo nas condições desenvolvidas neste trabalho, usando o biocatalisador obtido e as matérias-primas testadas com o objetivo de investigar a viabilidade da produção do biodiesel enzimático.

7. REFERÊNCIAS

- ABITOGUN, A. et al. effects of phosphoric acid on physico- chemical parameters of soyabean oil. **The Internet Journal of Nutrition and Wellness**, v. 8, p. 1–5, 2009.
- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6406, 2013.
- AGUILAR, M. C. V. **Modelagem fenomenológica da síntese enzimática de biodiesel etanólico utilizando lipase**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos (UFSCAr), 2018.
- AMARAL-FONSECA, M. et al. Preparation of Magnetic Cross-Linked Amyloglucosidase Aggregates: Solving Some Activity Problems. **Catalysts**, v. 8, p. 496, 2018.
- AMARAL-FONSECA, M. et al. Optimization of simultaneous saccharification and isomerization of dextrin to high fructose syrup using a mixture of immobilized amyloglucosidase and glucose isomerase. **Catalysis Today**, 2020.
- ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Evaluation of Reaction Mechanisms and Kinetic Parameters for the Transesterification of Castor Oil by Liquid Enzymes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 56, p. 9478–9488, 2017a.
- ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Investigation of the use of ceramic membranes in recovering liquid enzymes for castor oil transesterification. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, p. 769–774, 2019.
- ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Castor Oil Transesterification Catalysed by Liquid Enzymes : Feasibility of Reuse under Various Reaction Conditions. **Chemical Engineering Transactions**, v. 57, p. 913–918, 2017b.
- ANDUALEMA, B.; GESSESSE, A. Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review. **Biotechnology(Faisalabad)**, v. 11, p. 100–118, 2012.
- ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 257–270, 2016.
- ANP. **Biodiesel**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>>. Acesso em: 9 out. 2020.
- ANP. **Óleo diesel brasileiro passa a conter mínimo de 12% de biodiesel**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/noticias/5633-oleo-diesel-brasileiro-passa-conter-minimo-12-biodiesel>>. Acesso em: 21 out. 2020a.
- ANP. **Anuário Estatístico 2020**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/5809-anuario-estatistico-2020>>. Acesso em: 12 out. 2020b.
- AOCS CD 3-25. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists` Society**. 4. ed. Champaign, USA: AOCS, 1990.

ARANA-PEÑA, S. et al. One Pot Use of Combilipases for Full Modification of Oils and Fats: Multifunctional and Heterogeneous Substrates. **Catalysts**, v. 10, p. 605, 2020.

ARANA-PEÑA, S.; LOKHA, Y.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of Eversa Lipase on Octyl Agarose Beads and Preliminary Characterization of Stability and Activity Features. **Catalysts**, v. 8, p. 511, 2018.

ARANSIOLA, E. F. et al. A review of current technology for biodiesel production: State of the art. **Biomass and Bioenergy**, v. 61, p. 276–297, 2014.

ARAUJO-SILVA, R. et al. Maltose Production Using Starch from Cassava Bagasse Catalyzed by Cross-Linked β -Amylase Aggregates. **Catalysts**, v. 8, p. 170, 2018.

ATHAR, M.; ZAIDI, S. A review of the feedstocks, catalysts, and intensification techniques for sustainable biodiesel production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1862, p. 104523, 2020.

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

BEISSON, F. et al. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, p. 133–153, 2000.

BIODIESELBR. **Brasil**. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/biodiesel/historia/oleos-vegetais-biodiesel-brasil>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

BISEN, P. S. et al. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1019–1030, 2010.

BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. **Process Biochemistry**, v. 90, p. 66–80, 2020.

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, p. 248–254, 1976.

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. v. 1051

BRESOLIN, D. et al. Synthesis of a green polyurethane foam from a biopolyol obtained by enzymatic glycerolysis and its use for immobilization of lipase NS-40116. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, p. 213–222, 2019.

BRESOLIN, D. et al. Immobilization of lipase Eversa Transform 2.0 on poly(urea–urethane) nanoparticles obtained using a biopolyol from enzymatic glycerolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, p. 1279–1286, 2020.

BRZOWSKI, 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.

CALERO, J. et al. Rhizomucor miehei Lipase Supported on Inorganic Solids, as Biocatalyst

for the Synthesis of Biofuels: Improving the Experimental Conditions by Response Surface Methodology. **Energies**, v. 12, p. 831, 2019.

CAO, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. **Organic Letters**, v. 2, p. 1361–1364, 2000.

CASTRO, H. F. et al. Modification of oils and fats by biotransformation. **Química Nova**, v. 27, p. 146–156, 2004.

CEPEA. **Indicador semana do Etanol**. Disponível em: <<https://cepea.esalq.usp.br/br/indicador/etanol.aspx>>. Acesso em: 19 out. 2020.

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

CESARINI, S. et al. Moving towards a competitive fully enzymatic biodiesel process. **Sustainability (Switzerland)**, v. 7, n. 6, p. 7884–7903, 2015.

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.

CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497–520, 2014.

CHUAH, L. F. et al. A review of cleaner intensification technologies in biodiesel production. **Journal of Cleaner Production**, v. 146, p. 181–193, 2017.

CORTEZ, D. V. et al. The Realm of Lipases in Biodiesel Production. In: SINGH, O. V.; CHANDEL, A. K. (Eds.). **Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy**. [s.l.] Springer, Cham, 2018. p. 247–288.

CRUZ-IZQUIERDO, Á. et al. Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates (mCLEAs) of *Candida antarctica* Lipase: An Efficient and Stable Biocatalyst for Biodiesel Synthesis. **PLoS ONE**, v. 9, p. e115202, 2014.

CUI, J. D.; JIA, S. R. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, p. 15–28, 2015.

CURRAN, S. J.; BLACK, R. A. Quantitative experimental study of shear stresses and mixing in progressive flow regimes within annular-flow bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 5859–5868, 2004.

DA SILVA, J. R. P. et al. Lipase NS40116 as catalyst for enzymatic transesterification of abdominal chicken fat as substrate. **Bioresource Technology Reports**, v. 4, p. 214–217, 2018.

DAL MAGRO, L. et al. Optimized immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* following different protocols: Improved stability and activity under drastic conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 234–243, 2019.

DAL MAGRO, L. et al. Pectin lyase immobilization using the glutaraldehyde chemistry increases the enzyme operation range. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 132, p. 109397, 2020.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. DA G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623–630, 2004.

DANTAS, A. et al. Potential application of *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) immobilized on nonporous polystyrene particles. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 38, p. 608–613, 2019.

DUVEKOT, C. **Determination of Total FAME and Linolenic Acid Methyl Esters in Biodiesel According to EN-14103**. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-8983EN.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2020.

ERDIWANSYAH et al. An overview of higher alcohol and biodiesel as alternative fuels in engines. **Energy Reports**, v. 5, p. 467–479, 2019.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. 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 an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3–4, p. 197–212, 2010.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 242–250, 2007.

FERNANDEZ-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.

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 Bioengineering**, v. 102, p. 1298–1315, 2009.

FRAGA, F. C. et al. Effect of magnetic field on the Eversa® Transform 2.0 enzyme: Enzymatic activity and structural conformation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 653–658, 2019.

FRANSSEN, M. C. R. et al. Immobilised enzymes in biorenewables production. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6491, 2013.

GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, p. 2885–2904, 2011.

GIORDANO, ROBERTO CAMPOS GIORDANO, R. DE L. C. Taylor–Couette Vortex Flow in Enzymatic Reactors Roberto. In: GUI SAN, J. M. (Ed.). **Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells**. Methods in BiotechnologyTM. 2. ed. Totowa, NJ: Humana Press, dez. 2006. p. 449.

GIORDANO, R. L. .; GIORDANO, R. C.; COONEY, C. L. Performance of a continuous Taylor–Couette–Poiseuille vortex flow enzymic reactor with suspended particles. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1093–1101, 2000.

GUAUQUE TORRES, M. P.; FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Effect of different parameters on the hydrolytic activity of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 72, p. 18–23, 2013.

GUAUQUE TORRES, M. P.; FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. CLEAs of *Candida antarctica* lipase B (CALB) with a bovine serum albumin (BSA) cofeeder core: Study of their catalytic activity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p. 36–43, 2014.

GUERRAND, D. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. **OCL**, v. 24, p. D403, 2017.

GUIMARÃES, J. R. et al. Evaluation of strategies to produce highly porous cross-linked aggregates of porcine pancreas lipase with magnetic properties. **Molecules**, v. 23, p. 2993, 2018.

GUI SAN, J. M. Immobilization of Enzymes as the 21st Century Begins. In: GUI SAN, J. M. (Ed.). **Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 1–13.

GUMBA, R. E. et al. Green biodiesel production: a review on feedstock, catalyst, monolithic reactor, and supercritical fluid technology. **Biofuel Research Journal**, v. 3, p. 431–447, 2016.

GUPTA, P. et al. Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4074–4076, 2009.

GUTIERREZ-LAZARO, A. et al. Effect of Operating Variables and Kinetics of the Lipase Catalyzed Transesterification of Ethylene Carbonate and Glycerol. **Fermentation**, v. 4, p. 75, 2018.

HAAS, M. J. et al. A process model to estimate biodiesel production costs. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 671–678, 2006.

HASAN, F. et al. Enzymes used in detergents: Lipases. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 4836–4844, 2010.

HIRATA, D. B. et al. Advantages of Heterofunctional Octyl Supports: Production of 1,2-Dibutyryl by Specific and Selective Hydrolysis of Tributyrin Catalyzed by Immobilized Lipases. **ChemistrySelect**, v. 1, p. 3259–3270, 2016.

HOLČAPEK, M. et al. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. **Journal of**

Chromatography A, v. 858, p. 13–31, 1999.

HONAISSER, T. C. et al. Immobilization of Lipase NS-40116 (*Thermomyces lanuginosus*) by Sol-Gel Technique Using Polyethyleneglycol as Additive. **Industrial Biotechnology**, v. 15, p. 35–40, 2019.

IFAG. **Cotação Soja**. Disponível em: <<http://ifag.org.br/cotacao-soja.html>>. Acesso em: 19 out. 2020.

ISMAIL, A. R.; BAEK, K.-H. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1624–1639, 2020.

JAMIL, F. et al. Current scenario of catalysts for biodiesel production: a critical review. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 34, p. 267–297, 2018.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 555–569, 2012.

KASCHE, V. Mechanism and yields in enzyme catalysed equilibrium and kinetically controlled synthesis of β -lactam antibiotics, peptides and other condensation products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, p. 4–16, 1986.

KIT. **Influence of mixing on chemical reactions in the Taylor-Couette reactor**. Disponível em: <https://www.tvt.kit.edu/21_1899.php>. Acesso em: 15 out. 2020.

KOBAYASHI, T. Lipase-catalyzed syntheses of sugar esters in non-aqueous media. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 1911–1919, 2011.

KOPP, W. et al. Synthesis and characterization of robust magnetic carriers for bioprocess applications. **Materials Science and Engineering: B**, v. 193, p. 217–228, 2015.

KORNECKI, J. F. et al. Influence of phosphate anions on the stability of immobilized enzymes. Effect of enzyme nature, immobilization protocol and inactivation conditions. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 288–296, 2020.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEE, A. et al. Preparation of diisononyl adipate in a solvent-free system via an immobilized lipase-catalyzed esterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 131, p. 109340, 2019.

LIMA, L. et al. Performance of Different Immobilized Lipases in the Syntheses of Short- and Long-Chain Carboxylic Acid Esters by Esterification Reactions in Organic Media. **Molecules**, v. 23, p. 766, 2018.

LIMA, L. N. et al. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, p. 523–535, 2015.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: Parametros de Qualidade e

Metodos Analiticos. **Quim.Nova**, v. 32, p. 1596–1608, 2009.

LÓPEZ-GALLEGO, F. et al. Co-aggregation of Enzymes and Polyethyleneimine: A Simple Method To Prepare Stable and Immobilized Derivatives of Glutaryl Acylase. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1839–1842, 2005.

LÓPEZ-SERRANO, P. et al. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 16, p. 1379–1383, 2002.

LOTTI, M. et al. Enzymatic Production of Biodiesel: Strategies to Overcome Methanol Inactivation. **Biotechnology Journal**, v. 13, p. 1700155, 2018.

MAFRA, A. C. O. et al. Diffusion effects of bovine serum albumin on cross-linked aggregates of catalase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 107–116, 2016.

MAFRA, A. C. O. et al. Combined CLEAs of invertase and soy protein for economically feasible conversion of sucrose in a fed-batch reactor. **Food and Bioproducts Processing**, v. 110, p. 145–157, 2018.

MAFRA, A. C. O. et al. Combi-CLEAs of Glucose Oxidase and Catalase for Conversion of Glucose to Gluconic Acid Eliminating the Hydrogen Peroxide to Maintain Enzyme Activity in a Bubble Column Reactor. **Catalysts**, v. 9, p. 657, 2019.

MANOEL, E. A. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53–57, 2015.

MARGRETH, M.; SCHLINK, R.; STEINBACH, A. Water Determination By Karl Fischer Titration. In: **Pharmaceutical Sciences Encyclopedia**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 25 jun. 2010. p. 1–35.

MARTÍNEZ-SANCHEZ, J. A. et al. Immobilized Biocatalysts of Eversa® Transform 2.0 and Lipase from *Thermomyces Lanuginosus*: Comparison of Some Properties and Performance in Biodiesel Production. **Catalysts**, v. 10, p. 738, 2020.

MATEO, C. et al. A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, p. 273–276, 2004.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MCCURRY, J. D.; WANG, C.-X. **Analysis of glycerin and glycerides in biodiesel (B100) using ASTM D6584 and EN14105**. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-7269CHCN.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2020.

MEHER, L.; VIDYASAGAR, D.; NAIK, S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, p. 248–268, 2006.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.

78, p. 119–134, 2012.

MENG, X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1–5, 2009.

MIBIELLI, G. M. et al. Lab and pilot plant FAME production through enzyme-catalyzed reaction of low-cost feedstocks. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 150–156, 2019.

MIRANDA, L. P. et al. Composites of Crosslinked Aggregates of Eversa® Transform and Magnetic Nanoparticles. Performance in the Ethanolysis of Soybean Oil. **Catalysts**, v. 10, p. 817, 2020.

MOAZENI, F.; CHEN, Y.-C.; ZHANG, G. Enzymatic transesterification for biodiesel production from used cooking oil, a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 216, p. 117–128, 2019.

MONROE, E. et al. Superior performance biodiesel from biomass-derived fusel alcohols and low grade oils: Fatty acid fusel esters (FAFE). **Fuel**, v. 268, p. 117408, 2020.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Energy**, 2020.

MONTORO-GARCÍA, S. et al. Improved cross-linked enzyme aggregates for the production of desacetyl β -lactam antibiotics intermediates. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 331–336, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NGUYEN, H. et al. Liquid Lipase-Catalyzed Esterification of Oleic Acid with Methanol for Biodiesel Production in the Presence of Superabsorbent Polymer: Optimization by Using Response Surface Methodology. **Energies**, v. 11, p. 1085, 2018.

NIELSEN, P. M. et al. Production of Biodiesel Using Liquid Lipase Formulations. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, p. 905–910, 2016.

NORDBLAD, M. et al. Identification of critical parameters in liquid enzyme-catalyzed biodiesel production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 12, p. 2446–2453, 2014.

NORJANNAH, B. et al. Enzymatic transesterification for biodiesel production: a comprehensive review. **RSC Advances**, v. 6, p. 60034–60055, 2016.

NOVOZYMES, S. **New enzyme technology converts waste oils into biodiesel**. Disponível em: <<https://www.novozymes.com/es/news/news-archive/2014/12/new-enzyme-technology-converts-waste-oil-into-biodiesel>>. Acesso em: 11 ago. 2019.

NOVOZYMES, S. **The novozymes enzymatic biodiesel handbook**. Disponível em: <<https://www.novozymes.com/en/advance-your-business/food-and-beverage/vegetable-oils-processing/biodiesel>>. Acesso em: 15 maio. 2020.

OSBON, Y.; KUMAR, M. Biocatalysis and Strategies for Enzyme Improvement. In: **Biophysical Chemistry - Advance Applications**. [s.l.] IntechOpen, 19 fev. 2020.

- PANDEY, A. et al. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 29 (Pt 2), p. 119–31, 1999.
- PAULA, A. V. et al. Comparação do desempenho da lipase de candida rugosa imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, p. 35–40, 2008.
- PEITER, A. S. et al. Stirring and mixing in ethylic biodiesel production. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, p. 54–59, 2020.
- PINHOLT, C. et al. Influence of glycosylation on the adsorption of Thermomyces lanuginosus lipase to hydrophobic and hydrophilic surfaces. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p. 273–281, 2010.
- POPPE, J. K. et al. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 511–525, 2015.
- 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.
- PRASAD, S.; ROY, I. Converting Enzymes into Tools of Industrial Importance. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 12, p. 33–56, 2017.
- RAMOS, M. D. **Imobilização De Lipases Pela Técnica Clea Para Síntese De Biodiesel Em Reator De Fluxo Em Vórtice**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2017.
- RAMOS, M. D. et al. 1,3-Regiospecific ethanolysis of soybean oil catalyzed by crosslinked porcine pancreas lipase aggregates. **Biotechnology Progress**, v. 34, p. 910–920, 2018.
- RAMOS, M. D. et al. Improving the yields and reaction rate in the ethanolysis of soybean oil by using mixtures of lipase CLEAs. **Molecules**, v. 24, p. 4392, 2019.
- RANCKE-MADSEN, A. Enzymatic biodiesel—Single time use of enzyme and one pot polishing solution. **Proceedings of the INFORM; Rattray, J.B.M.**, v. 27, p. 18–19, 2016.
- RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3975–3981, 2008.
- REMONATTO, D. et al. FAME Production from Waste Oils Through Commercial Soluble Lipase Eversa ® Catalysis. **Industrial Biotechnology**, v. 12, p. 254–262, 2016.
- REMONATTO, D. **Síntese enzimática de ésteres de ácidos graxos a partir de diferentes matérias graxas utilizando as lipases Eversa Transform e Eversa Transform 2.0**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.
- REMONATTO, D. et al. Production of FAME and FAEE via Alcoholysis of Sunflower Oil by Eversa Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, p. 705–716, 2018.
- RESENDE, M. M. et al. Distribution of suspended particles in a Taylor–Poiseuille vortex flow reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 56, p. 755–761, 2001.

RIBEIRO, B. D. et al. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–16, 2011.

RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 6290–6307, 2013.

RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, p. 746–770, 2019.

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, p. 15–32, 2010.

ROJAS, M. et al. Preparation of Crosslinked Enzyme Aggregates of a Thermostable Cyclodextrin Glucosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. Critical Effect of the Crosslinking Agent. **Catalysts**, v. 9, p. 120, 2019.

ROSSET, D. V. et al. Enzyme-Catalyzed Production of FAME by Hydroesterification of Soybean Oil Using the Novel Soluble Lipase NS 40116. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, p. 914–926, 2019.

RUEDA, N. et al. Reversible Immobilization of Lipases on Heterofunctional Octyl-Amino Agarose Beads Prevents Enzyme Desorption. **Molecules**, v. 21, p. 646, 2016.

RUKUNUDIN, I. H. et al. A modified method for determining free fatty acids from small soybean oil sample sizes. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, p. 563–568, 1998.

SCHOEVAART, R. et al. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87, p. 754–762, 2004.

SCHRAG, J. D. et al. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**, v. 5, p. 187–202, 1997.

SHAH, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. **Analytical Biochemistry**, v. 351, p. 207–213, 2006.

SHELDON, R. CLEAs, Combi-CLEAs and 'Smart' Magnetic CLEAs: Biocatalysis in a Bio-Based Economy. **Catalysts**, v. 9, p. 261, 2019.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, p. 1289–1307, 2007.

SHELDON, R. A. Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts. **Organic Process Research & Development**, v. 15, p. 213–223, 2011a.

SHELDON, R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 467–477, 2011b.

SHELDON, R. A.; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L. M. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 23, p. 141–147, 2005.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 6223–6235, 2013.

SILVA, F. DE A. **Estudo da produção de biodiesel utilizando etanol e óleo de soja ou de macaúba, catalisada por lipase de mamona e de *Thermomyces lanuginosus***. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, 2015a.

SILVA, R. A. **Aplicação de CLEA de beta-amilase de cevada na produção de maltose a partir de amido residual do bagaço de mandioca em reator de fluxo em vórtices**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2015b.

SINGH, D. et al. Chemical compositions, properties, and standards for different generation biodiesels: A review. **Fuel**, v. 253, p. 60–71, 2019.

STERGIOU, P.-Y. et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1846–1859, 2013.

TACIAS-PASCACIO et al. Dextran Aldehyde in Biocatalysis: More Than a Mere Immobilization System. **Catalysts**, v. 9, p. 622, 2019.

TALEKAR, S. et al. Porous cross linked enzyme aggregates (p-CLEAs) of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. **Catalysis Science & Technology**, v. 2, p. 1575, 2012a.

TALEKAR, S. et al. Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of alpha amylase. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 542–547, 2012b.

TALEKAR, S. et al. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). **RSC Advances**, v. 3, p. 12485, 2013.

TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628–634, 2010.

TANG, Z.-E. et al. Synthesis of biomass as heterogeneous catalyst for application in biodiesel production: State of the art and fundamental review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 235–253, 2018.

THANGARAJ, B. et al. Catalysis in biodiesel production—a review. **Clean Energy**, v. 3, p. 2–23, 2019.

TISEO, I. **Global biodiesel production by country 2019**. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/271472/biodiesel-production-in-selected-countries/#statisticContainer>>. Acesso em: 13 out. 2020.

TOFTGAARD PEDERSEN, A. et al. Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 89–94, 2014.

URRUTIA, P. et al. Immobilization of lipases in hydrophobic chitosan for selective hydrolysis of fish oil: The impact of support functionalization on lipase activity, selectivity

and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 674–686, 2018.

VALDÉS, E. C.; SOTO, L. W.; ARCAYA, G. A. Influence of the pH of glutaraldehyde and the use of dextran aldehyde on the preparation of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Burkholderia cepacia*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 1–7, 2011.

VARGAS, M. et al. Lipases as Biocatalyst for Biodiesel Production. In: SANDOVAL, G. (Ed.). **Lipases and Phospholipases. Methods in Molecular Biology**. 1835. ed. New York: Humana Press, 2018. p. 377–390.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. et al. Polyethylenimine: A very useful ionic polymer in the design of immobilized enzyme biocatalysts. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, p. 7461–7490, 2017.

WANCURA, J. H. C. et al. Soluble lipase-catalyzed synthesis of methyl esters using a blend of edible and nonedible raw materials. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, p. 1185–1193, 2018a.

WANCURA, J. H. C. et al. Production of biodiesel catalyzed by lipase from *Thermomyces lanuginosus* in its soluble form. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96, p. 2361–2368, 2018b.

WANCURA, J. H. C. et al. Feeding strategies of methanol and lipase on Eversa® Transform-mediated hydroesterification for FAME production. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 97, p. 1332–1339, 2019a.

WANCURA, J. H. C. et al. Improving the soluble lipase-catalyzed biodiesel production through a two-step hydroesterification reaction system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019b.

WANCURA, J. H. C. et al. Lipases in liquid formulation for biodiesel production: Current status and challenges. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. bab.1835, 2019c.

WANG, M. et al. Porous-CLEAs of papain: Application to enzymatic hydrolysis of macromolecules. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3541–3545, 2011.

WATANABE, Y. et al. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 151–155, 2002.

WILSON, L. et al. CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 750–755, 2006.

ZAAK, H. et al. Effect of high salt concentrations on the stability of immobilized lipases: Dramatic deleterious effects of phosphate anions. **Process Biochemistry**, v. 62, p. 128–134, 2017.

ZHANG, H. et al. Advances in production of bio-based ester fuels with heterogeneous bifunctional catalysts. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 114, p. 109296, 2019.