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

Lionete Nunes de Lima

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES CATALISADA POR LIPASES IMOBILIZADAS EM DIFERENTES SUPORTES

SÃO CARLOS/SP
2013

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

Lionete Nunes de Lima

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES CATALISADA POR LIPASES IMOBILIZADAS EM DIFERENTES SUPORTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química, na área de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli

SÃO CARLOS/SP
2013

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária/UFSCar

L732se

Lima, Lionete Nunes de.
Síntese enzimática de ésteres catalisada por lipases imobilizadas em diferentes suportes / Lionete Nunes de Lima. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
152 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Enzimas. 2. Lipase. 3. Imobilização. 4. Ésteres. I. Título.

CDD: 660.634 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **LIONETE NUNES DE LIMA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 22 DE MARÇO DE 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Raquel de Lima Camargo Giordano
Orientadora / UFSCar

Paulo Waldir Tardioli
Co-orientador / UFSCar

Dasciana de Sousa Rodrigues
Embrapa

Adriano Aguiar Mendes
UFSJ

Rosineide Gomes da Silva
UFSCar

Cristiane Sanchez Farinas
Embrapa

Ursula Fabiola Rodríguez Zúñiga
UFSCar

Dedico este trabalho
aos meus familiares pelo apoio
em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me proporcionado a felicidade de concluir este trabalho;

Aos meus familiares pelo apoio, carinho e compreensão e, em especial, ao meu irmão Lucinaldo pela ajuda e incentivo;

Aos orientadores Raquel de Lima Camargo Giordano e Paulo Waldir Tardioli pela orientação, ensinamentos e disponibilidade;

À Universidade Federal de São Carlos e ao Departamento de Engenharia Química, pela oportunidade de realizar este Doutorado;

Aos Doutores José Manuel Guisán, César Mateo e Glória Fernádez-Lorente do Instituto de Catálisis y Petroleoquímica – ICP/CSIC pela orientação no estágio realizado em Madrid;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa durante o estágio na Espanha;

Ao grupo de pesquisa da professora Heizir Ferreira de Castro, da Escola de Engenharia de Lorena, pela cooperação para a realização deste trabalho e, em especial, à Patrícia Da Rós;

Ao professor Roberto de Campos Giordano, pela atenção e apoio;

Ao Dr. Adriano Aguiar Mendes e a Dra. Dasciana de Sousa Rodrigues, pela amizade, apoio e orientações em todos os momentos;

Aos técnicos Thaís, Alyne, Tiago e Amadeus pelo apoio e amizade;

A Lúcia Wolf pelos conselhos, amizade e incentivo;

Ao Gustavo pelo carinho, paciência, dedicação, incentivo e companheirismo;

A todos os amigos de trabalho, pelo incentivo, troca de conhecimento, convívio e carinho;

Finalmente, agradeço a todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

"Adoramos a perfeição, porque não a podemos ter; repugná-la-íamos, se a tivéssemos. O perfeito é desumano, porque o humano é imperfeito".

Fernando Pessoa

Lima, Lionete Nunes, D.Sc., Universidade Federal de São Carlos, Março de 2013. Síntese enzimática de ésteres catalisada por lipase imobilizada em diferentes suportes. Orientadora: Profa. Dra. Raquel L. C. Giordano; Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli

RESUMO

Lipases são enzimas de grande relevância biotecnológica. Além de sua função natural (hidrólise de triglicerídeos) são capazes de catalisarem hidrólises regio e enantiosseletivas e sínteses de inúmeros ésteres. Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) foi imobilizada em diferentes suportes e por diferentes métodos e aplicadas na síntese de compostos de interesse industrial. A eficiência dessas sínteses com o biocatalisador LPF-octil-sílica foi comparada com lipases imobilizadas comerciais. Os derivados de LPF-octil-sílica, LPF-XAD 7HP e LPF-poliestireno foram utilizados na produção de biodiesel etílico de óleo de babaçu. O melhor rendimento (100% em 24 h) foi obtido com LPF imobilizada em octil-sílica (LPF-octil-sílica). Este derivado e lipases imobilizadas comerciais (lipase de *Candida antarctica*, CALB IM; lipase de *Thermomyces lanuginosus*, LTL IM) foram utilizadas na produção de biodiesel etílico de óleo de soja apresentando rendimentos similares em 48 h de reação (80%). Na síntese de aromas, os biocatalisadores LPF-octil-sílica, CALB IM, LTL IM e LPF IM (lipase de *P. fluorescens* imobilizada comercial) apresentaram similar desempenho (conversão acima de 90% com 24 h de reação). Conversões de aproximadamente 95% foram obtidas em 12 h de reação com os biocatalisadores LPF-octil-sílica e CALB IM, podendo ser reutilizados em oito bateladas sucessivas. CALB IM produziu oleato de frutose (55ºC, 24 h, razão molar ácido oleico:frutose de 1:2) com 96% de conversão, enquanto o derivado LPF-octil-sílica rendeu 57% de conversão (45ºC, 72 h, razão molar de 1:1). LPF imobilizada em octil-agarose e octadecil-Sepabeads apresentou um rendimento de imobilização de 99%, rendendo derivados hiperativados (150 e 300% de atividade recuperada, respectivamente). LPF em solução forma agregados bimoleculares, os quais puderam ser imobilizados em suportes glioxil (agarose e Sepabeads), rendendo derivados com 70 a 75% de atividade recuperada. A forma monomérica da enzima pôde ser imobilizada em glioxil-agarose a 25ºC, pH 10,5 (tampão bicarbonato de sódio 100 mM), entretanto, na presença de um surfactante (Triton X-100, 0,5%, v/v). Na hidrólise de (*R,S*)-2-hidróxi-4-fenilbutirato de etila, LPF

imobilizada em octil-agarose (conformação aberta) e em glioxil-agarose (na forma de agregados bimoleculares) mostraram-se mais enantiosseletivas (E > 100) do que LPF imobilizada na forma monomérica em glioxil-agarose (E = 27,9). LPF imobilizada em octadecil-Sepabeads e glioxil-Sepabeads produziram oleato de benzila com 85% de conversão, por transesterificação de azeite de oliva e álcool benzílico em ciclohexano. Esses resultados mostram que atividade, estabilidade e enantiosseletividade são propriedades catalíticas das lipases que podem ser moduladas por imobilização em suportes ativados que permitam a orientação da enzima ao suporte por diferentes regiões de sua superfície e com diferente conformação estrutural. De modo geral, o biocatalisador preparado neste trabalho (LPF-octil-sílica) apresentou ótimo desempenho em reações de esterificação e transesterificação, bem como boa estabilidade operacional, tornando-o competitivo com os biocatalisadores imobilizados comerciais.

PALAVRAS-CHAVE: Lipase, imobilização, ésteres

Lima, Lionete Nunes, D.Sc., Federal University of São Carlos, March 2013. Enzymatic synthesis of esters catalyzed by immobilized lipase on different supports. Supervisor: Profa. Dra. Raquel L. C. Giordano; Co-supervisor: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli.

ABSTRACT

Lipases are enzymes of great biotechnological relevance. Besides its natural function (hydrolysis of triglycerides), they are capable of catalyzing regio- and enantioselective hydrolysis and synthesis of numerous esters. *Pseudomonas fluorescens* lipase (LPF) was immobilized on different supports and with different methods and was applied on the synthesis of compounds of industrial interest. The efficiency of these syntheses with the biocatalyst PFL-octyl-silica, PFL-XAD 7 HP and PFL-polystyrene were used on the production of ethylic biodiesel from babassu oil. The best yield (100% within 24 h) was obtained with PFL immobilized on octyl-silica (PFL-octyl-silica). This derivative and commercial immobilized lipases (*Candida antarctica* lipase, CALB IM; *Thermomyces lanuginosus* lipase, LTL IM) were used on the production of ethylic biodiesel from soybean oil, showing similar yields within 48 h of reaction time (80%). On the synthesis of aromas, the biocatalysts PFL-octyl-silica, CALB IM, LTL IM and LPF IM (commercial immobilized *Pseudomonas fluorescens* lipase) presented similar performance (yield above 90% within 24 h of reaction time). Yields of about 95% were obtained within 12 h of reaction time with the biocatalysts PFL-octyl-silica and CALB IM, being able to be reused in eight successive batches. CALB IM produced fructose oleate (55 ºC, 24 h, oleic acid:fructose molar ratio 1:2) with 96% yield, whereas the derivative PFL-octyl.-silica yielded 57% (45 ºC, 72 h, molar ratio 1:1). PFL immobilized on octyl-agarose and octadecyl-Sepabeads presented an immobilization yield of 99%, rendering hyperactivated derivatives (150% and 300% of recovered activity, respectively). The monomeric form of the enzyme could be immobilized on glyoxyl-agarose at 25 ºC, pH 10.5 (100 mM sodium bicarbonate buffer), however, in the presence of a surfactant (Triton X-100 0,5% v/v). On the hydrolysis of (*R,S*)-ethyl-2-hydroxy-4-phenylbutyrate, PFL immobilized on octyl-agarose (open conformation) and on glyoxyl-agarose (in the form of bimolecular aggregates) showed a higher enantioselectivity (E > 100) than PFL immobilized on monomeric form on glyoxyl-agarose (E = 27.9). PFL immobilized on octadecyl-Sepabeads and glyoxyl-Sepabeads produced benzyl oleate with 85% yield via olive oil and benzyl

alcohol transesterification in cyclohexane. These results show that the activity, stability and enantioselectivity are catalytic properties of lipases which could be modulated via immobilization on activated supports which allows the enzyme orientation on the support by different region of its surface and with different structural conformation. In general, the biocatalyst prepared on this work (PFL-octyl-silica) presented a great performance on esterification and transesterification reactions, as well as good operational stability, rendering it competitive to the commercial immobilized biocatalysts.

KEYWORDS: Lipase, immobilization, esters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Ativação interfacial de lipases em suportes hidrofóbicos. 29
Figura 2.2 Reações catalisadas por lipases. 30
Figura 2.3 Métodos de imobilização de enzimas. 33
Figura 2.4 Imobilização covalente multipontual em suporte ativado. 35
Figura 2.5 Imobilização por adsorção hidrofóbica interfacial 37
Figura 2.6 Comparação entre as formas de lipases após diferentes processos de imobilização 40
Figura 2.7 Estrutura morfológica da sílica com uma camada de organossilano (R = octil) na superfície 45
Figura 2.8 Estrutura morfológica do poliestireno. 46
Figura 2.9 Estruturas morfológicas da Amberlite XAD 7HP. 46
Figura 2.10 Representação da agarobiose, as unidades básicas da agarose. 47
Figura 2.11 Reação de transesterificação. 50
Figura 2.12 Processo ideal para produção enzimática de biodiesel. 54
Figura 2.13 Reação de esterificação. 59
Figura 2.14 Reação de esterificação entre um açúcar e um ácido graxo. 61
Figura 2.15 Resolução de (*R,S*)-HPBE por hidrólise de LPF 64
Figura 4.1 Análise termogravimétrica do suporte octil-sílica (linha preta é a termogravimetria e linha azul é a termogravimetria derivada) 87
Figura 4.2 Perfil da atividade hidrolítica dos sobrenadantes das suspensões de imobilização de LPF a 25°C, tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 em octil-sílica (■), poliestireno (●), XAD 7HP (▼) e controle (♦). 88
Figura 4.3 Eletroforese SDS-PAGE de LPF usando gel de poliacrilamida 14%. Pista 1: padrão de massa molecular em kDa; pista 2: Solução de LPF; pista 3: lipase imobilizada em octil-sílica (8 mg); pista 4: lipase imobilizada em poliestireno (8 mg) e pista 5: lipase imobilizada em XAD 7HP (8 mg). 91
Figura 4.4 Ajustes da isoterma de Langmuir aos dados experimentais de adsorção de LPF sobre a superfície hidrofóbica de octil-sílica a 25 °C, tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0. 93
Figura 4.5 Análise termogravimétrica do derivado LPF-octil-sílica (linha preta é a termogravimetria e linha azul é a termogravimetria derivada) 94

Figura 4.6 Perfil de inativação térmica a 60ºC, tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0 de LPF solúvel (■) e imobilizada em octil-sílica (♦). 95
Figura 4.7 Perfil de inativação térmica a 45°C (pH 8,0) na presença de etanol (36%, v/v) da LPF solúvel (■) e imobilizada em octil-sílica (●). 96
Figura 4.8 Perfil de inativação a 40°C de LPF-octil-sílica, baixa (●) e alta (■) carga (5 e 40 mg de proteína/g de suporte, respectivamente) na presença de óleo de soja e etanol (razão Molar 1:7). 98
Figura 4.9 Conversão da síntese de oleato de etila, a 37°C, 24 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1, usando LTL IM (□), LPF IM (●), CALB IM (♦), LPF-octil-sílica baixa carga (☆) (carga enzimática de 106 U_{Est}/g de ácido) e LPF-octil-sílica alta carga (▼) (1% de derivado). 101
Figura 4.10 Rendimento de transesterificação de óleo de babaçu em ésteres etílicos a 40ºC, razão molar óleo:etanol igual a 1:7, agitação de 500 rpm e carga enzimática de 0,2 g de biocatalisador/g de substrato. Reações catalisadas por LPF-octil-sílica (■), LPF-XAD 7HP (■) e LPF-Poliestireno (■). 102
Figura 4.11 Rendimento de transesterificação de óleo de soja em ésteres etílicos a 40ºC, razão molar óleo:etanol igual a 1:7, agitação de 500 rpm, sem peneira molecular. Reações catalisadas por LPF-octil-sílica (■), LTL IM (■) e CALB IM (■) (carga enzimática de 0,2; 0,13 e 0,15 g de biocatalisador/g de substrato, respectivamente). 103
Figura 4.12 Rendimento de transesterificação de óleo de soja em ésteres etílicos a 40ºC, razão molar óleo/etanol igual a 1:7, agitação de 500 rpm e 1,0 g de peneira molecular. Reações catalisadas por LPF-octil-sílica (■), LTL IM (■) e CALB IM (■) (carga enzimática de 0,2; 0,13 e 0,15 g de biocatalisador/g de substrato, respectivamente). 104
Figura 4.13 Cromatograma (RI-HPLC) de glicerol em solução para o teste de adsorção no derivado LPF-octil-sílica (linha vermelha é o tempo inicial e linha azul é o tempo final).106
Figura 4.14 Rendimentos de transesterificação de óleo de soja e etanol em bateladas sucessivas, catalisada por LPF-octil-sílica a 40ºC, razão molar óleo:etanol de 1:7, agitação de 500 rpm e carga enzimática de 0,2 g de catalisador/g de substrato. O rendimento da primeira batelada foi considerado igual a 100%. As barras representam desvios padrões de replicatas. 107
Figura 4.15 Conversão da síntese de acetato de butila (Morango) a 37°C, 24 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1 e usando LTL IM (■), LPF IM (○), CALB IM (◊), LPF-

octil-sílica baixa carga (◄) (carga enzimática de 200 U_{Est}/g de ácido) e LPF-octil-sílica alta carga (▼) (1% de derivado). As barras representam desvios padrões de replicatas. . 108
Figura 4.16 Conversão da síntese de acetato de hexila (Frutado) a 37°C, 24 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1 e usando LTL IM (■), LPF IM (○), CALB IM (◊), LPF-octil-sílica baixa carga (◄) (carga enzimática de 200 U_{Est}/g de ácido) e LPF-octil-sílica alta carga (▼) (1% de derivado). As barras representam desvios padrões de replicatas. . 109
Figura 4.17 Conversão da síntese de acetato de isoamila (Banana) a 37°C, 24 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1 e usando LTL IM (■), LPF IM (○), CALB IM (◊), LPF-octil-sílica baixa carga (◄) (carga enzimática de 200 U_{Est}/g de ácido) e LPF-octil-sílica alta carga (▼) (1% de derivado). As barras representam desvios padrões de replicatas. . 109
Figura 4.18 Conversão da síntese de butirato de butila (Abacaxi) a 37°C, 24 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1 e usando LTL IM (■), LPF IM (○), CALB IM (◊), LPF-octil-sílica baixa carga (◄) (carga enzimática de 200 U_{Est}/g de ácido) e LPF-octil-sílica alta carga (▼) (1% de derivado). As barras representam desvios padrões de replicatas. . 110
Figura 4.19 Conversão da síntese do butirato de etila (Abacaxi) a 37°C, 24 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1 e usando LTL IM (■), LPF IM (○), CALB IM (◊), LPF-octil-sílica baixa carga (◄) (carga enzimática de 200 U_{Est}/g de ácido) e LPF-octil-sílica alta carga (▼) (1% de derivado). As barras representam desvios padrões de replicatas. . 110
Figura 4.20 Conversão da síntese de butirato de butila a 37°C, 24 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1 e carga enzimática de 200 U_{Est}/g de ácido. A conversão foi acompanhada por titulação, usando os biocatalisadores de LPF-octil-sílica baixa carga (◄) e CALB IM (◆) e por cromatografia gasosa, usando LPF-octil-sílica baixa carga (■), CALB IM (●). As barras representam desvios padrões de replicatas. 112
Figura 4.21 Reuso de lipases imobilizadas na síntese do butirato de butila a 37 °C, 12 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1, carga enzimática de 200 U_{Est}/g de ácido e usando LTL IM (○), LPF IM (Δ), CALB IM (■), LPF-octil-sílica baixa carga (◄). A conversão da primeira batelada foi considerada 100%. As barras representam desvios padrões de replicatas..... 113
Figura 4.22 Perfis de conversões na síntese de oleato de frutose a 45 °C, 72 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:1, concentração de açúcar de 25 mM, usando CALB IM (□) e LPF-octil-sílica (○) na presença do solvente *terc*-butanol e CALB IM (■) e LPF-octil-sílica (●) na presença do solvente 2-metil-2-butanol, (0,5 g de derivado e 1,5 g de peneira molecular). 115

Figura 4.23 Conversão da síntese de oleato de lactose a 45 °C, 72 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:1, concentração de açúcar de 50 mM, usando CALB IM (■) e LPF-octil-sílica (●) na presença do solvente *terc*-butanol e CALB IM (□) e LPF-octil-sílica (○) na presença do solvente 2-metil-2-butanol, (0,5 g de derivado, 1,5 g de peneira molecular).116
Figura 4.24 Conversão da síntese de laurato de frutose a 45 °C, 72 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:1, concentração de açúcar de 25 mM, usando CALB IM (■) e LPF-octil-sílica (●) na presença do solvente *terc*-butanol e CALB IM (□) e LPF-octil-sílica (○) na presença do solvente 2-metil-2-butanol, (0,5 g de derivado, 1,5 g de peneira molecular). 117
Figura 4.25 Conversão da síntese de laurato de lactose a 45 °C, 72 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:1, concentração de açúcar de 50 mM, usando CALB IM (■) e LPF-octil-sílica (●) na presença do solvente *terc*-butanol e CALB IM (□) e LPF-octil-sílica (○) na presença do solvente 2-metil-2-butanol, (0,5 g de derivado, 1,5 g de peneira molecular). 117
Figura 4.26 Conversão da síntese de oleato de frutose a 45 °C, 72 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:2 usando CALB IM (■) e LPF-octil-sílica (○) e 2:1 usando CALB IM (□) e LPF-octil-sílica (●) (0,5 g de derivado) na presença do solvente *terc*-butanol. 118
Figura 4.27 Conversão da síntese de oleato de frutose, na presença do solvente *terc*-butanol, 72 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:1, usando LPF-octil-sílica a 45 °C (○) , LPF-octil-sílica a 55 °C (●) e 1:2 usando CALB IM a 45 °C (□), CALB IM a 55 °C (■) (0,5 g de derivado). 119
Figura 4.28 Conversão na síntese de oleato de frutose a 45 °C, 72 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:1 usando 0,25 g (○), 0,5 g (☆) e 1,0 g (●) de LPF-octil-sílica e 1:2 usando a 0,25 g (■), 0,5 g (◆) e 1,0 g (□) de CALB IM na presença do solvente terc-butanol. 119
Figura 4.29 Reuso das lipases na síntese do oleato de frutose a 45 °C, 48 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:1 e usando LPF-octil-sílica (■) e 1:2 usando CALB IM (●) na presença do solvente terc-butanol (0,5 g de derivado). Considerou-se rendimento da primeira batelada 100%. 120
Figura 4.30 Representação esquemática da forma de imobilização de LPF em suportes ativados com grupos glioxil em pH 8,5 ou 10,5, com ou sem Triton X-100. 123
Figura 4.31 Inibição irreversível dos derivados octil-agarose (■), glioxil-agarose-bi (●) e glioxil-agarose-mono (▲) com dietil-*p*-nitrofenilfosfato 126

Figura 4.32 Conversão da síntese enzimática de oleato de benzila via transesterificação do azeite de oliva com álcool benzílico. A reação foi realizada a 25°C, razão molar álcool:azeite de 1:2, com o solvente ciclohexano e os derivados de LPF octadecil-Sepabeads (▲), glioxil-Sepabeads-bi (■) e glioxil-Sepabeads-mono (●)..... 127
Figura 4.33 Estabilidade térmica a 65ºC, tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 dos derivados de LPF octadecil-Sepabeads (■), glioxil-Sepabeads-bi (●) e glioxil-Sepabeads-mono (▲). 128
Figura 4.34 Inativação dos derivados de LPF octadecil-Sepabeads (■), glioxil-Sepabeads-bi (●) e glioxil-Sepabeads-mono (▲) incubados em 100 % do solvente Ciclohexano, a 60°C. Em diferentes tempos estas amostras foram utilizadas na reação de transesterificação do azeite de oliva com álcool benzílico a 25°C..... 129
Figura 4.35 Inativação dos derivados de LPF octadecil-Sepabeads (■), glioxil-Sepabeads-bi (●) e glioxil-Sepabeads-mono (▲) incubados em 100 % do solvente 2-metil-2-butanol, a 60°C. Em diferentes tempos estas amostras foram utilizadas na reação de transesterificação do azeite de oliva com álcool benzílico a 25°C..... 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Parâmetros de imobilização de lipases. 41
Tabela 2.2 Transesterificação de óleos catalisada por lipases. 56
Tabela 2.3 Esterificação enzimática para produção de aromas. 60
Tabela 2.4 Síntese enzimática de ésteres graxos de açúcares. 63
Tabela 3.1 Condições de síntese de biodiesel por etanólise de óleo de soja. 81
Tabela 3.2 Condições de esterificação do ácido oleico. 83
Tabela 3.3 Condições de esterificação do ácido láurico. 84
Tabela 4.1 Características morfológicas e hidrofobicidade dos suportes utilizados neste trabalho. 86
Tabela 4.2 Resultados das imobilizações de LPF em XAD 7HP, octil-sílica e poliestireno a 25 °C, pH 7 (tampão fosfato de sódio 5 mM), 24 h. Carga oferecida igual a 5 mg de proteína/g de suporte. 89
Tabela 4.3 Parâmetros da isoterma de Langmuir ajustada aos dados experimentais de adsorção de LPF sobre octil-sílica (25ºC, pH 7,0, 24h). 93
Tabela 4.4 Tempo de meia-vida a 60°C, pH 7,0, da LPF solúvel e LPF-octil-sílica. 95
Tabela 4.5 Tempo de meia-vida de LPF solúvel e LPF-octil-sílica a 45°C, pH 8,0 e na presença de etanol (36%, v/v) 97
Tabela 4.6 Tempo de meia-vida a 40°C da LPF-octil-sílica na presença de óleo de soja e etanol (razão molar 1:7). 98
Tabela 4.7 Atividades hidrolíticas e de esterificação de lipases imobilizadas. 99
Tabela 4.8 Resultados de rendimento de imobilização (RI) e atividade recuperada (AR) de LPF imobilizada em suportes glioxil e hidrofóbicos. Carga oferecida: 5 mg de proteína/g de suporte. 124
Tabela 4.9 Hidrólise enantiosseletiva de (*R*,*S*)-2-hidróxi-4-fenilbutirato de etila (HPBE) a 25ºC, pH 7,5, e agitação de 150 rpm por 24 h. Meio reacional: 10 mL de solução 5 mM de (*R*,*S*)-HPBE em TFNa 25 mM e 0,5 de lipase imobilizada. 126

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 Principais classes de enzimas. 27
Quadro 2.2 Aplicações de lipases na indústria. 31
Quadro 2.3 Comparação entre os métodos de imobilização de lipases. 43
Quadro 2.4 Classificação dos suportes conforme a composição. 44
Quadro 2.5 Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção de biodiesel. 54

LISTA DE ABREVIATURAS

A_0	Atividade oferecida na imobilização
A_{EI}	Área do heptadecanoato de etila
A_f	Atividade não imobilizada
AH	Atividade hidrolítica do derivado
AR	Atividade recuperada
A_r	Atividade relativa
AS	Área superficial dos suportes
A_t	Atividade teoricamente imobilizada
At_0	Atividade do preparado enzimático comercial
At_f	Atividade final do sobrenadante
BrCN	Brometo de cianógeno
C*	Atividade no equilíbrio
CALB IM	Lipase de *Candida antárctica* B imobilizada
C_{Csob}	Concentração de corante no sobrenadante final
C_{EI}	Concentração do heptadecanoato de etila
CG	Cromatografia gasosa
CLEA	*Crosslinking enzyme aggregates*
D-*p*NP	Dietil-*p*-nitrofenilfosfato
DTG	Termogravimetria derivada
E	Enatiosseletividade
E/S	Razão enzimática/substrato
ee	Excesso enantiomérico
HPBE	(*R,S*) 2-hidróxi-4-fenilbutirato de etila
HPLC	*High performance liquid chromatography*
K_d	Constante de inativação térmica de primeira ordem
K_L	Constante de Langmuir
LPF	Lipase de *Pseudomonas fluorescens*
LPF IM	Lipases de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada
LTL IM	Lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada
m/v	Massa/Volume

$m_{pó}$	Massa de pó
m_S	Massa de suporte
PHB	Poli-hidróxibutirato
PM	Peneira molecular
p-NPB	Butirato de p-nitrofenila
q*	Atividade adsorvida no sólido
q_m	Capacidade máxima de adsorção teórica na monocamada
R	Rendimento de ésteres etílicos
RI	Rendimento de imobilização
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
t	Tempo
T	Temperatura
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
TG	Termogravimetria
TX	Triton X-100
V	Volume do filtrado
v/v	Volume/Volume
V_{EI}	Volume do heptadecanoato de etila
V_{sol}	Volume de solução de corante
α	Razão entre a atividade enzimática do estado final (A) e a atividade enzimática do estado inicial (A0)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 26
2.1 Enzimas 26
2.1.1 Classificação das Enzimas 26
2.1.2 Enzimas Hidrolíticas 28
2.2 Lipases 28
2.2.1 Reações Catalisadas por Lipases 29
2.3 Imobilização de Enzimas 31
2.3.1 Imobilização por Ligação Covalente 33
2.3.1.1 Imobilização por Ligação Covalente Multipontual 34
2.3.2 Imobilização via Adsorção 36
2.3.2.1 Isotermas de Adsorção 37
2.3.2.1.1 Isoterma Linear 37
2.3.2.1.2 Isoterma Langmuir 37
2.3.2.1.3 Isoterma Freundlich 38
2.4 Imobilização de Lipases 39
2.4.1 Vantagens e Desvantagens dos Métodos de Imobilização de Enzimas 41
2.4.2 Suportes para Imobilização 43
2.5 Aplicações de Lipases 48
2.5.1 Ésteres Alquílicos (Biodiesel) 48
2.5.1.1 Matérias-primas para Produção de Biodiesel 49
2.5.1.2 Produção de Biodiesel 50
2.5.1.2.1 Rota Química 51
2.5.1.2.2 Rota Enzimática 52
2.5.2 Ésteres Aromatizantes 58
2.5.3 Ésteres Graxos de Açúcares 61
2.5.4 Resolução de misturas racêmicas 64
3 MATERIAIS E MÉTODOS 66
3.1 Material 66
3.1.1 Enzimas 66
3.1.2 Suportes 66

3.1.3 Reagentes 66
3.2 Metodologia Experimental 67
3.2.1 Determinação de Proteínas 67
3.2.2 Determinação das Atividades Hidrolíticas 67
3.2.2.1 Hidrólise de Azeite de Oliva Emulsificado 67
3.2.2.2 Hidrólise de butirato de p-Nitrofenila (p-NPB) 68
3.2.3 Atividade de Esterificação (Síntese de Butirato de Butila) 68
3.2.4 Preparação e/ou ativação de Suportes 69
3.2.4.1 Preparação do Suporte Octil-Sílica 69
3.2.4.2 Preparação dos Suportes Poliestireno e Amberlite XAD 7HP 69
3.2.4.3 Ativação do Suporte Glioxil-Agarose 69
3.2.5 Imobilização de Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) 70
3.2.5.1 Imobilização em Octil-Sílica, Poliestireno e Amberlite XAD 7HP 70
3.2.5.2 Imobilização em BrCN-Agarose 70
3.2.5.3 Imobilização em Glioxil-Agarose e Glioxil-Sepabeads 71
3.2.5.4 Imobilização em Octil-Agarose e Octadecil-Sepabeads 71
3.2.6 Caracterização dos Suportes e Derivados (LPF Imobilizada) 73
3.2.6.1 Determinação da Área Superficial - Método de B.E.T. 73
3.2.6.2 Análise Termogravimétrica 73
3.2.6.3 Determinação da Umidade 73
3.2.6.4 Determinação da Hidrofobicidade 73
3.2.6.5 Testes de Carregamento 74
3.2.6.6 Ajuste da Isoterma de Langmuir aos Dados Experimentais de Adsorção 74
3.2.6.7 Estabilidade Térmica (Estimativa do Tempo de Meia-Vida) 75
3.2.6.8 Estabilidade Operacional (Reuso) 77
3.2.6.9 Teste de Adsorção do Glicerol no Derivado LPF-Octil-Sílica 78
3.2.7 Eletroforese 78
3.2.8 Aplicações de Lipases Imobilizadas 79
3.2.8.1 Síntese do Oleato de Etila 79
3.2.8.2 Síntese de Oleato de Benzila 79
3.2.8.3 Síntese de Biodiesel 80
3.2.8.4 Síntese de Ésteres Aromatizantes 82
3.2.8.5 Síntese de Ésteres de Açúcares 82

3.2.8.6 Hidrólise de 2-Hidróxi-4-Fenilbutirato de Etila (HPBE) 84
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 85
4.1 Caracterização do suporte 85
4.1.1 Características Morfológicas e Hidrofobicidade dos suportes 85
4.1.2 Análise Termogravimétrica 87
4.2 Imobilização da LPF 88
4.3 Eletroforese 90
4.4 Carregamento de Octil-Sílica e Ajuste de Isoterma de Adsorção 92
4.5 Estabilidade Térmica da LPF (Estimativa do Tempo de Meia-Vida) 94
4.6 Estabilidade Térmica da LPF na Presença de Etanol 96
4.7 Estabilidade Térmica do Derivado de LPF-Octil-Sílica nas Condições de Síntese de Biodiesel 97
4.8 Atividades de Esterificação e Hidrólise de Lipases Imobilizadas 99
4.9 Síntese do Oleato de Etila 100
4.10 Síntese de Biodiesel 102
4.10.1 Ensaios de Adsorção de Glicerol no Biocatalisador LPF-Octil-Sílica 105
4.10.2 Estabilidade Operacional (Reuso) do derivado LPF-octil-sílica na síntese de biodiesel 106
4.11 Sínteses de Ésteres Aromatizantes 107
4.11.1 Síntese de Butirato de Butila – Acompanhamento da Reação por Cromatografia Gasosa e Titulação 111
4.11.2 Estabilidade Operacional (Reuso) dos Derivados na Síntese de Butirato de Butila 112
4.12 Ésteres de Açúcares 113
4.12.1 Estabilidade Operacional (Reuso) dos Derivados na Síntese do Oleato de Frutose 120
4.13 Preparação de Derivados de LPF para Aplicação em Hidrólise Enantiosseletiva 121
4.13.1 Imobilização de LPF em Suportes Ativados com Grupos Glioxil 122
4.13.2 Imobilização de LPF em BrCN-Agarose 123
4.13.3 Imobilização de LPF por Adsorção em Suportes Hidrofóbicos 124
4.14 Modificação da LPF Imobilizada com Inibidor Irreversível 125
4.15 Hidrólise enantiosseletiva de (*R,S*)-2-hidróxi-4-fenilbutirato de etila (HPBE) 126
4.16 Transesterificação Enzimática de Óleo de Oliva e Álcool Benzílico 127
4.17 Estabilidade dos Derivados de LPF-Sepabeads 128
4.17.1 Estabilidade Térmica 128

4.17.2 Estabilidade Térmica em Solventes Orgânicos 128
5 CONCLUSÕES 130
6 SUGESTÕES 133
7 REFERÊNCIAS 134
APÊNDICE A 151

1 INTRODUÇÃO

Um dos objetivos da indústria química atual é o desenvolvimento de processos e produtos sustentáveis. Para que os produtos finais atendam a esta necessidade, os insumos básicos da cadeia produtiva são cada vez mais específicos. Tendo em vista este panorama, o uso de enzimas como catalisadores apresenta-se como uma alternativa à química industrial clássica, devido não só à sua seletividade, mas também a sua alta atividade catalítica em condições mais brandas de pressão, temperatura, entre outras.

As lipases, ao contrário de boa parte das enzimas, apresentam o potencial de catalisar diferentes reações com diferentes substratos, tornando-a um biocatalisador versátil, com diversas aplicações industriais. Porém, o custo das lipases ainda é o principal obstáculo em relação à exploração total de seu potencial.

O reuso da lipase, assim como de qualquer enzima, é essencial do ponto de vista econômico, o que pode ser atingido através do uso de lipases imobilizadas. A escolha de uma metodologia adequada de imobilização onde se obtenha um derivado imobilizado altamente estável, ativo e seletivo e que permita o seu reuso, é uma das principais chaves para a aplicação de enzimas a nível industrial.

Alguns exemplos de ramos da indústria que podem se beneficiar com o uso economicamente viável de lipases imobilizadas são: a indústria alimentícia, com a exigência de mercado por produtos e aditivos alimentares naturais e menos nocivos à saúde; e a de combustíveis e lubrificantes, com a necessidade de redução de poluentes, principalmente de emissão de gases que causam o efeito estufa.

Quanto à produção de combustíveis, as lipases podem ser uma alternativa ao processo atual de produção de biodiesel, um combustível produzido a partir de biomassa (óleos vegetais e gorduras animais), sendo uma excelente alternativa para substituição ao óleo diesel, reduzindo a dependência em relação ao petróleo (FERRARI, OLIVEIRA e SCABIO, 2005). Schuchardt, Sercheli e Vargas (1998) relatam que a utilização dos óleos vegetais no Brasil tem um futuro promissor, uma vez que o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de soja e possui grandes perspectivas para a produção de outras sementes. Além disso, a produção do biocombustível fortalece o agronegócio e cria um novo mercado para óleos vegetais, podendo se tornar um apoio às políticas governamentais na área social e ambiental.

A rota tecnológica mais utilizada para a produção do biodiesel tem sido a catálise alcalina homogênea, porém neste método convencional a remoção destes catalisadores do produto final requer uma grande quantidade de água de lavagem, além disso, o emprego de hidróxido de sódio e potássio exige matéria-prima de baixa acidez para evitar a formação de sabão (SILVA *et al*., 2008).

Diante disso, o processo de produção de biodiesel utilizando enzimas elimina as desvantagens do processo alcalino pelo fato de não necessitar de uma etapa de neutralização para remoção dos catalisadores, da possibilidade de reutilização do biocatalisador no processo, além do fato de que ao final do processo de transesterificação do óleo obtém-se biodiesel e glicerina puros (MOREIRA *et al.*, 2007; SILVA *et al*., 2008).

Quanto à produção de aditivos alimentares, as lipases catalisam a reação de síntese de ésteres utilizados como aromatizantes ou surfactantes, dentre outros. A principal vantagem do uso de lipases na produção destes aditivos, em alternativa a processos químicos clássicos, é o fato de os produtos finais serem considerados de origem natural, o que aumenta seu valor de mercado (ABBAS e COMEAU, 2003). Exemplos de aromatizantes que podem ser produzidos por lipases são os ésteres de cadeia curta, que apresentam aromas de frutas: o acetato de butila apresenta aroma de morango; o acetato de hexila, de frutado; o acetato de isoamila, de banana; o butirato de butila, de abacaxi; o butirato de etila, de abacaxi.

Os ésteres graxos de açúcares, por sua vez, são utilizados como biossurfactantes. Surfactantes são moléculas que apresentam caráter hidrofílico e hidrofóbico. Quando presentes em misturas de solventes de diferentes polaridades, os surfactantes reduzem a tensão superficial e auxiliam na formação de emulsões. Da mesma forma que os demais aditivos alimentares não sintéticos, o uso de biossurfactantes faz com que o produto possa ser considerado natural, tornando o produto mais atrativo ao consumidor (GUMEL *et al.*, 2011).

Os ésteres oleatos de etila, podem ser utilizados como plastificantes, lubrificantes, aditivos biológicos e fluidos hidráulicos (HAZARIKA *et al.*, 2002). Outra aplicação deste éster foi reportada por Doymaz (2004) e Lewicki (2006), na desidratação osmótica de tomates e pimentões, promovendo a perda de água e consequentemente, induzindo um aumento no teor de açúcar, bem como a conferir-lhes uma cor luminosa.

Lipases também podem ser usadas para a resolução de misturas racêmicas, isto é, as lipases interagem seletivamente com um dos enantiômeros, tornando possível a

sua separação em etapas posteriores. Esta separação tem importantes aplicações em que somente um dos enantiômeros é necessário, tais como na indústria farmacêutica e de química fina.

Tendo em conta a versatilidade das lipases e o ganho econômico com sua imobilização, o objetivo deste trabalho foi estudar a síntese enzimática de ésteres catalisada por derivados de lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) obtidos pela imobilização da enzima em diferentes suportes e por distintos métodos, comparando esses derivados com aqueles disponíveis comercialmente. Para o cumprimento deste objetivo, as seguintes etapas foram realizadas:

- Preparação de suportes hidrofóbicos: octil-sílica, octil-agarose e octadecil-Sepabeads;
- Imobilização de LPF por adsorção hidrofóbica interfacial e ligação covalente em diferentes suportes;
- Caracterização dos biocatalisadores preparados quanto à atividade hidrolítica e estabilidade térmica em meio orgânico;
- Preparação de ésteres de cadeias longas (biodiesel etílico de óleo de babaçu e soja, oleato de etila e oleato de benzila) e curtas (butirato de butila e etila, acetato de isoamila, hexila e butila) em solventes orgânicos;
- Preparação de ésteres graxos de açúcares (oleatos e lauratos de frutose e lactose) em meio orgânico.
- Hidrólise enantiosseletiva de um éster quiral (2-hidroxi-4-fenilbutirato de etila).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

Enzimas são proteínas altamente especializadas, sintetizadas por células vivas, e como todas as proteínas são heteropolímeros de vinte diferentes aminoácidos, algumas incluem na sua estrutura um componente não proteico, denominado grupo *prostético*. São macromoléculas com massa molecular variando entre 5 até mais de 1000 kDa (BORZANI *et al.*, 2001).

As enzimas são catalisadores biológicos que facilitam a conversão de um substrato em um produto, pelo fornecimento de condições que diminuam a energia de ativação da reação. Estes biocatalisadores, por sua vez, podem ser proteínas ou glicoproteínas, e consistem de pelo menos uma parte polipeptídica (MIKKELSEN e CORTON, 2004).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações, destacando-se o uso na indústria químico-farmacêutica e alimentícia. Estas proteínas são catalisadores versáteis, existindo em geral um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (FABER, 1997).

O grande interesse no uso das enzimas pode ser explicado por fatores como: a variedade de substratos sobre os quais as enzimas atuam, as reações complexas que as enzimas são capazes de catalisar em rotas onde a geração de resíduos e subprodutos são reduzidos e a capacidade que as mesmas têm de atuar como catalisadores a altas velocidades em condições reduzidas de energia (AEHLE, 2004).

2.1.1 Classificação das Enzimas

A classificação das enzimas foi organizada pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), dividindo as enzimas em seis grandes classes (Quadro 2.1), e cada uma em subclasses de acordo com o tipo de reação química que as mesmas catalisam.

Quadro 2.1 Principais classes de enzimas.

	Tipo da reação	**Subclasse**
Oxidoredutases	Reações de oxidação e redução de ligações do tipo C-H, C-C e C=C	Hidrogenases, oxidases, peroxidases, etc.
Transferases	Transferências de grupos aldeídico, cetônico, acila, fosforila ou metila	Transaldolases, transcetolases, etc.
Hidrolases	Hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos e glicosídeos	Esterases, lipases, peptidases, fosfatases, etc.
Liases	Adição-eliminação de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Descarboxilases, cetoácidoliases, hidroliases
Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isomêros	Racemases, epimerases, etc.
Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O e C-N e ésteres de fosfato	Sintetases

Fonte: Adaptado de Kennedy, 1987.

A cada enzima foi atribuído um número de classificação de quatro dígitos, que identifica o tipo de reação por ela catalisada. As enzimas utilizadas neste trabalho são classificadas como E.C 3.1.1.3 (lipases ou glicerol éster hidrolases), em que a abreviatura E.C. significa *Enzyme Commission*; o primeiro número (3) designa a qual classe a enzima pertence (hidrolases); o segundo número (1), a subclasse (atua sobre ligações éster); o terceiro número (1), a subclasse (carboxil éster hidrolase) e o quarto número (3) é o número de série dentro da subclasse e significa que a enzima atua sobre triacilglicerídeos (LEHNINGER *et al.*, 2002).

2.1.2 Enzimas Hidrolíticas

Enzimas hidrolíticas são as enzimas que catalisam a reação de hidrólise de uma ligação química (LEHNINGER *et al.*, 2002). Atualmente, as enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas nos processos industriais, sendo aplicadas na degradação de várias substâncias naturais. De um modo geral, elas são usadas em grande escala nas indústrias têxteis (amilase, celulase, pectinase, oxidorredutase), de detergentes (celulase, lipase, protease, oxidorredutase), alimentícia (celulase, lactase, lipase, pectinase, protease, oxidorredutase), de papel (lipase, oxidorredutase, xilanase), e de couro (lipase, protease) (KIRK, BORCHERT e FUGLSANG, 2002).

As lipases pertencem a esta classe de enzimas, cuja importância no setor industrial tem-se destacado nas últimas décadas. Devido à sua grande versatilidade catalítica, as lipases têm sido utilizadas na hidrólise de óleos e gorduras, produção de ácidos graxos e aditivos alimentícios, síntese de ésteres e de peptídeos, resolução racêmica e formulação de detergentes (ERICSSON *et al*., 2008).

2.2 Lipases

Lipases (triacilglicerol éster hidrolase, E C 3.1.1.3), abrangem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam tanto em meio aquoso (hidrólise de óleos e gorduras, com a liberação de ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol) como em meio orgânico (esterificação e transesterificação em meios com teor de água restrito).

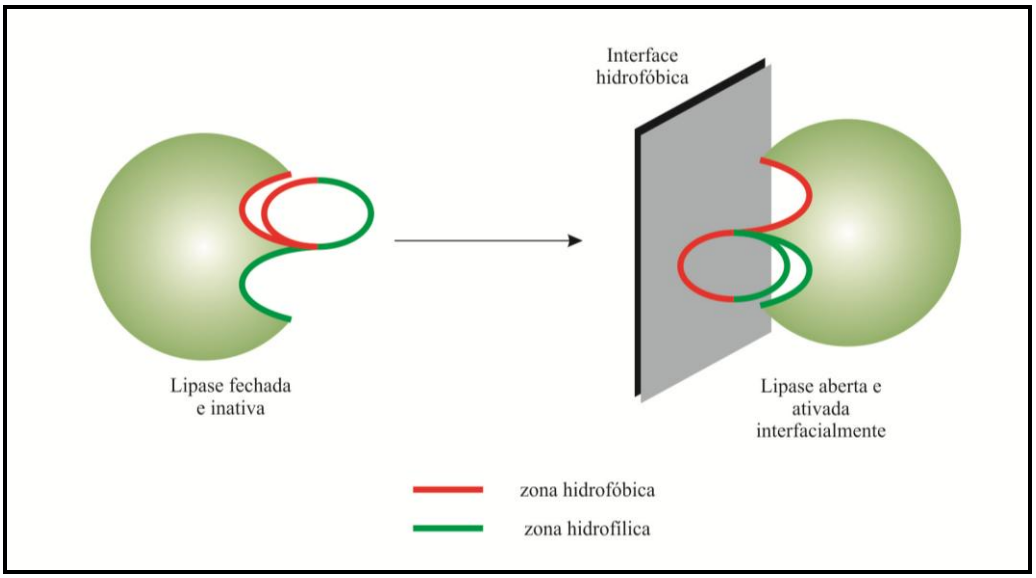
As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (bactérias e fungos) ou vegetal, com propriedades catalíticas diferenciadas de acordo com sua origem. Entretanto, as lipases microbianas são as mais utilizadas e, na sua grande maioria, não são nocivas à saúde humana (CARVALHO *et al.*, 2005; ERICSSON *et al.*, 2008; CÔTÉ e SHARECK, 2008).

As lipases apresentam um mecanismo de atuação característico; seu sítio ativo é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina, os quais também são encontrados em serina proteases (JAEGER e REETZ, 1998; REIS *et al.*, 2009).

Lipases, na ausência de interfaces hidrofóbicas, tornam seus sítios ativos inacessíveis, protegendo-os com uma espécie de "tampa" hidrofóbica (cadeia polipeptídica

helicoidal). Entretanto, a lipase pode se apresentar em duas diferentes conformações (Figura 2.1) (BRADY *et al.*, 1990; REIS *et al.*, 2009). Na primeira conformação o sítio ativo da enzima está fechado pela tampa polipeptídica que isola o sítio ativo do meio (nesta conformação a lipase é considerada inativa). Na segunda conformação, a enzima torna-se ativa em contato com uma interface hidrofóbica, ocorrendo assim a abertura da tampa polipeptídica. A abertura da tampa consiste em uma reestruturação conformacional da lipase que cria uma região nucleofílica (a desprotonação da serina ocasiona a formação de oxiânios, nucleófilos que atacam ligações ésteres) em torno do resíduo serina a tampa helicoidal vira-se para trás encobrindo seu lado hidrofílico em uma cavidade polar, antes preenchida com molécula de água, e expondo totalmente o lado hidrofóbico da tampa. Essa exposição faz com que a superfície apolar em torno do sítio ativo seja expandida acomodando assim o estado de transição tetraédrico (PAIVA, BALCÃO e MALCATA, 2000).

Figura 2.1 Ativação interfacial de lipases em suportes hidrofóbicos.

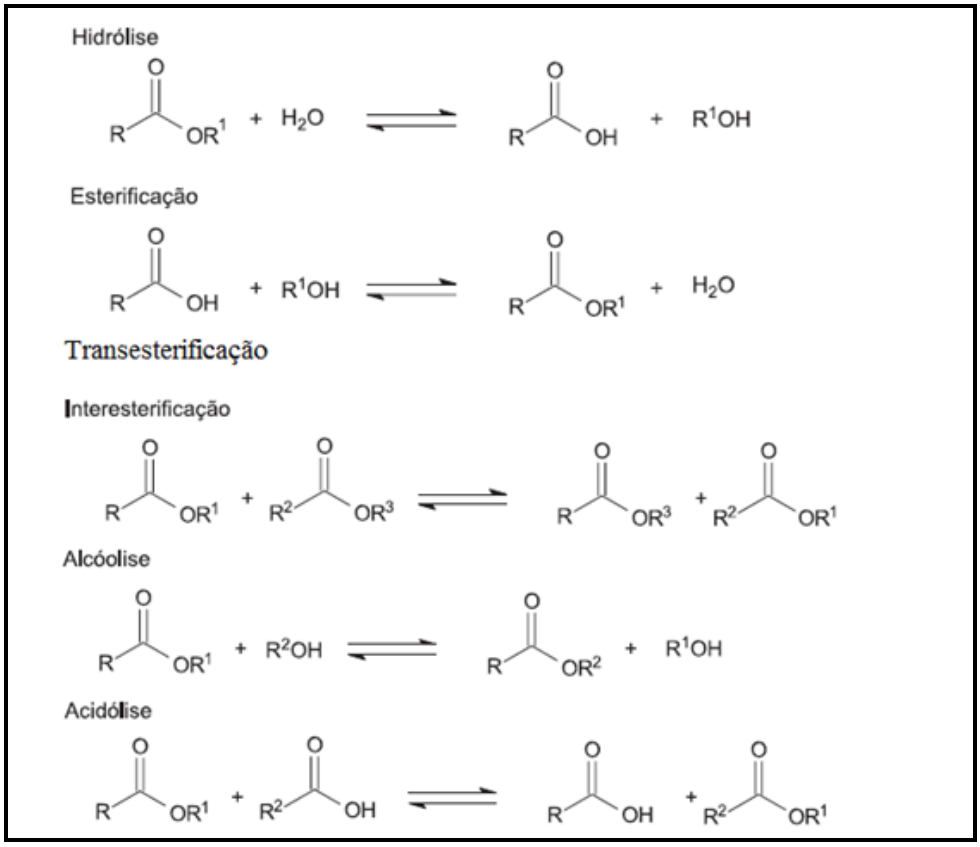


Fonte: Adaptado de Palomo *et al.*, 2002.

2.2.1 Reações Catalisadas por Lipases

As lipases além de catalisarem reações de hidrólise, também são capazes de catalisar reações de esterificação e transesterificação (interesterificação, alcoólise e acidólise) (CARVALHO *et al.*, 2003; CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004). A Figura 2.2 apresenta algumas reações catalisadas por lipases.

Figura 2.2 Reações catalisadas por lipases.



Fonte: Adaptado de Paques e Macedo, 2006.

Tongboriboon, Cheirsilp e H-Kittikun (2010) utilizaram óleo de palma e etanol como substrato e compararam as atividades catalíticas de hidrólise, transesterificação e esterificação das seguintes lipases: *Pseudomonas fluorescens* (lipases AK), *Pseudomonas cepacia* (lipases PS), *Candida rugosa* (lipase AY), *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) e *Candida antarctica* (Novozym 435). A lipase AY apresentou maior atividade de hidrólise, enquanto as lipases AK e Novozym 435 mostraram maiores atividades de transesterificação e esterificação, respectivamente.

A habilidade das lipases para realizar biotransformações altamente específicas vem tornando-as populares em indústrias de alimentos, detergentes, cosméticos, síntese orgânica e farmacêutica (SHARMA, CHISTI, BANERJEE, 2001; HASAN, SHAH e HAMEED, 2009; SHU *et al*., 2010).

O Quadro 2.2 apresenta algumas aplicações das lipases nos diferentes setores industriais.

Quadro 2.2 Aplicações de lipases na indústria.

Área industrial	**Aplicação**	**Produto**
Alimentação	Hidrólise de gorduras de leite Síntese de ésteres	Aromas para alimentos e bebidas
Química	Hidrólise de óleo e gorduras Remoção de gorduras/manchas Síntese de ésteres	Ácidos graxos, diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos Detergentes para uso doméstico Ésteres, emulsificantes
Alimentação/Química /Farmacêutica	Transesterificação de óleos naturais	Óleos e gorduras (análogo de manteiga de cacau)
Cosméticos	Síntese de ésteres	Fragância para perfumes
Médicina	Ensaios de triglicerídeos no sangue	Kits de diagnósticos

Fonte: Adaptado de Villeneuve *et al.*, 2000; Paques e Macedo, 2006.

O uso de lipases comerciais livres, não imobilizadas, resulta em dificuldades técnicas, sendo praticamente impossível a sua recuperação e reuso o que incrementa os custos econômicos do processo. Para a superação destas dificuldades apresentadas na utilização das lipases livres, tem-se proposto à utilização dessas enzimas na sua forma imobilizada, visando maior estabilidade reacional e permitindo o reuso desses biocatalisadores, reduzindo custos e ainda melhorando a qualidade do produto obtido (TAN *et al.*, 2010).

2.3 Imobilização de Enzimas

O uso de enzimas imobilizadas na indústria está cada vez mais viável e presente. Indústrias têxteis, alimentícias, farmacêuticas, dentre outras, são as principais pioneiras na utilização de enzimas imobilizadas (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004). As técnicas de imobilização de enzimas ficaram mais conhecidas a partir dos anos 60 (BORZANI *et al*., 2001) e desde então tem-se estudado a imobilização de enzimas em diferentes suportes e por diferentes métodos (SALIS *et al.*, 2009;

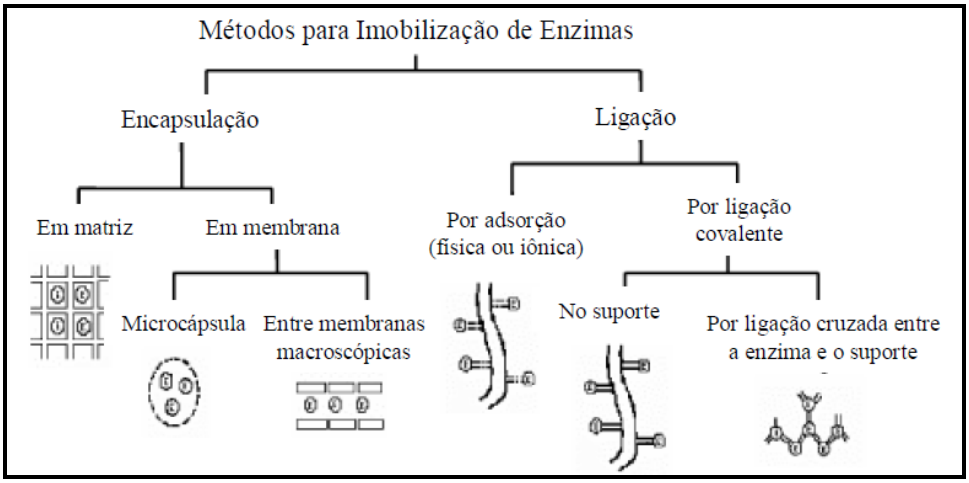
RODRIGUES, *et al.*, 2010; MENDES, *et al.*, 2011a; LIMA, *et al.*, 2013; MENDES, *et al.*, 2013), visando, principalmente, a reutilização das enzimas, facilidade na separação dos produtos e aumento da estabilidade em solventes orgânicos (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

Segundo Villeneuve *et al.* (2000), apesar da alta atividade catalítica das enzimas, a aplicação industrial destas é limitada pelo alto custo e estabilidade nas condições reacionais. Para minimizar esses inconvenientes e aumentar a vida útil do biocatalisador, são empregadas algumas técnicas como a modificação química da enzima, a imobilização enzimática e a engenharia proteica e genética.

Em solução, moléculas de enzimas solúveis comportam-se como qualquer outro soluto, sendo facilmente dispersas em solução e possuindo total liberdade de movimento (BICKERSTAFF, 1995). Imobilização enzimática é uma técnica especificamente desenvolvida para restringir fortemente a liberdade de movimento de uma enzima, com retenção de sua atividade catalítica (KENNEDY, 1987; BICKERSTAFF, 1997; CARVALHO, CANILHA e SILVA, 2006). Com isso, os biocatalisadores podem ser utilizados repetidamente em bioprocessos que utilizam diferentes configurações de reatores (bateladas, semicontínuos ou contínuos).

De acordo com a utilização e fins específicos, métodos diferentes de imobilização podem ser empregados, tais como, adsorção ou ligação covalente da enzima em um material insolúvel, entrecruzamento das moléculas de enzimas com um reagente multifuncional, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (KENNEDY, 1987; DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004). A Figura 2.3 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas.

Figura 2.3 Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi, 2004.

Neste trabalho, os métodos de imobilizações utilizados foram adsorção hidrofóbica e ligação covalente. As principais características destes métodos são relatadas a seguir.

2.3.1 Imobilização por Ligação Covalente

Na imobilização por ligação covalente, a enzima é ligada ao suporte por ligações químicas covalentes ou por ligações cruzadas, que são normalmente estabelecidas entre os grupos amino ($-NH_2$), hidroxilas (-OH), tiol (-SH), etc. dos resíduos de aminoácidos e os grupos reativos do suporte (KENNEDY, 1987; DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO E SOLDI, 2004).

A imobilização por ligação covalente é realizada em duas etapas. Na primeira o suporte é tratado com um reagente capaz de ativar seus grupos funcionais. Após a remoção do excesso de ativador, o suporte e a enzima são mantidos em contato. A mistura é mantida sob condições brandas de temperatura por um dado tempo, a fim de que as ligações covalentes entre o suporte e a enzima se estabeleçam.

A força desta ligação é elevada e normalmente envolve vários resíduos da enzima, proporcionando uma grande rigidez à sua estrutura. Esta rigidez pode manter inalterada a estrutura da enzima perante qualquer agente desnaturante como calor, solventes orgânicos, pHs extremos e outros, fazendo com que o biocatalisador imobilizado

seja mais eficiente em processos industriais que o biocatalisador livre (MATEO *et al.,* 2007; MACARIO *et al.,* 2009).

A imobilização de enzimas em suportes com grupos epóxidos por ligação covalente é uma técnica bastante utilizada. Dentre os principais suportes pode-se destacar os polímeros acrílicos particulados ativados com grupos epóxidos, Eupergit e Sepabeads. Devido à sua fácil disposição para comercialização, estes suportes são almejáveis para a imobilização de enzimas em escala industrial, por possuírem resistência a estresse químico e mecânico, e processos específicos realizados em reatores (KNEZEVIC *et al.,* 2006). Várias pesquisas científicas têm sido realizadas com imobilização de lipases em suportes epóxi-ativados (MATEO *et al.,* 2000; MATEO *et al.,* 2003; BAYRAMOGLU, KAYA e ARICA, 2005; LEE *et al.,* 2006).

2.3.1.1 Imobilização por Ligação Covalente Multipontual

Este método baseia-se na formação de ligações covalentes entre os grupos reativos da enzima e os grupos reativos do suporte. A ligação de uma molécula de enzima a um suporte sólido por meio de várias ligações químicas fortes torna a estrutura terciária da molécula de enzima mais rígida e, portanto, mais resistente ao desdobramento. Assim, a enzima quimicamente ligada ao suporte, comparada à enzima solúvel, será mais resistente à inativação térmica (KLIBANOV, 1983; MOZHAEV *et al*., 1990).

Guisán (1988) propôs um sistema de imobilização onde a enzima, através de seus grupos aminos, liga-se a uma densa monocamada de grupos aldeídos alifáticos e lineares (glioxil) moderadamente afastados da superfície do suporte (braço espaçador curto). Este processo tem sido muito utilizado na imobilização e estabilização de diferentes enzimas em suportes sólidos (MATEO *et al.,* 2007; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.,* 2008; RODRIGUES, *et al.*, 2008; MENDES, *et al.,* 2011b; LIMA, *et al*., 2013).

Esta técnica de imobilização permite controlar a área da enzima envolvida no processo de imobilização, o comprimento do braço espaçador através do qual a enzima se liga ao suporte sólido, o número de ligações que se formam entre cada molécula de enzima imobilizada e o suporte, entre outros fatores (LÓPEZ-GALLEGO *et al.,* 2005; BETANCOR *et al.*, 2006; MATEO *et al.*, 2007).

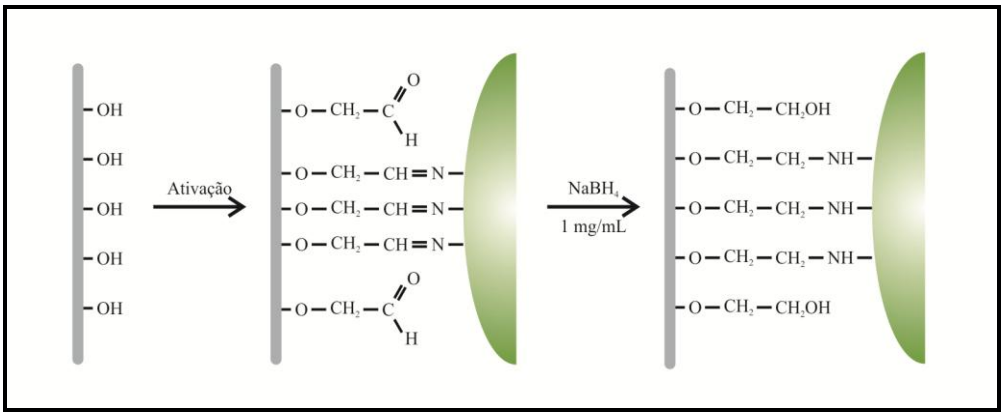
A distância entre todos os resíduos envolvidos na imobilização multipontual deve ser muito pequena, para que o maior número possível de resíduos de amonoácidos da

enzima reaja com o suporte, obtendo-se uma união muito intensa entre enzima e suporte. Com isso, reduz as mudanças conformacionais envolvidas na inativação da enzima e aumenta consideravelmente a sua estabilidade (MATEO *et al.*, 2007).

O suporte deve apresentar alta densidade superficial de grupos reativos, os quais devem reagir com os grupos localizados na superfície da enzima (MATEO *et al.*, 2007). Dentre os principais suportes empregados para a imobilização multipontual de enzimas, encontram-se os suportes ativados com grupos glioxil. A imobilização nestes suportes se dá através da ligação entre os grupos aldeídos (glioxil) do suporte e os grupos aminos primários presentes na superfície da enzima.

A ligação entre os grupos aldeídos e aminos ocorre através da formação de uma base de Schiff. A pH 7,0, o único grupo amino reativo na superfície da enzima é o amino terminal, pois os outros grupos aminos estão na forma ionizada e não reagem com o suporte. Em pH alcalino, as lisinas presentes nas enzimas não mais se encontram em sua forma ionizada, podendo reagir com o suporte. Normalmente, as enzimas apresentam várias lisinas em sua superfície, então ocorre a união multipontual da enzima ao suporte. Por fim, é feita a redução com borohidreto de sódio, para que os grupos aldeídos que não reagiram sejam reduzidos a hidroxilas inertes e as bases de Schiff sejam reduzidas a ligações covalentes simples e estáveis (BLANCO e GUISÁN, 1989). A Figura 2.4 mostra como ocorre a imobilização covalente multipontual em suportes ativados com grupos glioxil.

Figura 2.4 Imobilização covalente multipontual em suporte ativado.



Fonte: Adaptado de Palomo *et al.*, 2004.

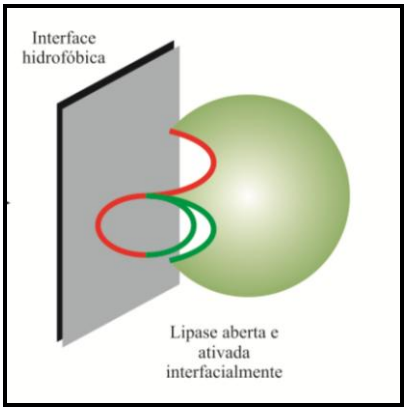
2.3.2 Imobilização via Adsorção

Imobilização por adsorção é o método mais simples e envolve interações superficiais reversíveis entre a enzima e o suporte. As forças envolvidas são majoritariamente eletrostáticas, tais como, forças de van der Waals, iônicas e ligações de hidrogênio, apesar de que as ligações hidrofóbicas podem ser significativas (BICKERSTAFF, 1997; SECUNDO, *et al.,* 2008). Essas interações são muito fracas, mas em grandes números são suficientemente razoáveis. Este tipo de imobilização causa uma pequena modificação na estrutura nativa da enzima se comparado aos outros tipos de imobilização, e por isso, geralmente não promove perda da atividade catalítica (VINU, MIYAHARA e ARIGA, 2005). Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de certas propriedades, tais como, força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção da enzima e custo (VILLENEUVE *et al*., 2000). O procedimento de imobilização por adsorção consiste numa simples mistura do componente biológico e do suporte com propriedades de adsorção, mantida sob condições suaves de pH e força iônica por determinado período de incubação, seguido por coleta do material imobilizado e lavagem com água ou tampão para remoção dos componentes biológicos não ligados.

O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que na maioria das vezes é na superfície, dependem de vários parâmetros, tais como, tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, sobretudo, da porosidade e tamanho dos poros (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

Particularmente, as lipases podem ser fortemente adsorvidas em superfícies altamente hidrofóbicas em um meio de baixa força iônica, possibilitando em uma só etapa a imobilização, a purificação (somente lipases são adsorvidas), a ativação (lipase é imobilizada com a "tampa" aberta) e a estabilização da enzima (PALOMO *et al*., 2002; BASTIDA *et al.*, 1998). A Figura 2.5 mostra a imobilização por adsorção hidrofóbica interfacial.

Figura 2.5 Imobilização por adsorção hidrofóbica interfacial.



Fonte: Adaptado de Palomo *et al.*, 2002.

2.3.2.1 Isotermas de Adsorção

Existem vários modelos que descrevem as isotermas de adsorção e dentre estes, os mais conhecidos são: linear, Langmuir e Freundlich.

2.3.2.1.1 Isoterma Linear

Na adsorção de um soluto sobre uma superfície uniforme, em que as concentrações de soluto são baixas e uma molécula está isolada da molécula vizinha, a relação de equilíbrio entre as concentrações da fase fluida e da fase adsorvida será linear (RUTHVEN, 1984). O modelo de isoterma mais simples é o da adsorção linear ou partição constante que é descrito pela Equação 2.1 (SLEJKO, 1985).

$$q^* = KC^* \tag{2.1}$$

onde q^* é a quantidade de soluto adsorvido por quantidade de adsorvente, C^* é a concentração de soluto em solução e K é a constante de equilíbrio.

2.3.2.1.2 Isoterma Langmuir

O modelo baseia-se na hipótese de movimento das moléculas adsorvidas pela superfície do adsorvente, de maneira que, à medida que mais moléculas são

adsorvidas, há uma distribuição uniforme formando uma monocamada que recobre toda a superfície (AMUDA, GIWA e BELLO, 2007).

O modelo de Langmuir utiliza o conceito do equilíbrio de adsorção que estabelece a igualdade nas velocidades de adsorção e dessorção. São utilizadas as seguintes hipóteses: a adsorção é monomolecular, a superfície é energeticamente homogênea e não existe interação entre as partículas adsorvidas (RADHIKA e PALANIVELU, 2006).

A expressão para a isoterma de Langmuir é dada pela Equação 2.2 (SLEJKO, 1985).

$$q^* = \frac{q_m C^*}{K_L + C^*} \tag{2.2}$$

onde q^* é a atividade adsorvida no sólido (U_{azeite}/g), K_L é a constante de Langmuir (U_{azeite}/mL), q_m é a capacidade máxima de adsorção teórica na monocamada (U_{azeite}/g) e C^* é a atividade no equilíbrio (U_{azeite}/mL).

2.3.2.1.3 Isoterma Freundlich

Esta isoterma corresponde à adsorção em sítios não uniformes. Neste caso, o calor de adsorção diminui com o aumento da cobertura na superfície. A falta de uniformidade pode existir nos diferentes sítios de adsorção ou ser causada pelas forças repulsivas entre átomos ou moléculas adsorvidas. No caso da ligação entre a superfície e o adsorbato ser parcialmente iônica, as repulsões podem se tornar grandes, diminuindo o calor de adsorção em coberturas mais elevadas.

A expressão para a isoterma de Freundlich é dada pela Equação 2.3 (SLEJKO, 1985).

$$q^* = K_F C^{*n} \tag{2.3}$$

onde K_F é a constante de equilíbrio de Freundlich e n é um índice desta isoterma.

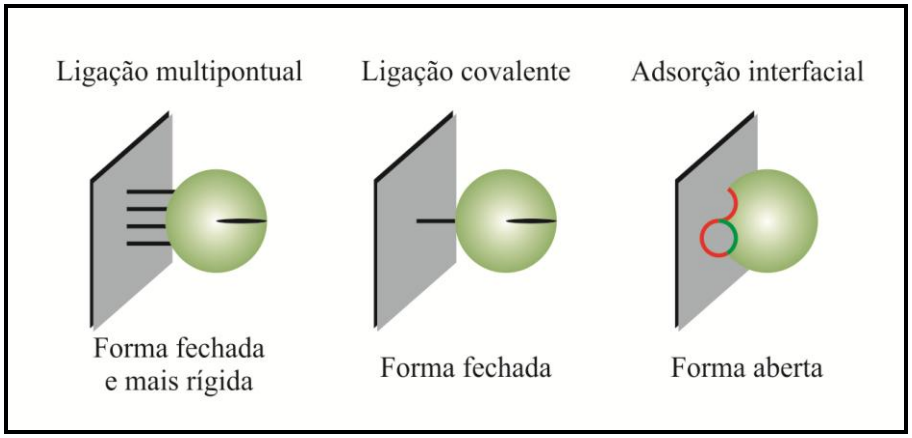
As dimensões de K_F dependem do valor de n; se a adsorção é favorável, então $n < 1$; se esta é desfavorável, então $n > 1$ (BELTER, CUSLLER e WEI-SHOU, 1988).

2.4 Imobilização de Lipases

Dentre os métodos de imobilização disponíveis, a adsorção é o mais utilizado para as lipases, devido à grande porção hidrofóbica destas enzimas próxima ao sítio ativo, à facilidade e simplicidade na metodologia, e por ser economicamente mais viável e menos agressivo em relação à atividade enzimática. No caso de lipases, verificou-se que o processo de imobilização por interação hidrofóbica pode propiciar uma ativação da enzima e um aumento de sua estabilidade frente à temperatura (SECUNDO *et al*., 2008; KNEZEVIC *et al*., 2002). A Figura 2.6 representa de maneira esquemática as diferentes conformações que são assumidas por lipases em função da técnica de imobilização empregada.

Os suportes mais reportados para imobilização de lipases podem ser divididos em duas categorias, matrizes hidrofóbicas e matrizes hidrofílicas com ligantes hidrofóbicos. Lipases usadas industrialmente são imobilizadas em suportes sólidos e estáveis, pertencentes a uma destas categorias (PETKAR, *et al.*, 2006). Como exemplos, podem-se citar as lipases de *Candida antarctica* B e *Rhizomucor miehei* imobilizadas em polipropileno (Accurel EP 100) e lipases de *Rhizomucor miehei* e de *Thermomyces lanuginosus*, ambas da Novozymes, imobilizadas sobre resina de troca iônica e sílica gel, respectivamente (SOUMANOU e BORNSCHEUER, 2003). Outros suportes como celite, octil-sílica, dentre outros também são comumente utilizadas para imobilização de lipases (BLANCO *et al.*, 2004; PETKAR *et al.*, 2006).

Figura 2.6 Comparação entre as formas de lipases após diferentes processos de imobilização.



Fonte: Adaptado de Palomo *et al.*, 2002.

A Tabela 2.1 lista alguns métodos e parâmetros de imobilização de lipases, tais como rendimento de imobilização (RI) e atividade recuperada (AR).

De acordo com a Tabela 2.1 podemos observar que no método de imobilização por adsorção é comum observar o fenômeno de ativação interfacial de lipases na presença de superfícies hidrofóbicas de suportes (AL-DURI *et al.*, 1995; PALOMO *et al.*, 2002). A natureza hidrofóbica do suporte permite a hiperativação da enzima, com a imobilização na conformação aberta (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2008). Já na imobilização por ligação covalente multipontual observa-se que há uma redução na atividade recuperada da enzima, pois a formação excessiva de ligações covalentes pode causar inativação da enzima imobilizada por distorção da estrutura tridimensional da enzima.

Tabela 2.1 Parâmetros de imobilização de lipases.

Lipase	**Suporte**	**Método de Imobilização**	**RI (%)**	**AR (%)**	**Referência**
Pseudomonas fluorescens	Octil-agarose	Adsorção	-	150	Fernández-Lafuente *et al.*, 1998
Candida rugosa	Octadecil-Sepabeads	Adsorção	100	108	Tiosso *et al.*, 2006
Candida antarctica B	Glioxil-Agarose	Covalente Multipontual	63	81	Rodrigues *et al.*, 2008
Candida antarctica B	Glutaraldeído-Agarose	Covalente Multipontual	92	61	Rodrigues *et al.*, 2008
Thermomyces lanuginosus	Glutaraldeído-Agarose	Covalente Multipontual	20	8	Mendes, 2009
Bacillus thermocatenulatus 2	Glioxil-Agarose	Covalente Multipontual	-	50-60	Bolivar *et al.*, 2009
Thermomyces lanuginosus	Glioxil-Quitosana-alginato	Covalente Multipontual	-	69	Mendes *et al.*, 2011a
Candida antarctica B	Glutaraldeído-Quitosana	Covalente Multipontual	51	62	Silva *et al.*, 2012
Candida rugosa	Nanotubos de carbono	Adsorção	35	21	Prlainovic *et al.*, 2013

(-) Não informado pelos autores.

Fonte: Elaborada pela autora.

2.4.1 Vantagens e Desvantagens dos Métodos de Imobilização de Enzimas

O Quadro 2.3 apresenta as vantagens e desvantagens dos métodos de imobilização de lipases. A imobilização por adsorção pode ser preferida quando o custo do suporte é elevado e deseja-se recuperá-lo ao ter-se a inativação total da enzima imobilizada. Entretanto, deve-se atentar para possível dessorção da enzima no meio

reacional em decorrência de variações no pH, temperatura e força iônica do meio reacional, dificultando as etapas de *downstream* do processo. Essa técnica de imobilização pode ainda ser preferida se o biocatalisador solúvel for termoestável e a intenção da imobilização for apenas insolubilizar o biocatalisador para uso repetido em processos bateladas ou uso contínuo em reatores de leito fixo e/ou fluidizado.

A ligação covalente, quando bem sucedida, produz um biocatalisador estável, mas pode ocorrer perda significativa na atividade da enzima imobilizada, como pode ser visto na Tabela 2.1. Se a enzima for termolábil, de baixo custo, e o produto final apresentar alto valor agregado, pode-se ainda aceitar consideráveis perdas de atividade durante o processo de imobilização. CLEA (do inglês *crosslinking enzyme aggregates*) tem a vantagem de se eliminar custos do suporte (no caso de entrecruzamento enzima-enzima), entretanto, o biocatalisador é frágil mecanicamente, sendo, portanto, o seu uso restrito a certas configurações de reatores onde a tensão de cisalhamento é pequena. O método de encapsulação apresenta a vantagem da enzima não estar fisicamente ligada ao suporte, comportando-se como se estivesse na forma solúvel. Isso pode preservar a atividade catalítica da enzima encapsulada. Entretanto, a porosidade do biocatalisador será um parâmetro de grande importância no processo de imobilização. Se os poros forem muito grandes, poderá ocorrer perda de enzima; se os poros forem muito pequenos, a resistência à transferência de massa (para substratos e produtos de grande massa molecular) poderá inviabilizar o processo. Assim, a escolha do método de imobilização de uma enzima está intimamente relacionada às propriedades da enzima e às características do bioprocesso onde se deseja aplicar o biocatalisador imobilizado.

Quadro 2.3 Comparação entre os métodos de imobilização de lipases.

Método	**Vantagens**	**Desvantagens**
Adsorção	Condições suaves de reação, procedimento fácil e de baixo custo. Permite a regeneração do suporte.	Interação lipase-suporte fraca. Lipase imobilizada sensível ao pH, força iônica e temperatura. Capacidade de adsorção reduzida e possível dessorção.
Ligação Covalente	Lipase imobilizada mais estável devido à força de ligação enzima-suporte.	Condições drásticas de preparo. A lipase pode perder sua atividade durante o processo de imobilização. Alguns reagentes empregados na ativação do suporte são tóxicos.
Cross-linking	Interação lipase-lipase forte e complexo imobilizado estável.	Condições de preparo intensas e resistência mecânica da lipase imobilizada baixa.
Encapsulação	Condições de preparo moderadas e método aplicável a uma gama de suportes e lipases.	Lipase imobilizada apresenta restrição à transferência de massa durante o processo catalítico. Lipase efetiva apenas para substratos de baixa massa molecular.

Fonte: Adaptado de Tan, Lu e Nie, 2010.

2.4.2 Suportes para Imobilização

Existem vários materiais (orgânicos e inorgânicos) que podem ser utilizados como suportes para a imobilização de enzimas.

Para a seleção de um suporte para certa aplicação, devem-se levar em consideração alguns aspectos, dentre eles: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo.

De acordo a com sua composição, os suportes podem ser classificados como orgânicos ou inorgânicos e, de acordo com sua morfologia podem ser classificados como porosos, não-porosos e de estrutura de gel (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004). O Quadro 2.4 apresenta a classificação em termos de composição (PEREIRA, 1996).

Quadro 2.4 Classificação dos suportes conforme a composição.

Orgânicos			**Inorgânicos**	
Naturais		**Sintéticos**	**Minerais**	**Fabricados**
Polissacarídeos	Proteínas	Poliestireno	Areia	Vidro de Porosidade Controlada
Celulose	Colágeno	Poliacrilatos	Betonita	Cerâmica de Porosidade Controlada
Ágar	Albumina	Polivinilos	Horneblenda	Sílica de Porosidade Controlada
Amido	Seda	Nylon	Pedra-Pome	Óxido de Ferro

Fonte: Adaptado de Pereira, 1996.

Suportes inorgânicos os são mais adequados para uso industrial devido às propriedades físicas que estes apresentam, oferecendo várias vantagens em relação aos suportes orgânicos. Porém, a maioria das enzimas imobilizadas comercializadas é obtida com matrizes orgânicas, provavelmente devido à grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser "introduzidos" em suportes orgânicos (PEREIRA, 1996).

Os materiais porosos possuem grande área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas, onde a enzima fica protegida dos efeitos de turbulência externa. A maior parte da área disponível para a imobilização apresenta-se na estrutura interna, por isso, o diâmetro do poro deve ser suficientemente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

Dentre os suportes disponíveis, os polímeros naturais e sintéticos são os mais utilizados e de grande importância. Os polímeros sintéticos apresentam variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser conjugadas para formar um suporte ideal. Entretanto, pelo fato dos polímeros naturais serem menos onerosos e facilmente degradáveis, são vantajosos em relação aos sintéticos.

A morfologia do poro é essencial na imobilização de enzimas, pois o poro deve ser suficientemente grande para permitir a acomodação da enzima e o livre acesso do substrato, mas quanto maior o poro menor a área superficial do suporte e consequentemente menor o número de sítios disponíveis para a ligação da enzima.

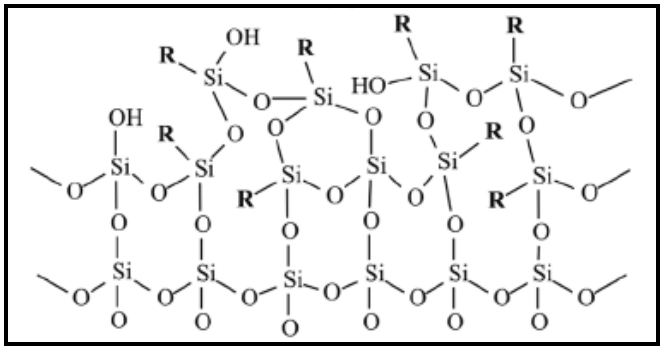
Blanco *et al.* (2004), estudaram a funcionalização de sílica mesoporosa com octiltrietoxisilano para a imobilização da lipase de *Candida antarctica* B, através de interações hidrofóbicas e conseguiram obter derivados com elevada carga enzimática (200

mg de proteína/g de sílica), devido à elevada porosidade e propriedades da superfície do suporte.

Neste trabalho empregou-se como suportes para a imobilização de lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) sílica macroporosa derivatizada com grupos octil, poliestireno, resina Amberlite XAD 7HP, agarose e Sepabeads com distintas ativações.

A sílica é um produto sintético, produzido pela reação de silicato de sódio e ácido sulfúrico. Ao serem misturados, forma-se um hidrosol que lentamente se contrai para formar uma estrutura sólida de sílica gel, também chamada hidrogel. A sílica gel é bastante utilizada como suporte para a imobilização de enzimas por apresentar as seguintes vantagens: possui alta resistência mecânica; estabilidade térmica e química; possui alta resistência à contaminação e à degradação microbiana e apresenta elevada área superficial (CANILHA, CARVALHO e SILVA, 2013). A Figura 2.7 apresenta a estrutura morfológica da sílica.

Figura 2.7 Estrutura morfológica da sílica com uma camada de organossilano (R = octil) na superfície.

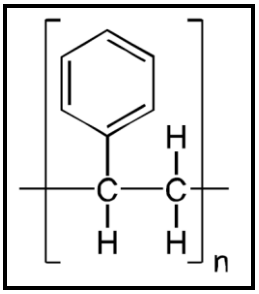


Fonte: Maldaner, Collins e Jardim (2010).

Na reação de esterificação do ácido linoleico e etanol, Yu *et al.* (2013) utilizaram sílica mesoporosa para a imobilização da lipase de *Candida rugosa.* Jang *et al.* (2012) utilizaram sílica gel para imobilizar a mistura das lipases de *Rhizopus oryzae* e *Candida rugosa* (1:1 v/v) para a aplicação na síntese de biodiesel de óleo de canola.

O poliestireno é um homopolímero resultante da polimerização do monômero de estireno. Caracteriza-se por sua facilidade de processamento e seu baixo custo (KENNEDY, 1987). É disponível em vários tipos apropriados para várias aplicações e processamentos. A Figura 2.8 apresenta a estrutura morfológica do poliestireno.

Figura 2.8 Estrutura morfológica do poliestireno.

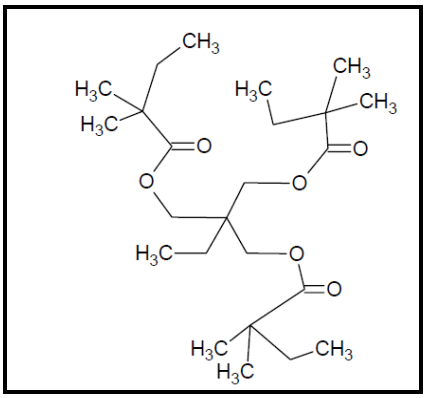


Fonte: Wikipédia (2012).

Especificamente para a imobilização de enzimas, o poliestireno foi utilizado para a imobilização de lipase de *Candida antarctica* B na forma de nanopartículas, apresentando atividade catalítica superior à da enzima livre e da lipase comercial Novozym 435 (MILETIC *et al.*, 2010). Outro exemplo de aplicação deste polímero na imobilização de enzimas é o trabalho de Li *et al.* (2010), que analisaram a influência do diâmetro de macroporos (30-40 µm) sobre a atividade catalítica e parâmetros cinéticos na imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*.

A resina Amberlite XAD 7HP é um polímero de acrílico não-iônico, alifático e com ligações cruzadas, do qual deriva suas propriedades adsortivas. Apresenta-se como uma estrutura macroreticular na forma de grânulos brancos insolúveis. Apresenta elevada área superficial e excelente estabilidade física e térmica. Devido sua natureza alifática, o adsorvente polimérico Amberlite XAD 7HP, pode adsorver compostos não polares de sistemas aquosos e compostos polares de solventes não polares (Rohm and Haas Company, 1999). A Figura 2.9 mostra a estrutura morfológica da Amberlite XAD 7HP.

Figura 2.9 Estruturas morfológicas da Amberlite XAD 7HP.

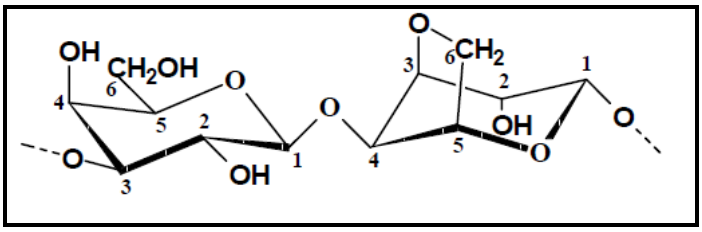


Fonte: Rohm and Haas Company (1999).

Um exemplo de aplicação deste suporte para a imobilização de lipases é síntese de (*S*)-3-hidróxi-*γ*-butirolactona puro, um importante bloco quiral empregado na indústria farmacêutica (LEE, PARK e UH, 2008), e na produção de *S*-Naprofeno a partir de uma mistura racêmica (TAKAÇ e BAKKAL, 2007).

Agarose, obtida a partir do ágar isolado de certas algas marinhas, é um polímero de galactose, cujas unidades básicas são cadeias de agarobiose (Figura 2.10), onde se alternam estruturas de *β*-D-galactopiranose e 3,6-anidro-*α*-L-galactopiranose, unidas por ligações 1 → 3 e 1 → 4 alternadamente. As unidades básicas de agarobiose se repetem formando cadeias com aproximadamente 400 unidades de agarobiose (massa molecular em torno de 120.000 Da) (KENNEDY, 1987).

Figura 2.10 Representação da agarobiose, as unidades básicas da agarose.



Fonte: Kennedy, 1987.

BrCN-agarose foi utilizada por Mendes *et al*. (2008) para imobilizar as lipases de *Aspergillus niger*, *Candida rugosa* e *Candida antarctica* B e realizar a hidrólise de glucopiranosídeos *β*-peracetilados. Lima *et al.* (2013) utilizaram glioxil-agarose e octil-agarose para a imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* para aplicação na hidrólise enantiosseletiva de 2-hidróxi-4-fenilbutirato de etila.

Sepabeads® é uma marca registrada da empresa Resindion, subsidiária da Mitsubishi Chemical. Trata-se de um suporte para imobilização de enzimas composto de uma matriz polimérica metacrílica rígida, com diâmetros de poro e de partícula controlados. Este suporte pode ser obtido da empresa já ativado com diferentes grupos funcionais comumente utilizados para imobilização de enzimas (RESINDION, 2013).

Sepabeads EC-EP foi utilizada por Saponjic *et al.* (2010) para imobilizar a lipase de *Candida rugosa* e aplicar na síntese de caprilato de amila em um sistema contendo solvente orgânico. Hernandez *et al*. (2011) utilizaram glutaraldeído-Sepabeads e octadecil-Sepabeads para imobilizar as lipases de *Candida antarctica* B e *Rhizomucor miehei* para aplicação na hidrólise de triacetina.

2.5 Aplicações de Lipases

As lipases são biocatalisadores que têm muitas aplicações, com isso sua participação no mercado mundial de enzimas industriais cresce significativamente (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006).

Como biocatalisadores, as lipases apresentam algumas vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos industriais. Suas características de especificidade, regiosseletividade e enantiosseletividade, permitem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Além disso, os processos enzimáticos requerem procedimentos mais simples e ainda, evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluente (CASTRO-OCHOA *et al*., 2005; SILVA *et al*., 2005).

As lipases têm sido comumente utilizadas na resolução de misturas racêmicas; na formulação de detergentes e síntese de biossurfactantes; no tratamento de efluentes; na indústria oleoquímica (bioconversão de óleos e gorduras) para a produção de biodiesel; na indústria agroquímica; na manufatura do couro e papel; na nutrição; na produção de aromas; na formulação de perfumes, fragrâncias e cosméticos; na fabricação de plásticos e fibras sintéticas; na síntese de sedativos e outros fármacos; dentre outras (CAMMAROTA e FREIRE, 2006; HASAN, SHAH e HAMEED, 2006; WILKINSON e BACHMANN, 2006; SALIS *et al*., 2005; SILVA *et al*., 2005; JAEGER e EGGERT, 2002; KIRK, BORCHERT e FUGLSANG, 2002; ZHANG *et al*., 2002).

Dentre as aplicações potenciais de lipases, deve ser dado destaque à produção de ésteres de aromas, resolução de racematos, ésteres de açúcares e biodiesel. Vale ressaltar que estes produtos foram obtidos neste trabalho.

2.5.1 Ésteres Alquílicos (Biodiesel)

Combustíveis derivados do petróleo são de grande importância no setor econômico de um país em desenvolvimento, mas o consumo destes combustíveis fósseis apresenta um impacto significativo na qualidade do meio ambiente. A poluição do ar, as mudanças climáticas, os derramamentos de óleo e a geração de resíduos tóxicos são resultados do vasto uso e da produção desses combustíveis (MEHER, SAGAR e NAIK, 2006).

O biodiesel pode ser definido como um derivado mono-alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal, cuja utilização está associada à substituição do óleo diesel (FERRARI, OLIVEIRA e SCABIO, 2005; COSTA NETO *et al.*, 2000).

Esta fonte energética, substituinte do óleo diesel, apresenta vantagens e desvantagens; entretanto os benefícios trazidos por este biocombustível se sobressaem sobre suas desvantagens. Como vantagens, Rashid *et al*. (2008) afirmam que o biodiesel apresenta baixa toxicidade e elevado ponto de fulgor (temperatura mínima necessária para que o combustível se inflame), reduzida emissão de gases, tais como monóxido e dióxido de carbono, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e dióxido de enxofre, pois o mesmo é praticamente isento de enxofre.

Como desvantagens podem-se citar o congelamento do biodiesel e suas respectivas misturas quando submetidos a baixas temperaturas (<10ºC), reduzida densidade de energia e problema de degradação quando armazenado por longos períodos (BALAT e BALAT, 2008). Além disso, podem ser observados problemas referentes ao uso da mistura óleo diesel e biodiesel, quando introduzidos nos motores a diesel. Os hidrocarbonetos presentes no óleo diesel tipicamente formam uma camada de depósitos dentro dos tanques e mangueiras e as misturas de biodiesel e óleo diesel fazem com que estes depósitos sejam removidos, o que pode causar entupimento nos filtros de combustível (WARDLE, 2003).

2.5.1.1 Matérias-primas para Produção de Biodiesel

As matérias primas para a produção de biodiesel podem ter as seguintes origens: óleos vegetais, gorduras de animais, óleos e gorduras residuais. O Brasil, por possuir uma grande extensão territorial, apresenta uma ampla diversidade de matérias-primas para a produção de biodiesel. Dentre estas, destacam-se os óleos obtidos de caroço de algodão, bagaço de mamona, amêndoa do coco de babaçu, sementes de soja, de girassol e de colza, entre outros vegetais (RAMOS *et al.*, 2003).

A escolha da matéria-prima é de grande importância no processo de produção de biodiesel, uma vez que se leva em conta o percentual de óleo no grão, a produção de grãos por área, a vocação agrícola de cada região, o custo, as propriedades de armazenamento e desempenho como combustível (QUINTELLA *et al.*, 2009).

No Brasil, o incentivo para a produção de biodiesel é baseada na produção regional, utilizando as técnicas e máterias-primas mais apropriadas em cada região (OLIVEIRA *et al.*, 2009). O Brasil possui grande diversidade de opções para produção de biodiesel. Por exemplo, a palma e o babaçu no norte, a soja, o girassol e o amendoim nas regiões do sul, sudeste e centro-oeste, e a mamona e o pinhão manso, no nordeste. Atualmente, a maior parte do biodiesel brasileiro produzido é proveniente do óleo de soja, por ser relativamente barato e já existir uma infra-estrutura de produção bem estabelecida (SUAREZ e MANENGHITTI, 2007).

2.5.1.2 Produção de Biodiesel

O processo químico empregado mundialmente para a produção de biodiesel é o da transesterificação ou alcoólise, na qual um óleo vegetal triacilglicerídico reage com um álcool (comumente metanol ou etanol) na presença de um catalisador (usualmente alcalino) para formar, majoritariamente, ésteres monoalquílicos (biodiesel) e glicerol (Figura 2.11).

Figura 2.11 Reação de transesterificação.

Sendo que R_1, R_2 e R_3 representam as cadeias carbônicas dos ácidos graxos e R_4 o grupo alquil do álcool.

Fonte: Geris *et al*., 2007.

Esta reação ocorre em três etapas sequenciais: inicialmente, as moléculas de triacilglicerídeos são convertidas em diacilglicerídeos, depois em monoacilglicerídeos e, finalmente, em glicerol, produzindo um mol de éster a cada etapa reacional. Os álcoois metílicos e etílicos figuram entre os principais agentes transesterificantes e são os mais frequentemente empregados no processo (DARNOKO e CHERYAN, 2000; BARNWAL e SHARMA, 2005).

O metanol é o álcool mais utilizado devido ao seu baixo custo na maioria dos países e às suas vantagens físicas e químicas (álcool de cadeia mais curta reage rapidamente com os triacilglicerídeos e dissolve facilmente o catalisador básico). Além disso, permite a separação simultânea do glicerol (MA e HANNA, 1999). No entanto, é um produto tóxico. A mesma reação usando etanol é mais complicada, pois requer um álcool anidro (MA e HANNA, 1999). As vantagens de se usar o etanol obtido da cana-de-açúcar, é que ele é 100% renovável, garante maior segurança na sua manipulação devido à menor toxicidade e é totalmente biodegradável. Além disso, o metanol também causa maior inativação enzimática comparada ao etanol. Portanto, o etanol é geralmente preferido para realização de transesterificação catalisada por lipase para a preparação de biodiesel (NARANJO *et al.*, 2010). Além disso, no Brasil existe uma maior disponibilidade do álcool de cana.

A alcoólise de óleos vegetais ou gordura animal pode ser conduzida por uma variedade de rotas tecnológicas, em que diferentes catalisadores podem ser empregados, como bases inorgânicas (GEORGOGIANNI *et al.*, 2008), ácidas (LOTERO *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2006), catalisadores heterogêneos (TODA *et al.*, 2005; DASILVEIRA NETO *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2008), bases orgânicas (SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS, 1998) e enzimas (SALIS, *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2010; SHIMADA *et al.*, 2002). A transesterificação também pode ocorrer sem qualquer catalisador, utilizando metanol sob condições supercríticas (HE, WANG e ZHU, 2007).

Atualmente, a catalise homogênea tem sido a rota tecnológica mais utilizada para produção de biodiesel, onde as reações são catalisadas por bases ou ácidos. Porém, a catálise enzimática tem mostrado algumas vantagens em relação aos métodos químicos.

2.5.1.2.1 Rota Química

Atualmente, a catálise homogênea tem sido a rota tecnológica preferida para a produção de biodiesel. Esta pode se processar em meio ácido ou alcalino.

Ácidos de Brönsted-Lowry podem ser utilizados como catalisadores da alcoólise, preferencialmente, os ácidos sulfônico e sulfúrico. Estes catalisadores fornecem alto rendimento em ésteres monoalquílicos, mas a reação é lenta, normalmente requerendo temperaturas de 100ºC e mais de 3 horas para atingir uma boa conversão (KUCEK, 2004).

Outra desvantagem é a contaminação do biodiesel com catalisadores ácidos residuais que podem atacar as partes metálicas do motor, causando a corrosão e, por isso, devem ser eliminados completamente do produto final, implicando em muitas etapas de purificação (CANAKÇI e VAN GERPEN, 1999).

Comercialmente, a rota prioritária de produção do biodiesel tem sido a catálise alcalina homogênea. Portanto, pode-se afirmar que esta rota tecnológica, devido a sua maior rapidez e simplicidade, ainda prevalece como a opção mais imediata e economicamente viável para a transesterificação de óleos vegetais (MA e HANNA, 1999; PETERSON *et al*., 2011; RAMOS *et al*., 2003).

Nesse sentido, muitas rotas tecnológicas têm sido demonstradas, através do uso de catalisadores como os carbonatos de sódio e potássio e alcóxidos, como metóxido, etóxido, propóxido e butóxido de sódio (VICENTE, MARTÍNEZ e ARACIL, 2004; SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS, 1998; BONDIOLI *et al*., 1995).

O emprego de NaOH ou KOH para a produção de biodiesel, exige que a matéria-prima apresente baixa acidez para evitar o consumo de álcali e a subsequente formação de sabões. Uma desvantagem adicional dessa rota tecnológica é a formação de água no meio reacional, decorrente da pré-solubilização dos hidróxidos no álcool para a produção do alcóxido correspondente (metóxido ou etóxido de sódio), que atua como o verdadeiro catalisador da transesterificação. A presença de água favorece, inevitavelmente, a saponificação dos triacilglicerídeos paralelamente à sua conversão em ésteres, gerando dificuldades de purificação, formação de emulsões e perdas de rendimento (SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS, 1998).

Devido às desvantagens ocasionadas pelo uso de catalisadores químicos na produção de biodiesel, catalisadores biológicos vem sendo testados.

2.5.1.2.2 Rota Enzimática

A produção enzimática de biodiesel tem despertado grande interesse tanto no setor produtivo quanto no acadêmico, por ser uma alternativa promissora ao procedimento atual (rota química). Além da reação ocorrer em temperaturas menores, ela apresenta melhores resultados com etanol hidratado (MOREIRA *et al.*, 2007, SAAD, 2005; MA e HANNA, 1999), ou seja, os custos de operação do processo são reduzidos por não necessitar de etanol anidro na reação. Uma vez que as lipases são altamente seletivas, a

pureza do biodiesel e da glicerina é alta. Outra grande vantagem do uso de enzimas é a possibilidade da imobilização, que permite a reutilização do biocatalisador e, consequentemente, o desenvolvimento de processos contínuos (MOREIRA *et al.*, 2007, SALIS, MONDUZZI e SOLINAS, 2007).

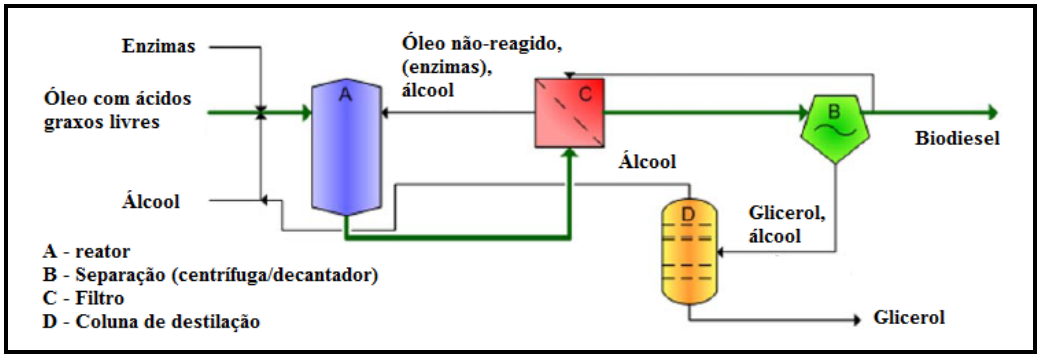
A maioria das lipases utilizadas como catalisadores em sínteses orgânicas (incluindo a produção de biodiesel) são de origem microbiana como: *Candida rugosa, Pseudomonas fluorescens, Rhizopus oryzae, Burkholderia cepacia, Aspergillus niger, Thermomyces lanuginosus e Rhizomucor miehei* (AL-ZUHAIR, 2006). As razões para o enorme potencial biotecnológico de lipases microbianas incluem o fato de elas serem estáveis em solventes orgânicos; não necessitarem de cofatores; possuírem uma grande especificidade de substrato e exibirem uma alta enantiosseletividade (JAEGER e REETZ, 1998).

Além das vantagens específicas do uso do etanol na produção de biodiesel, especificamente na rota enzimática, há um menor efeito de inativação enzimática causado pelo etanol em relação ao metanol, pois este remove a camada de hidratação da molécula de enzima. Esta inativação causada pelo metanol tem por consequência o uso de baixas concentrações do álcool no reator enzimático. Portanto, a produção de biodiesel metílico por rota enzimática requer um processo em batelada alimentada (KAIEDA *et al*., 1999).

Embora os processos de transesterificação enzimática para obtenção de biodiesel ainda não sejam comercialmente desenvolvidos, novos resultados tem sido reportados em artigos e patentes (RODRIGUES *et al.*, 2010). De um modo geral, estes estudos consistem na otimização das condições de reação (solvente, temperatura, pH, tipo de microrganismo produtor da enzima, etc.), a fim de estabelecer as características para aplicações industriais. Contudo, tanto o rendimento como o tempo de reação ainda são desfavoráveis em comparação com o sistema de reação por catálise básica.

A Figura 2.12 apresenta um processo ideal para produção de biodiesel por transesterificação a partir da catálise enzimática.

Figura 2.12 Processo ideal para produção enzimática de biodiesel.



Fonte: Adaptado de Fjerbaek, Christensen e Norddahl, 2009.

O Quadro 2.5 resume as principais vantagens e desvantagens dos processos de produção de biodiesel por rota química e enzimática.

Quadro 2.5 Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção de biodiesel.

Rota	Vantagens	Desvantagens
Química	Simplicidade Alto rendimento Curto tempo de reação	Dificuldade de separação do catalisador Impossibilidade de reutilização do catalisador Dificuldade de utilização de etanol anidro Obtenção de produtos com menor grau de pureza
Enzimática	Facilidade de separação do catalisador Obtenção de produtos mais puros Permite o uso de etanol hidratado	Longo tempo de reação Custo das enzimas

Fonte: Saad (2005)

Outra desvantagem específica da rota enzimática de produção de biodiesel é a possibilidade de inativação do catalisador por adsorção de subproduto no suporte. Por exemplo, sabe-se que a enzima imobilizada mais utilizada em biotransformações é a lipase de *Candida antarctica* tipo B (NELSON, FOGLIA e MARMER, 1996; SHIMADA *et al.*,

1999; WATANABE *et al*., 2000; CHANG *et al*., 2005; RODRIGUES *et al.*, 2008). Esta enzima é fornecida pela Novozymes sob a denominação comercial de Novozym 435 e é fisicamente adsorvida sobre a resina macroporosa Lewatit VPOC1600. No entanto, estudos realizados por Séverac *et al*. (2011) mostraram que a natureza hidrofílica deste suporte é uma limitação no campo da catálise heterogênea, particularmente na produção de biodiesel. Glicerol é adsorvido sobre o suporte resultando em uma drástica redução da atividade enzimática. Provavelmente, glicerol forma uma camada hidrofílica ao redor da enzima, resultando em limitações difusionais na transferência de massa dos triacilglicerídeos para a enzima. Portanto, embora preparações de lipases imobilizadas possam ser obtidas comercialmente, o desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados é de considerável importância.

A Tabela 2.2 lista trabalhos de transesterificação enzimática encontrados na literatura, abordando matéria-prima, álcool (receptor acil), condições reacionais e rendimentos de reação.

No geral, percebe-se pela Tabela 2.2 que os rendimentos da produção enzimática de biodiesel são altos (acima de 70%), mas depende de vários fatores, tais como: temperatura, tipo de óleo e de álcool, quantidade de álcool em excesso e tipo de enzima.

Apesar do excesso de álcool facilitar a miscibilidade do sistema reacional, altas razões álcool:óleo aumentam a polaridade do meio, o que está frequentemente associado com a inativação do biocatalisador. Tendo isso em vista, alguns autores propõem a adição do álcool por partes (*stepwise*) como forma de evitar a exposição da lipase a altas concentrações de álcool, que levariam à inativação da lipase (RODRIGUES *et al.,* 2010; SHIMADA *et al.*, 2002).

Tabela 2.2 Transesterificação de óleos catalisada por lipases.

Óleo	Álcool	Condições da reação	Razão molar óleo:álcool	Lipase (Suporte)	*R (%)	Referência
Soja	Metanol	40°C, 14 h	1:12	*Candida antarctica* B (Resina acrílica – Novozym 435)	92	Du *et al.*, 2004
Babaçu	Etanol	40°C, 48 h	1:10	Pâncreas de porco (POS-PVA ativado com glutaraldeído)	75	Paula *et al.*, 2007
Soja	Metanol	40°C, 72 h	1:8	*Pseudomonas fluorescens* (Polipropileno macroporoso)	98	Salis *et al.*, 2008
Canola	Metanol	40°C, 24 h	1:6	*Thermomyces lanuginosus* (Poliuretano ativado com glutaraldeído)	90	Dizge e Keslinler, 2008
Soja	Etanol (alimentado em duas etapas)	30°C, 10 h	1:3	Lipozyme TL-IM	100	Rodrigues *et al*., 2010
Soja	Etanol	32°C, 24 h	1:45	*Candida antarctica* B (Resina acrílica – Novozym 435)	87	Rosset *et al.*, 2011

*R = Rendimento

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2.2 Transesterificação de óleos catalisada por lipases (Continuação).

Óleo	Álcool	Condições da reação	Razão molar óleo:álcool	Lipase (Suporte)	*R (%)	Referência
Colza	Etanol	35°C, 4 h	1:4,5	*Candida antarctica* B (polimetacrilato-divinilbenzeno)	90	Xu, Nordblad e Woodley, 2012
Oliva	Metanol	30°C, 12 h	1:4	*Burkholderia sp.* (partículas magnéticas recobertas com sílica)	70	Liu *et al.*, 2012
Babaçu	Etanol	45°C, 72 h	1:9	*Pseudomonas fluorescens* (esferas de poli-hidróxibutirato – PHB)	100	Mendes *et al.*, 2012
Oliva, palma, soja e peixe	Metanol	30°C, 10 h	1:6	*Staphylococcus haemolyticus* (polimetacrilato-divinilbenzeno)	90	Kim *et al.*, 2013

*R = Rendimento

Fonte: Elaborada pela autora.

2.5.2 Ésteres Aromatizantes

Segundo Paula, Barbosa e Castro (2005), dentre os possíveis processos catalisados pelas lipases em meio orgânico, a síntese de ésteres apresenta-se como uma vertente bastante promissora, em função da importância de diferentes ésteres na vida cotidiana.

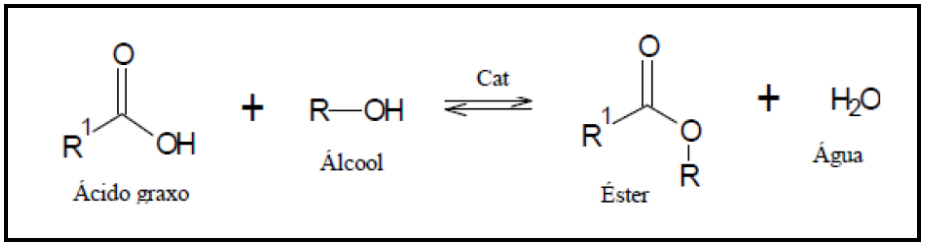
Uma aplicação importante desta tecnologia é a produção de ésteres aromatizantes, para uso em diversos produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (YAHYA, ANDERSON e MOO-YOUNG, 1998; GANDHI, 1997). Podem ser obtidos por três técnicas: extração de fontes naturais, sínteses químicas e enzimáticas.

A crescente procura por ésteres formulados especialmente para aplicação como aditivos e aromas em indústrias de perfumes, alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, torna necessário encontrar formas alternativas para a obtenção de aromas, ao invés da extração de seus materiais naturais, que são muito escassos ou caros para uso comercial (KUMAR, MODAK e MADRAS, 2005; ABBAS e COMEAU, 2003). A síntese de ésteres na indústria, geralmente baseia-se na esterificação química direta de ácidos orgânicos (cadeia carbônica curta ou longa) com álcool na presença de catalisadores inorgânicos em temperatura elevadas (± 100°C). Entretanto, essas reações químicas não são seletivas e consomem uma grande quantidade de energia. A utilização de enzimas como biocatalisador para a síntese de ésteres para a produção de aromas permite o desenvolvimento de produtos com melhores propriedades, além de catalisar reações em temperaturas relativamente baixas e ainda serem considerados “naturais” pelas indústrias alimentícias (KISS *et al.,* 2004).

O aroma típico de cada produto é resultado da combinação de dezenas de substâncias voláteis representantes de diversas classes químicas, com diferentes propriedades físico-químicas. Nenhum constituinte individual é totalmente responsável pelo aroma característico de um alimento, mas em alguns produtos existem um ou mais componentes que, sozinhos, lembram a qualidade característica de seu aroma (ARAGÃO *et al.,* 2009).

A reação de formação de ésteres a partir de ácidos graxos é denominada esterificação, que consiste na obtenção de ésteres pela reação entre um ácido graxo e um álcool de cadeia curta, com formação de água como subproduto (Figura 2.13).

Figura 2.13 Reação de esterificação.



Fonte: Madalozzo, 2011.

Na Tabela 2.3 tem-se alguns exemplos de esterificações enzimáticas para produção de aromas encontrados na literatura.

Vários estudos têm demonstrado a obtenção de ésteres de aroma sintetizados com altos rendimentos (Tabela 2.3) utilizando diversas lipases de origem microbiana (ROMERO *et al*., 2007; SHIH *et al*., 2007). Os ésteres produzidos por síntese enzimática são predominantemente obtidos em meios orgânicos com baixo conteúdo de água, mantendo assim a conformação ativa da lipase e sua termoestabilidade (BEZBRADICA *et al*., 2007).

Tabela 2.3 Esterificação enzimática para produção de aromas.

Ácido	Álcool	Solvente	Condições da reação	Lipase (Suporte)	*C (%)	Referência
Butírico	Butanol	n-Heptano	37°C, 24 h	*Candida antarctica* B (estireno-divinilbenzeno)	90	Oliveira, Alves e Castro, 2000
Butírico	Butanol	Ciclohexano	35°C, 24 h	*Mucor sp* (Amberlite IRC 50)	100	Abbas e Comeau, 2003
Butírico	Etanol	n-Heptano	34°C, 96 h	Novozym 435	73	Rodrigues-Nogales *et al.*, 2005
Butírico	Butanol	n-Hexano	37°C, 72 h	*Candida rugosa* (sílica)	72	Thakar e Madamwar, 2005
Anidrido Butírico	L-Mentol	n-Hexano	35°C, 48 h	*Candida rugosa* AY-30	80	Shih *et al.*, 2007
Octanoico	n-Pentanol	n-Hexano	30°C, 24 h	Lipozyme TL IM	95	Skoronski *et al.*, 2010
Acético	Óleo fúsel (55% Isoamílico)	n-Hexano	30°C, 96 h	*Aspergillus niger* NCIM 1207 (Celite 545)	99	Mhetras, Patil e Gokhale, 2010

*C = conversão

Fonte: Elaborada pela autora.

2.5.3 Ésteres Graxos de Açúcares

Os ésteres graxos de açúcares são biossurfactantes não iônicos, inodoros, insípidos, biodegradáveis, atóxicos e não irritantes. Sua natureza anfifílica (parte polar do carboidrato e parte apolar do ácido graxo) permite que suas moléculas sejam distribuídas nas interfaces óleo/água formando um filme molecular. Devido a este fenômeno, ocorre uma redução da tensão superficial, atribuindo aos biossurfactantes propriedades importantes, tais como, detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, dentre outras (PAULA, BARBOSA e CASTRO, 2005; GUMEL *et al*., 2011).

Biossurfactantes possuem aplicações em indústrias de cosméticos, alimentos, fármacos, defensivos agrícolas (herbicidas e pesticidas), petrolífera, dentre outras (GUMEL *et al*., 2011; WANG *et al*., 2012, BORGES, 2007).

Ésteres graxos de açúcares podem ser obtidos por rotas químicas, utilizando catalisadores alcalinos ou metálicos, ou rotas enzimáticas, utilizando lipases (GUMEL *et al*., 2011). A reação consiste na esterificação entre um açúcar ($C_n(H_2O)_n$) e um ácido graxo (RCO_2H), como mostra a Figura 2.14, ou de transesterificação entre carboidratos e ésteres metílicos de ácidos graxos (WANG *et al*., 2012; GUMEL *et al*., 2011). As rotas químicas são energeticamente mais dispendiosas, possuem baixa seletividade e podem gerar subprodutos tóxicos (inclusive cancerígenos).

Figura 2.14 Reação de esterificação entre um açúcar e um ácido graxo.

$$C_n(H_2O)_n + RCO_2H \overset{\text{Lipase}}{\longleftrightarrow} C_n(H_2O)_{n-1}(OCOR) + H_2O$$

Fonte: Gumel *et al*., 2011.

Industrialmente, ésteres de glicose, frutose e sacarose são sintetizados por meio da transesterificação de ésteres metílicos de ácidos graxos na presença de catalisadores básicos ou metálicos. A temperatura da reação é alta (acima de 100°C) e requer o uso de pressão reduzida, a fim de se eliminar metanol gerado, favorecendo o deslocamento do equilíbrio da reação no sentido de formação do produto (GUMEL *et al*., 2011; BOSCOLO, 2003).

A maior dificuldade da rota química está relacionada no controle do grau de esterificação do açúcar e na posição de acilação. Por exemplo, a produção de monoéster de sacarose é um processo complicado comparado a outros emulsificantes de grau

alimentício. A rota enzimática pode contornar essa dificuldade, além de ser vantajosa do ponto de vista ambiental e energético (GUMEL *et al*., 2011).

Processos de produção de ésteres graxos de açúcares requerem o uso de solventes de alta polaridade para dissolução dos açúcares. Particularmente na rota enzimática, essa condição pode inativar a enzima (CASTRO, MENDES E SANTOS, 2004). Para que se obtenham maiores rendimentos de reação, o solvente deve conciliar a solubilidade do açúcar e a atividade da enzima, isto é, o solvente deve ser suficientemente polar para que haja solubilização do açúcar e suficientemente apolar para não haver inativação da enzima.

Na Tabela 2.4 tem-se alguns exemplos da síntese enzimática de ésteres graxos de açúcares encontrados na literatura. Em geral, os solventes empregados para a síntese de ésteres graxos de açúcares são álcoois terciários. Isso ocorre devido ao fato de as lipases não interagirem com estes álcoois, evitando a formação de subprodutos (Kumari *et al.*, 2009).

Recentemente, tem sido discutida na literatura a possibilidade de utilização de solventes alternativos, tais como os líquidos iônicos (sais que em condições ambiente estão na forma líquida). A motivação para o uso de líquidos iônicos é o fato de eles serem menos voláteis e inflamáveis que os álcoois normalmente utilizados na síntese de ésteres de açúcares (ABDULMALEK; RAHMAN; SALLEH, 2012). Com isso, há uma melhoria da segurança do processo industrial.

Tabela 2.4 Síntese enzimática de ésteres graxos de açúcares.

Carboidrato	Ácido graxo	Solvente	Condições da reação	Lipase (Suporte)	*C (%)	Referência
Sacarose	Vinil-láurico	*Terc*-amílico e dimetilsulfóxido	40°C, 6 h	*Thermomyces lanuginosus* (sílica)	95	Ferrer *et al.*, 2002
Frutose	Oleico	*Terc*-butanol	38°C, 4 h	Pâncreas de porco (polisiloxano-álcool polivinílico)	52,8	Paula, Barbosa e Castro, 2005
Frutose	Palmítico	2-metil-2-butanol	60°C, 72 h	Novozym 435	78	Sabeder *et al.*, 2006
Glicose	Láurico	*Terc*-butanol	60°C, 50 h	Novozym 435	72	Ye *et al.*, 2010
Maltose	Mirístico	*Terc*-butanol	60°C, 60 h	Novozym 435	90	Sun *et al.*, 2011
Lactose	Oleico	Acetona	35°C, 48 h	*Candida antarctica* B (glioxil-sílica)	30	Bernal *et al.*, 2012
Lactose	Cáprico	Acetona	50°C, 48 h	*Candida rugosa* (NER-CRL)	67	Zaidan *et al*., 2012
Galactose	Oleico	Tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazol (líquido iônico) e dimetilsulfóxido (co-solvente)	60°C, 2 h	Lipozyme RM IM	87	Abdulmalek, Rahman e Salleh, 2012

*C = Conversão

Fonte: Elaborada pela autora.

2.5.4 Resolução de misturas racêmicas

A resolução de misturas racêmicas, isto é, a separação de um dos enantiômeros de uma solução de um composto quiral, é uma importante operação para gerar produtos destinados à indústria farmacêutica e química fina. Em certos casos, as propriedades de somente um dos enantiômeros é a necessária para a aplicação desejada.

Neste contexto, as definições de "excesso enantiomérico" (*ee*) e "enantiosseletividade" (*E*) são as medidas da capacidade de um catalisador para produzir preferencialmente um enantiômero em relação ao outro. As equações 2.4 e 2.5 mostram as definições destes parâmetros (CHEN *et al.*, 1982).

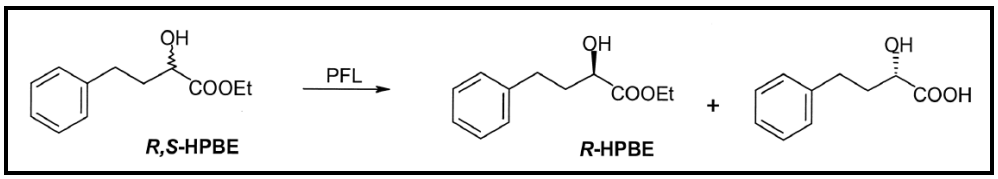
$$ee = \frac{P - Q}{P + Q} \tag{2.4}$$

$$E = \frac{\ln\left[(1-c)(1-ee)\right]}{\ln\left[(1-c)(1+ee)\right]} \tag{2.5}$$

onde *P* e *Q* são, respectivamente, o número de mols de um ou outro enantiômero, e *c* é a conversão do reagente.

As lipases são um dos principais catalisadores utilizados para a resolução de misturas racêmicas, dada a sua alta seletividade. Um exemplo do uso de lipases na resolução de misturas racêmicas de ésteres é mostrado esquematicamente na Figura 2.15.

Figura 2.15 Resolução de (*R,S*)-HPBE por hidrólise de LPF.



Fonte: Palomo *et al.* (2003b)

Fernández-Lafuente (2010) faz uma revisão da literatura sobre o uso de lipases de *Thermomyces lanuginosus* para, dentre outras aplicações, a resolução de misturas racêmicas e o uso da enantiosseletividade da lipase na hidrólise de ésteres proquirais. Um dos estudos citados foi o de Cabrera *et al.* (2007), que realizou

experimentos de hidrólise enzimática de dietil fenilmalonato (um diéster). Os autores obtiveram conversão completa de fenilmalonatos em monoésteres, isto é, não foram detectados diácidos (hidrólise total) no produto final, mostrando a alta seletividade do biocatalisador. Além disso, obtiveram-se misturas racêmicas dos monoésteres com fator de assimetria (razão entre número de mols de um enantiômero e o número de mols do outro enantiômero) variando entre 1,5 e 10, dependendo do protocolo de imobilização, tipo de suporte (octil-agarose ou agarose ativada por BrCN), do receptor de grupos acil e da presença de co-solventes ou detergentes.

Outro exemplo da análise da enantiosseletividade de lipases é o estudo de Fernández-Lorente *et al.* (2001), que realizaram experimentos de hidrólise de (*R*,*S*) 2-hidróxi-4-fenilbutirato de etila (HPBE) em meio aquoso catalisada por lipase de *Pseudomonas fluorescens*. A enzima solúvel não apresentou alta enantiosseletividade, mas quando adsorvida em suportes hidrofóbicos, houve um aumento significativo neste fator (de $E = 7$ para $E = 80$) e no excesso enantiomérico (superior a 99%) com o uso dos derivados.

A partir destes dois trabalhos que, apesar das lipases apresentarem alta seletividade, a escolha de um procedimento apropriado para a imobilização é de extrema importância para uma efetiva enantiosseletividade da lipase.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Enzimas

Foram utilizadas Amano Lipase de *Pseudomonas fluorescens* AK (LPF) (2600 U/g de pó e 30 mg de proteína/g de pó) adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), lipases comerciais imobilizadas de *Candida antarctica* B IM (CALB IM – T2-350), *Thermomyces lanuginosus* IM (LTL IM – T2-150) e *Pseudomonas fluorescens* IM (LPF IM – T2-150) adquiridas da Chiral Vision (Leiden, Holanda). Todas as lipases comerciais são imobilizadas covalentemente em resina acrílica ativada com grupos epóxidos (Immobead^{TM} 150/350-P).

3.1.2 Suportes

Os suportes utilizados foram amberlite XAD 7HP (resina acrílica) adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), Immobead S60S (sílica macro porosa) e Immobead S861 (poliestireno) adquiridos da Chiral Vision (Leiden, Holanda). Octil-Sepharose^{TM} CL-4B (octil-agarose) adquirido da GE Healthcare (Uppsala, Suécia). Sepabeads EC-EP foi doado pela Mitsubishi Chemical Corporation (Milão, Itália). Sepharose 4B ativada com BrCN, adquirida da Amersham Pharmacia Biotech AB (Suécia). A resina C18-Sepabeads (octadecil-Sepabeads) foi gentilmente doada pela Resindion S.R.L. A agarose 6BCL foi adquirida da Agarose Bead Technologies.

3.1.3 Reagentes

Utilizou-se octiltrietoxisilano (C_8-TEOS), corante rosa de bengala, albumina bovina cristalina, heptadecanoato de etila, 2-metil-2-butanol, 1-hexanol, 1-butanol, TRITON X-100 (TX), butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB), peneira molecular (3 Å), borohidreto de sódio, álcool benzílico, etanolamina, dodecil sulfato de sódio (SDS) e dietil-*p*-nitrofenilfosfato (D-pNP) adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Azul brilhante de Comassie adquirido da Bio-Rad Laboratories (Califórnia, EUA). O álcool

etílico (99,7%) foi adquirido da J. T. Baker (New Jersey, USA). *Terc*-butanol, lactose e ácido láurico foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Heptano, álcool isoamílico, frutose, ácido oleico e goma arábica foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil). O ácido acético foi adquirido da Qhemis (São Paulo, Brasil). O óleo de soja (Liza®) e o azeite de oliva (Carbonell®) foram adquiridos no comércio local. O óleo de babaçu foi doado pelo grupo de pesquisa da Escola de Engenharia de Lorena. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 Metodologia Experimental

3.2.1 Determinação de Proteínas

A concentração de proteína das preparações comerciais de lipase foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se o reagente azul brilhante de Comassie. A concentração de proteína foi comparada com uma curva padrão, obtida a partir de soluções de albumina bovina cristalina (BSA) com concentrações conhecidas. A curva padrão obtida é mostrada no Apêndice A.

3.2.2 Determinação das Atividades Hidrolíticas

3.2.2.1 Hidrólise de Azeite de Oliva Emulsificado

A atividade hidrolítica das preparações enzimáticas foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia descrita por Soares *et al.* (1999). O método baseia-se na hidrólise de uma emulsão de azeite de oliva-goma arábica (7 % m/v, em água) na razão volumétrica 1:1. Em erlenmeyer foram adicionados 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0 e a lipase (solúvel ou imobilizada). A mistura foi incubada a 37°C por 5 min com agitação de 250 rpm. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de solução de etanol:acetona (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados com uma solução de KOH 0,025 M, previamente padronizada, utilizando fenolftaleína como indicador. O cálculo da atividade hidrolítica (A_H) foi realizado de acordo com a Equação 3.1. Uma

unidade (U_{azeite}) de atividade enzimática representa a velocidade de liberação de 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio.

$$A_H(U_{azeite}/mg\ ou\ U_{azeite}/g) = \frac{(V_a - V_b)10^3 M}{tm} \quad (3.1)$$

onde V_a é o volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_b é o volume de KOH gasto na titulação do controle (solução inicial de substrato, sem enzima) (mL); M é a concentração molar da solução de KOH; m é a massa de enzima solúvel (mg de pó) ou imobilizada (g de derivado) e t é o tempo de reação (min).

3.2.2.2 Hidrólise de butirato de p-Nitrofenila (p-NPB)

A atividade de hidrólise de *p*-NPB foi determinada espectrofotometricamente acompanhando o aumento da absorbância a 348 nm (ε = 5,150 M^{-1} cm^{-1}) devido à liberação de *p*-nitrofenol na hidrólise de 0,4 mM de *p*-NPB em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 a 25°C (PALOMO *et al*., 2005). A reação foi acompanhada em um espectrofotômetro com célula termostatizada e com agitação magnética contínua. Para iniciar a reação, 0,05-0,2 mL de solução (dependendo da diluição e da atividade da amostra) de lipase solúvel ou suspensão de lipase imobilizada foram adicionados a 2,5 mL de solução do substrato. Uma unidade ($U_{p\text{-}NPB}$) de atividade foi definida como a velocidade inicial de hidrólise de 1 μmol de *p*-NPB.min^{-1}, sob as condições de ensaio.

3.2.3 Atividade de Esterificação (Síntese de Butirato de Butila)

A atividade de esterificação de lipases imobilizadas foi medida de acordo com o método descrito por Paula *et al.* (2008), o qual consiste na formação de butirato de butila na reação de 1-butanol (0,10 M) com ácido butírico (0,10 M) em heptano a 37°C. As velocidades iniciais foram medidas com diferentes massas de lipases imobilizadas (0,25; 0,5 e 1 g de LPF-octil-sílica (baixa carga); 0,063; 0,13 e 0,25 g de LPF IM; 0,025; 0,05 e 0,1 g de CALB IM e 0,2; 0,4 e 0,8 g de LTL IM). A reação foi iniciada pela adição do biocatalisador ao meio reacional (10 mL) em frascos de vidro fechados e mantidos sob agitação de 250 rpm. Alíquotas foram retiradas do meio reacional em intervalos de 5 a 10

min por um período de aproximadamente 40 min para quantificação do ácido consumido, por titulação com KOH 0,0105 M. Uma unidade (U_{Est}) de atividade de esterificação foi definida como a taxa de formação de 1 μmol de butirato de butila por minuto nas condições do ensaio.

3.2.4 Preparação e/ou ativação de Suportes

3.2.4.1 Preparação do Suporte Octil-Sílica

Com o intuito de aumentar a hidrofobicidade da sílica, este suporte foi derivatizado com grupos octil conforme metodologia descrita por Tani e Suzuki (1996). Basicamente o método consiste em tratar inicialmente a sílica com ácido clorídrico 0,1 M, seguido por lavagem até pH neutro e secagem a 200ºC por 5 h. Uma suspensão foi preparada contendo 1 g de sílica seca e 20 mL de uma mistura de octiltrietoxisilano e tolueno na razão volumétrica 1:10. Esta suspensão era mantida sob refluxo por 3 h e temperatura em torno de 85ºC. Após o período de ativação, filtrou-se e lavou-se o suporte com tolueno, metanol e água destilada. O término do processo deu-se ao secar o suporte a temperatura ambiente.

3.2.4.2 Preparação dos Suportes Poliestireno e Amberlite XAD 7HP

Inicialmente os suportes poliestireno e Amberlite foram submersos em hexano por um período de 30 min e mantidos sob agitação constante e posteriormente era filtrado. Este procedimento foi realizado com o intuito de remover a água destes suportes.

3.2.4.3 Ativação do Suporte Glioxil-Agarose

O suporte glioxil-agarose foi preparado por eterificação da agarose com glicidol e posterior oxidação com periodato de sódio, de acordo com metodologia proposta por Guisán (1988).

Sob agitação suave e em banho de gelo, 105 g de agarose foi adicionada a 30 mL de água destilada, 50 mL de NaOH 1,7 M, contendo 1,425 g de borohidreto de sódio (previamente preparado a frio) e 36 mL de glicidol, o qual foi adicionado lentamente

para evitar a elevação da temperatura acima de 10°C. A suspensão foi mantida sob agitação durante 15 h. O suporte eterificado (gliceril-agarose) foi lavado com água destilada e filtrado a vácuo. Em seguida, 105 g do gel foi ressuspenso em 895 mL de água (razão de suporte e suspensão de 1:10) e adicionado 3,21 g de periodato de sódio. Após 2 h de agitação suave à temperatura ambiente, o suporte de glioxil-agarose foi lavado com água destilada e seco por sucção a vácuo.

3.2.5 Imobilização de Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF)

3.2.5.1 Imobilização em Octil-Sílica, Poliestireno e Amberlite XAD 7HP

A imobilização consistiu no preparo de uma suspensão contendo solução enzimática preparada em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 e suporte (octil-sílica, poliestireno, e amberlite XAD 7HP), na proporção de 1:19 m/v (suporte:solução enzimática). Nestes ensaios a carga enzimática oferecida foi 5 mg de proteína/g de suporte (baixa carga) e 40 mg de proteína/g de suporte (alta carga). A suspensão foi mantida sob agitação suave a 25°C, conforme metodologia descrita por Bastida *et al.* (1998). Ao final, os derivados foram lavados e secos por sucção a vácuo. O monitoramento da imobilização foi realizado por medida de atividade hidrolítica (azeite de oliva emulsificado) do sobrenadante da imobilização e de uma solução enzimática (sem suporte) nas condições de imobilização (controle).

3.2.5.2 Imobilização em BrCN-Agarose

Inicialmente o suporte foi ativado através da sua suspensão em uma solução aquosa ácida (pH 2-3) por 1 h. O suporte ativado (RODRIGUES *et al.*, 2010) foi seco por filtração a vácuo. Em seguida, 4,2 g de BrCN-Agarose ativada foi adicionada a 36 mL da solução de LPF (5 mg de proteína/g de suporte, em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0) na presença de 0,5% (v/v) TRITON X 100 (TX). A mistura foi agitada a 4°C e 250 rpm por 20 min. Posteriormente, a solução foi removida por filtração, o derivado LPF-BrCN-Agarose foi ressuspenso em 15 mL de etanolamina 100 mM, pH 8,0 por 90 min, para bloquear os grupos imidocarbonatos não reagidos. O derivado foi recuperado por

filtração e lavado com água destilada em abundância. O monitoramento da imobilização foi realizado por medidas da atividade hidrolítica (*p*-NPB).

3.2.5.3 Imobilização em Glioxil-Agarose e Glioxil-Sepabeads

A imobilização de LPF em glioxil-agarose (GUISÁN, 1988) e glioxil-Sepabeads foi conduzida através da adição de 4,2 g de suporte e 36 mL de solução enzimática preparada em tampão bicarbonato de sódio 100 mM, contendo ou não 0,5% (v/v) de TRITON X-100 (TX). Três derivados foram preparados com estes suportes, todos com 5 mg de proteína/g de suporte. O primeiro foi preparado em pH 8,5 na presença de (TX); o segundo foi preparado inicialmente em pH 8,5, seguida da incubação a pH 10,5, mas na ausência de TX; o terceiro derivado foi preparado em pH 10,5 e 0,5% de TX. Em todos os casos, no final da reação, 36 mg de borohidreto de sódio foi adicionado. A imobilização foi monitorada por medidas da atividade hidrolítica (*p*-NPB).

3.2.5.4 Imobilização em Octil-Agarose e Octadecil-Sepabeads

A imobilização de LPF em octil-agarose e octadecil-Sepabeads foi realizada de acordo com metodologia descrita por Sabuquillo *et al*. (1998), que consiste na adição de 4,2 g de suporte e 36 mL de solução enzimática preparada em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0, contendo 5 mg de proteína/g de suporte. A mistura foi mantida sob agitação suave a 25°C. A imobilização foi monitorada por medidas da atividade hidrolítica (*p*-NPB).

Em cada caso, uma suspensão de referência (controle) foi preparada e submetida às condições de imobilizações. Em todas as preparações a atividade desta suspensão de referência mostrou 100% da atividade ao longo do tempo.

O monitoramento das imobilizações foi realizado por medidas de atividade hidrolítica (azeite de oliva emulsificado ou *p*-NPB) da solução enzimática inicial e durante o período de imobilização até medida constante da atividade do sobrenadante. Com estas medidas foi possível determinar a atividade oferecida na imobilização (A_0), a atividade não imobilizada (A_f), a atividade teoricamente imobilizada (A_t), o rendimento de imobilização (*RI*) e a atividade recuperada (*AR*). A atividade oferecida na imobilização foi calculada conforme a Equação 3.2:

$$A_0(U/g) = \frac{At_0 m_{pó}}{m} \tag{3.2}$$

onde At_0 é a atividade (U/g de pó) do preparado enzimático comercial (LPF), $m_{pó}$ é a massa de pó utilizada (g) na preparação da solução enzimática de imobilização e m é a massa de suporte (g).

Sabendo-se que a enzima solúvel não se inativa nas condições de imobilização estabelecidas, a atividade não imobilizada foi determinada de acordo com a Equação 3.3:

$$A_f(U/g) = \frac{At_f V}{m} \tag{3.3}$$

onde At_f é a atividade final do sobrenadante (U/mL) e V o volume do filtrado (mL).

A atividade teoricamente imobilizada (U/g) foi obtida pela Equação 3.4:

$$A_t(U/g) = A_0 - A_f \tag{3.4}$$

Para caracterização dos biocatalisadores obtidos, determinou-se o rendimento de imobilização pela Equação 3.5, enquanto que a atividade recuperada foi determinada pela Equação 3.6:

$$RI(\%) = \frac{A_t}{A_0}100 \tag{3.5}$$

$$AR(\%) = \frac{A_{der}}{A_t}100 \tag{3.6}$$

onde A_{der} é a atividade (U/g) efetivamente medida no derivado (LPF imobilizada).

3.2.6 Caracterização dos Suportes e Derivados (LPF Imobilizada)

3.2.6.1 Determinação da Área Superficial - Método de B.E.T.

A área superficial específica dos suportes e biocatalisadores foi medida pela adsorção física de nitrogênio sobre suas superfícies.

As áreas específicas foram calculadas pelo método B.E.T. (Brunauner, Emmett e Teller) no laboratório do grupo de Catálise do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos. Os experimentos foram realizados em um equipamento Quantachrome NOVA modelo 1200.

3.2.6.2 Análise Termogravimétrica

Esta análise foi realizada no laboratório do grupo de Catálise do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, utilizando-se um equipamento SDT 2960 SIMULTANEOUS DSC-TGA TA-INSTRUMENTS, na razão de aquecimento de $10^{o}C.min^{-1}$ até 1000°C e atmosfera de ar sintético.

3.2.6.3 Determinação da Umidade

A umidade dos suportes e derivados foi determinada usando uma balança de secagem automática da marca Marte®, modelo ID50, a partir de 1g de sólido com uma fonte de calor infravermelho até atingir uma temperatura constante de 105°C.

As umidades dos derivados são: LPF imobilizada em octil-sílica (LPF-octil-sílica) (1,75%), CALB IM (4,66%), LTL IM (1,94%) e LPF IM (2,13%).

3.2.6.4 Determinação da Hidrofobicidade

A hidrofobicidade dos suportes foi determinada pela massa de corante hidrofóbico rosa de bengala adsorvida por massa de suporte, conforme metodologia descrita por Gupta e Jabrail (2006). Para determinar a hidrofobicidade, uma massa fixa de suporte (0,15 g) foi adicionada em frascos contendo 20 mL de solução do corante rosa de bengala (20 µg/mL) e mantida sob agitação por 1 h à temperatura ambiente. Ao fim,

alíquotas do sobrenadante foram retiradas para quantificação da concentração de corante adsorvida, mediante leitura das absorbâncias das soluções iniciais e finais de corante a 549 nm. A concentração de corante rosa de bengala foi determinada através da absorbância medida comparando com uma curva padrão de soluções de rosa de bengala, mostrada no Apêndice A. As eficiências de adsorção de corante (*E*) foram determinadas conforme a Equação 3.7:

$$E(\mu g/m^2) = \left(\frac{C_{C\,sol} V_{sol} - C_{C\,sob} V_{sol}}{m_S} \right) \div AS \tag{3.7}$$

onde C_{Csol} é a concentração de corante na solução inicial , V_{sol} é o volume de solução de corante adicionado, C_{Csob} é a concentração de corante no sobrenadante final, m_S é a massa de suporte empregada e *AS* é a área superficial dos suportes.

3.2.6.5 Testes de Carregamento

Foram realizadas imobilizações de LPF em 0,5 g de octil-sílica (conforme metodologia do item 3.2.5.1) variando-se a atividade da solução enzimática oferecida/grama de suporte (4710 a 23550 U_{azeite}/g suporte, aproximadamente 50 a 270 mg de proteína/g suporte). O tempo de imobilização foi de aproximadamente 24 h, tempo necessário para atingir-se o equilíbrio da adsorção. Estes ensaios foram realizados em duplicata.

3.2.6.6 Ajuste da Isoterma de Langmuir aos Dados Experimentais de Adsorção

Isoterma de Langmuir (Equação 3.8, SLEJKO, 1985) foi ajustada aos dados experimentais do teste de carregamento, com o auxílio do *software OriginPro* 7.0.

$$q^* = \frac{q_m C^*}{K_L + C^*} \tag{3.8}$$

onde q^* é a atividade adsorvida no sólido (U_{azeite}/g), K_L é a constante de Langmuir (U_{azeite}/mL), q_m é a capacidade máxima de adsorção teórica na monocamada (U_{azeite}/g) e C^* é a atividade no equilíbrio (U_{azeite}/mL).

3.2.6.7 Estabilidade Térmica (Estimativa do Tempo de Meia-Vida)

O efeito da temperatura sobre a estabilidade da lipase solúvel e imobilizada foi determinado por meio de incubação da enzima livre e imobilizada (3 U_{azeite}/mL) a 60°C, em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0. Em intervalos definidos, as amostras foram retiradas e imediatamente resfriadas em banho de gelo para interromper a reação de inativação. Com os dados de atividade em função do tempo, a constante de inativação térmica foi calculada pela Equação 3.9, utilizando o método de ajuste exponencial não-linear de Sadana e Henley (1987).

$$Ar = (1-\alpha)e^{-K_d t} + \alpha \tag{3.9}$$

onde Ar é a atividade relativa (A/A_0); α é a razão entre a atividade enzimática do estado final (A) e a atividade enzimática do estado inicial (A_0); K_d é a constante de inativação térmica de primeira ordem (h^{-1}) e t é o tempo de incubação da solução enzimática (h).

O tempo de meia-vida da enzima, definido como tempo necessário para que ocorra uma redução de 50 % da atividade inicial, foi calculado pela Equação 3.10:

$$t_{1/2} = -\frac{1}{K_d}\ln\left(\frac{0{,}5-\alpha}{1-\alpha}\right) \tag{3.10}$$

onde $t_{1/2}$ é o tempo de meia-vida da enzima (h).

A estabilidade da lipase solúvel e imobilizada foi determinada por meio de incubação da enzima livre e imobilizada em octil-sílica em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0 e 36% (v/v) de etanol à temperatura de 45°C. Em intervalos definidos, as amostras foram retiradas e imediatamente resfriadas em banho de gelo para interromper a

reação de inativação. A constante de inativação térmica foi calculada pela Equação 3.9, e a meia-vida da enzima foi calculada pela Equação 3.10.

A estabilidade térmica da lipase imobilizada em octil-sílica foi determinada nas mesmas condições de síntese do biodiesel, utilizando 20 g de óleo de soja e etanol anidro, na razão molar de 1:7 e 0,2 g de biocatalizador/g de substrato (óleo e álcool). As reações foram conduzidas a 40°C com agitação de 500 rpm. Ao longo da reação foram retiradas alíquotas para medida de atividade, analisadas por hidrólise do azeite de oliva, até a inativação da enzima. Os biocatalisadores utilizados foram LPF imobilizada em octil-sílica baixa carga (5 mg de proteína/g de suporte) e alta carga (40 mg de proteína/g de suporte). A constante de inativação foi calculada pela Equação 3.9 e o tempo de meia-vida pela Equação 3.10.

Diferentes preparações imobilizadas de LPF (LPF-octadecil-Sepabeads e LPF-glioxil-Sepabeads) foram incubadas em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 a 65°C e mantidas sob agitação constante. Amostras foram retiradas ao longo do tempo e as atividades remanescentes foram analisadas pelo método de hidrólise do *p*-NPB.

Os derivados de LPF-octadecil-Sepabeads e LPF-glioxil-Sepabeads (0,1 g) foram suspensos em ciclohexano ou 2-metil-2-butanol e incubados a 60°C. Em diferentes tempos de incubação, estes biocatalisadores eram adicionados ao meio reacional de síntese do oleato de benzila, como descrito em 3.2.8.2, e acompanhado o seu desempenho na reação por HPLC através da formação de oleato de benzila ou consumo de álcool benzílico.

A inativação irreversível dos derivados de LPF preparados em glioxil-agarose (ausência e presença de TX) ou octil-agarose (0,4 g) foram suspensos em 5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0. Uma solução 1,45 mM de inibidor Dietil-*p*-nitrofenilfosfato (D-*p*NP) foi adicionada à suspensão e esta foi mantida sob agitação constante a 25°C. A reação foi monitorada até que houvesse um decréscimo na atividade da enzima imobilizada.

3.2.6.8 Estabilidade Operacional (Reuso)

Biodiesel de óleo de soja foi produzido por bateladas sucessivas de 24 h, usando o derivado LPF-octil-sílica nas condições de 40°C, 500 rpm de agitação, razão molar 1:7 (óleo:etanol) e 0,2 g de derivado/g de substrato. A cada término da reação o biocatalisador foi lavado com hexano e submetido à nova síntese.

Os derivados de LPF-octil-sílica, CALB IM, LTL IM e LPF IM foram reutilizados em oito sínteses consecutivas de butirato de butila, nas condições descritas em 3.2.3. A cada término da reação os biocatalisadores foram lavados com heptano e submetidos à nova síntese. A conversão da reação (após 24 h) foi calculada a partir do consumo de ácido, monitorado por titulação de 0,5 mL de amostra, nos diferentes tempos de síntese, diluída em 10 mL de uma solução de álcool:acetona (1:1 v/v), contendo fenolftaleína como indicador e tituladas com KOH 0,025 M, previamente padronizado. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. A conversão foi expressa em percentual molar do ácido consumido, empregando a Equação 3.11.

Os biocatalisadores imobilizados LPF-octil-sílica e CALB IM, foram reutilizados em cinco sínteses consecutivas do oleato de frutose a 45°C e em 10 mL de *terc*-butanol como solvente, agitação de 250 rpm, razão molar ácido graxo:carboidrato usando LPF-octil-sílica (1:1) e CALB (1:2), concentração de ácido de 25 mM e 0,5 g de biocatalizador. A cada término da reação os biocatalisadores foram lavados com *terc*-butanol e submetidos à nova síntese.

A conversão da reação foi calculada a partir do consumo de ácido, monitorado por titulação de 0,5 mL de alíquota, nos diferentes tempos de síntese, diluída em 10 mL de uma solução de álcool:acetona (1:1 v/v), contendo fenolftaleína como indicador e tituladas com KOH 0,01 M, previamente padronizado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A conversão foi expressa em percentual molar do ácido consumido, empregando a Equação 3.11.

3.2.6.9 Teste de Adsorção do Glicerol no Derivado LPF-Octil-Sílica

O derivado LPF-octil-sílica (0,5 g) foi suspenso em uma solução de glicerol (1,8 g) em álcool etílico (5,4 g) e mantido sob agitação de 500 rpm a 40°C por 72 h. As concentrações inicial e final de glicerol em solução foram quantificadas por HPLC em um cromatógrafo da marca Shimadzu SCL-10A, equipado com detector de índice de refração RID 10-A. A separação dos compostos foi realizada em uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) da Bio-Rad, utilizando como fase móvel ácido sulfúrico 5 mM a uma vazão de 0,6 mL/min e temperatura do forno a 45°C.

3.2.7 Eletroforese

Os perfis eletroforéticos de LPF solúvel e imobilizada nos suportes octil-sílica, poliestireno e XAD 7HP foram determinados por eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 14% (m/v), de acordo com metodologia de Laemmli, 1970. Amostras das soluções enzimáticas (20 μL) foram aquecidas 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 eletroforese. Na primeira canaleta foram aplicados 4 μL do marcador de massa molar BenchMark™ Protein Ladder 10-220 kDa (Life Technologies®). A corrida eletroforética foi realizada durante 90 min (tensão de 110 V para 0-20 min, e 140 V para 20-90 min) em uma cuba de eletroforese vertical (Mini-PROTEAN® 3), equipada com fonte de alimentação (Power PAC 1000 - BIORAD-USA) e contendo tampão de corrida (TRIS 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% (m/v), pH 8,3). A revelação dos géis eletroforéticos foi realizada com Coomassie Brilliant Blue R-250 (coloração por 30min) e ácido acético 7% (v/v) (descoloração por 12h).

No caso dos derivados de LPF, 8 mg foram suspensos em 80 μL de tampão de corrida e aquecidos por 5 min. Então, 20 μL do sobrenadante foram aquecidos por 5 min em tampão de ruptura.

3.2.8 Aplicações de Lipases Imobilizadas

3.2.8.1 Síntese do Oleato de Etila

Oleato de etila foi sintetizado a partir da reação de etanol (0,1 M) com ácido oleico (0,1 M) em heptano a 37°C. Foram utilizados os seguintes biocatalisadores: LPF-octil-sílica (baixa carga), LPF IM, CALB IM e LTL IM (carga enzimática de 106 U_{Est}/g de ácido) e LPF-octil-sílica (alta carga) (1% de derivado em relação ao volume do meio reacional) e 200 mg de peneira molecular, a 37ºC. A reação foi iniciada pela adição do biocatalisador ao meio reacional (10 mL) em frascos de vidro fechados e mantidos sob agitação de 250 rpm por um período máximo de 24 h. A conversão (*C*) da reação foi calculada (Equação 3.11) a partir do consumo de ácido, monitorado por titulação com KOH 0,025 M. Alíquotas de 0,5 mL do meio reacional eram coletadas em intervalos regulares de tempo e diluídas em 10 mL de uma solução de álcool:acetona (1:1 v/v), contendo fenolftaleína como indicador. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

$$C(\%) = \frac{mol_{t=0} - mol_{t=t}}{mol_{t=0}} 100 \tag{3.11}$$

onde $mol_{t=0}$ é o número de moles iniciais de ácido graxo no tempo 0 h e $mol_{t=t}$ é o número de moles finais de ácido graxo no tempo t.

3.2.8.2 Síntese de Oleato de Benzila

Oleato de benzila foi sintetizado por transesterificação entre azeite de oliva e álcool benzílico a 25ºC. Foram utilizados os seguintes biocatalisadores: LPF imobilizada em glioxil-Sepabeads (com e sem TX) e octadecil-Sepabeads. A mistura reacional era composta de 0,1 g de lipase imobilizada, 1,42 mL de solução de substrato (1 µmol de álcool benzílico e 2 µmol de azeite de oliva) em 9,94 mL de solvente orgânico (ciclohexano). Para garantir condições anidras, 100 mg de peneira molecular foram também adicionados à mistura reacional. A formação do oleato de benzila e o consumo de álcool benzílico foram acompanhados por HPLC.

Amostras da síntese de oleato de benzila foram analisadas por HPLC (*Spectra Physic* SP 100) com detector UV (*Spectra Physic* SP 8450) usando uma coluna de fase reversa (Ultrabase-C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel utilizada foi metanol:água:ácido acético (60:40:0,1, em volume) e a absorbância do UV foi monitorada a 254 nm. Neste comprimento de onda, os ácidos graxos e o glicerol não são adsorvidos As conversões das sínteses foram calculadas a partir das áreas dos picos correspondentes ao consumo de álcool benzílico (tempo de retenção (TR) de 5 min).

3.2.8.3 Síntese de Biodiesel

Biodiesel foi produzido por transesterificação entre óleo vegetal e etanol, catalisada por LPF imobilizada. A transesterificação do óleo de babaçu foi realizada utilizando os derivados de LPF-octil-sílica, LPF-poliestireno e LPF-XAD 7HP, temperatura de 40°C, 48 h de reação, agitação de 500 rpm, razão molar óleo:álcool de 1:7 e 0,2 g de catalisador/g substrato. A Tabela 3.1 mostra as condições operacionais da transesterificação do óleo de soja (temperatura, tempo de reação, agitação, razão molar óleo:etanol, razão mássica catalisador/substrato) e os biocatalisadores imobilizados. O meio reacional era composto por 20 g de óleo (soja ou babaçu) e etanol anidro, na razão molar 1:7 (MENDES *et al.*, 2012), biocatalisador e 1 g de peneira molecular, no caso de algumas sínteses com óleo de soja. As reações foram conduzidas em duplicata a 40°C com agitação constante por um período máximo de 72 h, com amostragem do meio reacional em intervalos regulares de tempo.

As amostras foram purificadas pela adição de água quente, repouso por 30 min e evaporação da água em rotaevaporador da fase leve (contendo ésteres etílicos). O rendimento das reações foi calculado pela Equação 3.12 a partir da formação de ésteres, analisados por cromatografia gasosa.

Tabela 3.1 Condições de síntese de biodiesel por etanólise de óleo de soja.

Biocatalisador	*T (°C)	Razão Molar óleo:etanol	Tempo de reação (h)	Agitação (rpm)	**E/S	***PM
LPF-octil-sílica	40	1:7	48	500	0,2	-
LTL IM	40	1:7	48	500	0,13	-
CALB IM	40	1:7	48	500	0,15	-
LPF-octil-sílica	40	1:7	72	500	0,2	+
LTL IM	40	1:7	72	500	0,13	+
CALB IM	40	1:7	72	500	0,15	+

*T = Temperatura do meio reacional

**E/S = razão enzimática/substrato (g de biocatalizador/g de óleo + etanol)

***PM = Peneira Molecular, (-) sem PM e (+) com PM

Fonte: Elaborada pela autora.

Ésteres etílicos foram analisados por cromatografia gasosa em um cromatógrafo a gás HP5890 com detector de ionização de chama, gás de arraste nitrogênio (N_2) e coluna capilar Restek Crossbond® Carbowax® *Polyethylene glycol* (15 m x 0,32 mm x 0,45 mm) como fase estacionária.

Amostras purificadas de biodiesel (250 mg) foram diluídas em 5 mL de solução (10 mg/mL) de heptadecanoato de etila (C17), sendo o volume de injeção 1 µL.

O rendimento da reação, em ésteres etílicos, foi calculado pela Equação 3.12:

$$R(\%) = \frac{\left(\sum A\right) - A_{EI}}{A_{EI}}\left(\frac{C_{EI}V_{EI}}{m}\right)100 \qquad (3.12)$$

onde R é o rendimento de ésteres etílicos; ΣA é a soma das áreas dos picos entre C14 e C24; A_{EI} é a área do heptadecanoato de etila (C17); C_{EI} é a concentração do heptadecanoato de etila (10 mg/mL); V_{EI} é o volume do heptadecanoato de etila (5 mL) e m é a massa de amostra (mg).

3.2.8.4 Síntese de Ésteres Aromatizantes

As sínteses dos ésteres aromatizantes foram realizadas de acordo com metodologia modificada de Abbas e Comeau (2003). As sínteses foram realizadas em fracos de vidro fechados contendo misturas de ácido graxo (butírico ou acético) e álcool (1-butanol, 1-hexanol, etanol ou isoamílico) dissolvidos em heptano (10 mL). As reações de esterificação foram realizadas a 37ºC, com o uso de 200 mg de peneira molecular e agitação de 250 rpm por 24 h. A razão molar ácido:álcool foi 1:1 e a concentração de ácido 0,1 M em presença de heptano. As enzimas utilizadas foram lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em octil-sílica (LPF-octil-sílica, baixa carga) e as lipases comerciais de *Candida antarctica* B IM (CALB IM), *Thermomyces lanuginosus* IM (LTL IM) e *Pseudomonas fluorescens* IM (LPF IM), com carga enzimática de 200 U_{Est}/g de ácido e LPF-octil-sílica (alta carga), com 1% de derivado no meio reacional. A conversão da reação foi acompanhada por titulometria (KOH 0,025 M), conforme descrito em 3.2.3.

Foi realizada uma síntese do butirato de butila, nas condições descritas anteriormente e a conversão foi calculada com base nos dados de cromatografia gasosa e titulação, a fim de se verificar a precisão do método titulométrico.

Na síntese do butirato de butila foram retiradas amostras em intervalos regulares de tempo e a conversão acompanhada por cromatografia gasosa em um cromatógrafo a gás HP5890 com detector de ionização de chama, gás de arraste nitrogênio (N_2) e coluna (temperatura de 60°C) capilar Restek Crossbond® Carbowax® *Polyethylene glycol* (15 m x 0,32 mm x 0,45 mm) com fase estacionária, sendo o volume de injeção 1 µL. A conversão da reação foi calculada a partir do consumo de álcool (butanol) na reação, para isto foi construída uma curva padrão de calibração de butanol em heptano com diferentes concentrações.

3.2.8.5 Síntese de Ésteres de Açúcares

As sínteses de ésteres de açúcares foram realizadas de acordo com metodologia modificada de Paula, Barboza e Castro (2005). As sínteses foram realizadas em fracos de vidro fechados contendo misturas de carboidrato (frutose ou lactose) e ácido graxo (oleico ou láurico) dissolvidos em diferentes solventes orgânicos (*ter*c-butanol ou 2-

metil-2-butanol) e lipase imobilizada de *Pseudomonas fluorescens* (LPF-octil-sílica) e a lipase comercial de *Candida antarctica* B (CALB IM). As reações foram conduzidas a temperatura de 45 e 55°C, por um período de 72 h, agitação constante de 250 rpm e 1,5 g de peneira molecular. As Tabela 3.2 eTabela 3.3 mostram as condições operacionais (temperatura, massa de biocatalisador, razão molar ácido:açúcar, ácido graxo, concentração de açúcar e os biocatalisadores imobilizados utilizados). A conversão da reação foi acompanhada por titulometria (KOH 0,01 M), conforme descrito em 3.2.3.

Tabela 3.2 Condições de esterificação do ácido oleico.

Biocatalisador	**Razão Molar Ácido:Açúcar**	**Concentração de Açúcar (mM)**	**Solvente (10 mL)**	***T °C**	****M**
LPF-octil-sílica	1:1	Frutose (25)	*terc*-butanol 2-metil-2-butanol	45	0,25; 0,5; 1,0
			terc-butanol	55	0,5
		Lactose (50)	*terc*-butanol 2-metil-2-butanol	45	0,5
	1:2	Frutose (50)	*terc*-butanol	45	0,5
	2:1	Frutose (25)			
CALB IM	1:1	Frutose (25)	*terc*-butanol 2-metil-2-butanol	45	0,5
		Lactose (50)			
	1:2	Frutose (50)	*terc*-butanol	45	0,25; 0,5; 1,0
				55	0,5
	2:1	Frutose (25)		45	

*T = Temperatura do meio reacional

**M = massa de biocatalisador (g)

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3.3 Condições de esterificação do ácido láurico.

Biocatalisador	**Razão Molar Ácido:Açúcar**	**Concentração de Açúcar (mM)**	**Solvente (10 mL)**	***T °C**	****M**
LPF-octil-sílica	1:1	Frutose (25)	*terc*-butanol 2-metil-2-butanol	45	0,5
		Lactose (50)			
CALB IM		Frutose (25)			
		Lactose (50)			

*T = Temperatura do meio reacional

**M = massa de biocatalisador (g)

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.8.6 Hidrólise de 2-Hidróxi-4-Fenilbutirato de Etila (HPBE)

A hidrólise de HPBE foi realizada de acordo com metodologia proposta por Fernández-Lorente *et al.* (2001), que consiste na adição de 0,5 g de lipase imobilizada em 10 mL de (*R,S*) HPBE 5mM em tampão de fosfato de sódio 25 mM, pH 7,5, a 25°C e sob agitação mecânica de 150 rpm. A estereoespecificidade da hidrólise foi analisada por HPLC-quiral, em um HPLC (*Spectra Physic* SP 100) equipado com detector UV (*Spectra Physic* SP 8450) a 225 nm. A coluna utilizada foi a Chiracel OD-R e a fase móvel uma mistura de acetonitrila (40%) e água (60%). A enantiosseletividade (valor *E*) foi calculada pelo excesso enantiomérico (*ee*) do éster remanescente e pela conversão (*c*) (Equações 2.4 e 2.5), como reportado por Chen *et al.* (1982).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os principais resultados obtidos neste trabalho de doutorado. Inicialmente são apresentados os resultados da caracterização dos suportes utilizados, no que se refere à umidade, área superficial, diâmetro dos poros e hidrofobicidade. Na sequência são apresentados os resultados das imobilizações de lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) nos diferentes suportes, bem como a caracterização dos derivados preparados com relação ao rendimento de imobilização, atividade recuperada, atividade hidrolítica e de esterificação e estabilidade térmica em diferentes condições. Em seguida, são apresentados os resultados das aplicações dos derivados preparados neste trabalho, bem como de enzimas imobilizadas comerciais, em reações de síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos, aromas e ésteres graxos de açúcares e resolução da mistura racêmica de (*R,S*)-2-hidróxi-4-fenilbutirato de etila (HPBE).

4.1 Caracterização do suporte

Conforme já mencionado anteriormente na revisão bibliográfica (seção 2.4.2), a escolha de um suporte é muito importante na imobilização de lipases. O diâmetro dos poros dos suportes merece destaque: eles devem ser suficientemente grandes para facilitarem a difusão das moléculas de enzima no interior da estrutura porosa durante o processo de imobilização e, ainda, evitar ou reduzir limitações difusionais de substrato ou produtos em diferentes reações (KENNEDY, 1987). Particularmente quando se pretende aplicações em meios com baixa porcentagem de água (síntese em meio orgânico) deve-se utilizar suportes hidrofóbicos, entretanto, mantendo uma mínima quantidade de água para manter a atividade da enzima (KLIBANOV, 2001). No caso de lipases, superfícies hidrofóbicas podem favorecer a imobilização da molécula de enzima na forma ativa, devido ao mecanismo de ativação interfacial das lipases (PALOMO *et al*., 2002.).

4.1.1 Características Morfológicas e Hidrofobicidade dos suportes

Os resultados de hidrofobicidade (eficiência de adsorção do corante rosa de bengala) e algumas características morfológicas dos suportes estudados estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Características morfológicas e hidrofobicidade dos suportes utilizados neste trabalho.

Suportes	**Umidade (%)**	**Área Superficial (m^2/g)**	**Diâmetro de Poro (Å)**	***Hidrofobicidade**
Poliestireno	51,49	647,80	91,80	0,93
XAD 7HP	25,37	330,00	64,00	7,43
Sílica	2,00	74,80	193,00	5,56
Octil-sílica	1,96	73,20	159,50	16,55

*Hidrofobicidade refere-se à quantidade do corante hidrofóbico rosa de bengala adsorvida por área superficial de suporte, expressa em $\mu g/m^2$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota-se na Tabela 4.1 que o poliestireno é o suporte que apresentou maior conteúdo de água, seguido pelos suportes XAD 7HP, sílica, octil-sílica. Particularmente em reações de esterificação e transesterificação (produção de biodiesel, por exemplo), água deve ser evitada, pois esta favorece reações de hidrólise, reduzindo o rendimento global da reação. Entretanto, quando essas reações são catalisadas por enzimas, a presença de pequena quantidade de água é necessária para manter a conformação nativa da enzima e, consequentemente, preservar a atividade enzimática. Neste trabalho não foi estudado a influência da quantidade de água em reações de esterificação e transesterificação; simplesmente os derivados foram tratados com solventes orgânicos (hexano, por exemplo) para reduzir a quantidade de água.

A partir da Tabela 4.1, verifica-se a seguinte ordem crescente de hidrofobicidade dos suportes: poliestireno < sílica < XAD 7 HP < octil-sílica. A derivatização da sílica com grupos octil resultou em um aumento de hidrofobicidade de aproximadamente 3 vezes, tornando o suporte derivatizado (octil-sílica) mais adequado à imobilização de lipases.

Além da hidrofobicidade do sólido, característica de particular importância na imobilização de lipases, o diâmetro dos poros dos suportes merece destaque. Estes devem ser suficientemente grandes para facilitarem a difusão das moléculas de enzima no interior da estrutura porosa durante o processo de imobilização e, ainda, evitar ou reduzir limitações difusionais de moléculas volumosas (substratos e/ou produtos) em diferentes reações biocatalíticas de interesse industrial, como por exemplo, síntese de ésteres etílicos

de ácidos graxos (biodiesel) a partir de triacilglicerídeos, síntese de biossurfactantes a partir de ácidos graxos e açúcares, dentre outras. Observa-se na Tabela 4.1 que a sílica possui poros com diâmetros de 2 a 3 vezes maiores em relação aos suportes poliestireno e XAD 7HP, característica esta que a torna mais adequada à imobilização de enzimas (biomacromoléculas). O suporte de poliestireno é o que possui maior área superficial, porém é o que apresenta menor hidrofobicidade.

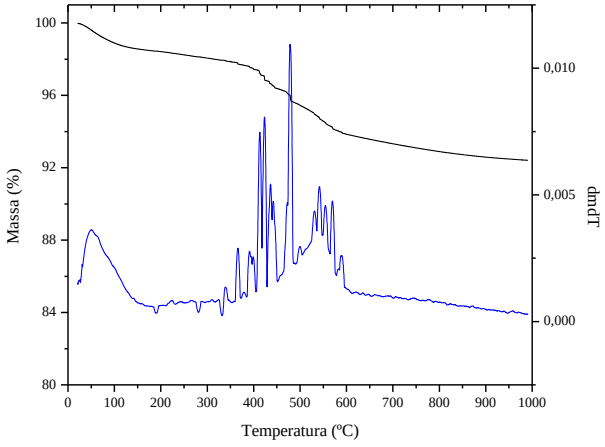
4.1.2 Análise Termogravimétrica

Grupos octil introduzidos na sílica por derivatização com ociltrietoxisilano foram constatados por análise termogravimétrica. Este método tem sido aplicado para estudar a cinética de decomposição de produtos (RODRIGUES *et al.*, 2005).

Na presença de O_2 a maioria dos compostos orgânicos se decompõe entre 300 e 600°C. Há relatos na literatura (LLER, 1979) que a sílica é estável termicamente até aproximadamente 1200°C. Dessa forma, qualquer perda de massa até atingir esta temperatura pode ser considerada devido aos grupos octil (no caso do suporte) ou devido a proteínas adsorvidas (no caso da enzima imobilizada).

Na Figura 4.1 encontram-se apresentadas as curvas TG/DTG do suporte octil-sílica em atmosfera de ar sintético.

Figura 4.1 Análise termogravimétrica do suporte octil-sílica (linha preta é a termogravimetria e linha azul é a termogravimetria derivada).



Fonte: Elaborada pela autora.

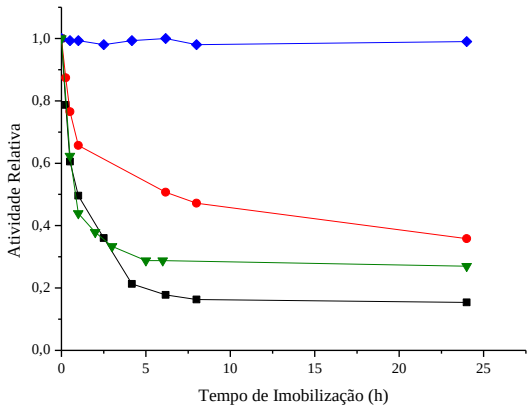
Mediante análise destes resultados, constata-se que de 0 a 200°C esta amostra continha 1,5% de água em sua estrutura. Existem vários eventos de perda de massa; os principais ocorreram a 420 e 480°C. Evento menor de perda de massa foi observado em 520°C. Entre 300 e 600°C observa-se uma perda de massa de 6,2% decorrente de matéria orgânica residual. De 600 a 1000°C a perda de massa foi de 1,2%, aproximadamente. Acima de 1000ºC a perda de massa é desprezível. Portanto, a perda de massa de 6,2% deve-se, provavelmente, aos grupos octil introduzidos na sílica.

4.2 Imobilização da LPF

Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) foi imobilizada em octil-sílica, poliestireno e XAD 7HP por adsorção hidrofóbica a 25ºC, pH 7,0 e baixa força iônica.

Na Figura 4.2 são mostradas as curvas de desaparecimento da atividade hidrolítica dos sobrenadantes das suspensões preparadas, bem como a atividade do controle (enzima solúvel). Observa-se que a LPF solúvel manteve-se totalmente ativa nas condições de imobilização, podendo-se assim inferir que a queda de atividade no sobrenadante deve-se exclusivamente à imobilização da enzima.

Figura 4.2 Perfil da atividade hidrolítica dos sobrenadantes das suspensões de imobilização de LPF a 25°C, tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 em octil-sílica (■), poliestireno (●), XAD 7HP (▼) e controle (♦).



Fonte: Elaborada pela autora.

Após 24 h, as imobilizações em octil-sílica e XAD 7HP atingiram o equilíbrio, rendendo aproximadamente 91 e 76% de imobilização, respectivamente. Entretanto, a imobilização em poliestireno exige um tempo adicional para atingir este estado. Esse comportamento está de acordo com a hidrofobicidade dos suportes. Dentre os três suportes testados, poliestireno é o menos hidrofóbico (poliestireno < XAD 7HP < octil-sílica, Tabela 4.1), o que justifica a menor velocidade de imobilização neste suporte.

Os resultados de rendimento de imobilização (RI), atividade recuperada (AR) e atividade hidrolítica medida no derivado (AH) estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Resultados das imobilizações de LPF em XAD 7HP, octil-sílica e poliestireno a 25 °C, pH 7 (tampão fosfato de sódio 5 mM), 24 h. Carga oferecida igual a 5 mg de proteína/g de suporte.

Suportes	**RI (%)**	**AR (%)**	**A_H (U/g)**
XAD 7HP	75,80 ± 1,90	26,80 ± 3,20	221,10 ± 20,60
Octil-Sílica	91,30 ± 0,30	82,10 ± 1,50	650,00 ± 15,50
Poliestireno	60,50 ± 5,10	15,50 ± 0,20	79,60 ± 7,80

RI = rendimento de imobilização; AR = atividade recuperada; A_H = atividade hidrolítica.

Fonte: Elaborada pela autora.

É bem conhecido o fenômeno de ativação interfacial de lipases na presença de interfaces hidrofóbicas, tais como, gotas de óleos, bolhas de gás, superfície hidrofóbica de suportes, etc. (AL-DURI *et al.*, 1995; BASTIDA *et al.*, 1998; PALOMO *et al.*, 2002; PALOMO *et al.*, 2003a). Esse fenômeno não foi aparentemente observado para LPF na presença de poliestireno, XAD 7HP e octil-sílica, pois todas as atividades recuperadas ficaram abaixo de 100%. Entretanto, a hiperativação (imobilização da lipase na conformação aberta) pode não ter sido evidenciada devido ao fato da atividade hidrolítica ter sido acompanhada com substrato macromolecular (azeite de oliva), enquanto na literatura os substratos mais usuais são butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB) e propionato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP). A imobilização por adsorção interfacial é orientada pela região mais hidrofóbica da enzima, ou seja, o lado interno da cadeia polipeptídica (tampa) que protege o sítio ativo. Na presença de superfícies hidrofóbicas a tampa se abre, expondo os resíduos hidrofóbicos de aminoácidos, os quais podem interagir com a superfície (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2003). Segundo esse mecanismo, o sítio ativo da lipase estaria voltado

para o suporte, causando, provavelmente, impedimento estérico para substratos macromoleculares (BASTIDA *et al.,* 1998). Além disso, a hiperativação depende do substrato utilizado. De fato, Palomo *et al.* (2002) reporta hiperativação de lipases de *Candida rugosa* (CRL), *Candida antarctica* B (CALB) e *Mucor miehei* (MML) imobilizadas em octadecil-Sepabeads na hidrólise de etil-butirato. Entretanto, na hidrólise de *p*-nitrofenilpropionato nenhuma ativação (para CRL e CALB) ou ativação muito menor (MML) foram constatadas. Segundo os pesquisadores, etil-butirato é um composto pequeno e hidrofóbico e poderia acessar facilmente o sítio ativo da enzima.

Embora uma hiperativação da LPF imobilizada não tenha sido evidente, a imobilização em octil-sílica rendeu um derivado com alta recuperação de atividade (82,1%) e alta atividade de hidrólise de azeite de oliva (650 U/g). Esse resultado é superior, por exemplo, ao obtido por Mendes *et al.* (2012), os quais imobilizaram diferentes lipases microbianas em gel de PHB, obtendo em torno de 9-91% de atividade recuperada (atividade medida com azeite de oliva). A recuperação de atividade de LPF imobilizada em octil-sílica também é superior àquela obtida por Blanco *et al.* (2004), que imobilizaram lipase de *Candida antarctica* B em octil-sílica e obtiverem recuperação máxima de atividade de 48,6% (atividade medida com propionato de *p*-nitrofenila, *p*-NPP).

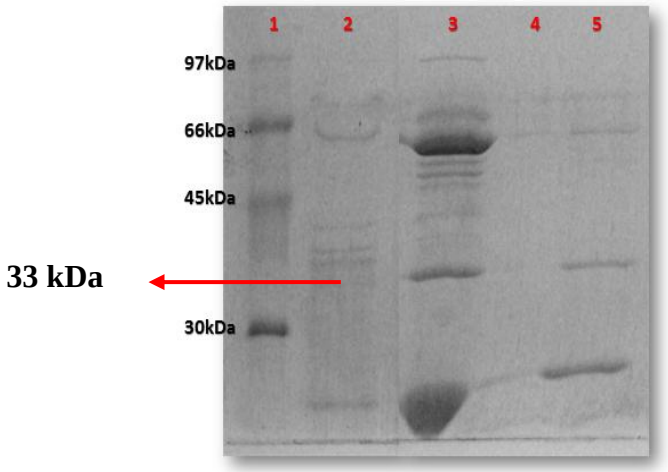
A baixa atividade recuperada dos derivados preparados em poliestireno (15,5%) e XAD 7HP (26,8%) deve-se provavelmente, a maior área superficial destes suportes, com isso a lipase pode ser distorcida, pois quanto maior a área mais a molécula de lipase pode interagir por meio de seus bolsões hidrofóbicos, o que distorce a sua estrutura nativa. Este efeito tem sido descrito por Mendes *et al.* (2012) e Bosley e Peilow (1997).

4.3 Eletroforese

Bastida *et al.* (1998) e Palomo *et al.* (2002) reportam que a imobilização de lipases em superfícies hidrofóbicas consiste em um método simples para purificação e hiperativação de lipases. Devido ao mecanismo de ativação interfacial destas enzimas, na presença de suportes hidrofóbicos e força iônica muita baixa, lipases seriam seletivamente imobilizadas nesses suportes a partir de uma preparação enzimática bruta.

LPF solúvel e imobilizada em octil-sílica, XAD 7HP e poliestireno foram analisadas quanto a seus perfis eletroforéticos. A Figura 4.3 mostra a imagem do gel de eletroforese SDS-PAGE destes biocatalisadores.

Figura 4.3 Eletroforese SDS-PAGE de LPF usando gel de poliacrilamida 14%. Pista 1: padrão de massa molecular em kDa; pista 2: Solução de LPF; pista 3: lipase imobilizada em octil-sílica (8 mg); pista 4: lipase imobilizada em poliestireno (8 mg) e pista 5: lipase imobilizada em XAD 7HP (8 mg).



Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se observar que a enzima na forma comercial apresenta uma banda em torno de 33 kDa, que concorda com a massa molecular da LPF reportada na literatura (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2003; KOJIMA *apud* SALIS *et al.*, 2009). Entretanto, as enzimas imobilizadas apresentaram outras proteínas contaminantes, particularmente em torno de 66 kDa. Esta banda é muito mais expressiva no derivado LPF-octil-sílica (pista 3). Podemos inferir que essas proteínas possuem uma região altamente hidrofóbica em sua superfície para terem sido imobilizadas em um suporte hidrofóbico sob força iônica muito baixa. Essas proteínas são contaminantes ou proteínas hidrofóbicas propositalmente adicionadas pelo fabricante para estabilizar e/ou ativar a LPF, pois é conhecido o fato de lipases serem ativadas na presença de superfícies hidrofóbicas, incluindo proteínas hidrofóbicas e lipopolisacarídeos (PALOMO *et al.*, 2003a).

Observa-se na Figura 4.3 uma diferença na intensidade das bandas para os diferentes derivados (pistas 3 a 5). Foram utilizadas na eletroforese igual massas de derivados (8 mg) e em suas imobilizações igual carga proteica (5 mg/g de suporte).

Portanto, o resultado da eletroforese corrobora com os resultados de rendimento de imobilização e recuperação de atividade (octil-sílica > XAD 7HP > poliestireno). Inclusive, para LPF imobilizada em poliestireno (pista 4) a banda referente à LPF não é sequer perceptível, corroborando com o fato de ter havido eluição da enzima na etapa de lavagem do derivado.

LPF imobilizada em octil-sílica rendeu derivados com atividade hidrolítica superior aos demais derivados. Octil-sílica, com alta hidrofobicidade e poros grandes (Tabela 4.1), mostrou-se mais adequado à imobilização de lipases, o que pode ser constatado pelo maior rendimento de imobilização e recuperação de atividade (Tabela 4.2). Além disso, suportes a base de sílica são adequados para uso em solventes orgânicos e diferentes configurações de reatores (tanque agitado, leito fixo, leito fluidizado, etc.). Dessa forma, selecionou-se esse suporte para testes de carregamento e os derivados preparados em octil-sílica (baixa carga ou alta carga) para ensaios de inativação térmica, produção de biodiesel, aromas, ésteres de açúcares, etc.

4.4 Carregamento de Octil-Sílica e Ajuste de Isoterma de Adsorção

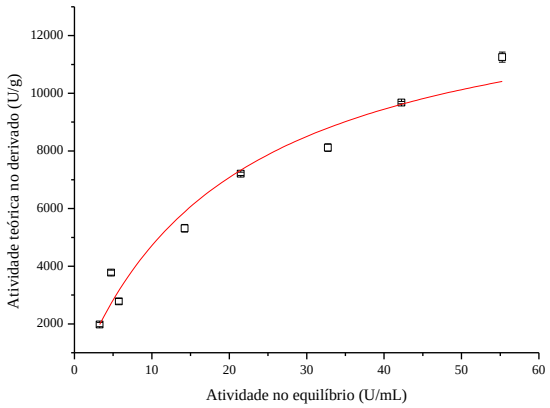
LPF foi imobilizada em octil-sílica, variando-se a carga enzimática oferecida (4710 a 23550 U_{azeite}/g suporte, aproximadamente 50 a 270 mg de proteína/g suporte), a 25ºC, pH 7,0, baixa força iônica (5 mM) e 24 h (tempo para atingir o equilíbrio da adsorção em todos os carregamentos).

A Figura 4.4 mostra que a isoterma de Langmuir ajustou-se aos dados experimentais (atividade do sobrenadante no equilíbrio *versus* atividade teórica no suporte), evidenciando que a adsorção de LPF sobre octil-sílica ocorre em monocamadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Blanco *et al.* (2004), os quais imobilizaram lipase de *Candida antarctica* B em octil-sílica e verificaram pelo ajuste da isoterma de Langmuir aos dados experimentais, até um carregamento de 200 mg proteína/g de suporte, que a adsorção das moléculas de enzima ocorre em monocamadas.

Os parâmetros do modelo de Langmuir (K_L e q_m) estão listados na Tabela 4.3. A capacidade máxima do suporte, dada pelo parâmetro q_m, foi de 14193 U_{azeite}/g de suporte, o que corresponde a aproximadamente 168 mg de proteína/g de suporte (a atividade específica da LPF da Amano é em torno de 85 U_{azeite}/mg). Experimentalmente, o

derivado mais carregado apresentou uma atividade teórica de (11256 ± 176) U_{azeite}/g, o que corresponde a aproximadamente 130 mg de proteína/g de suporte.

Figura 4.4 Ajustes da isoterma de Langmuir aos dados experimentais de adsorção de LPF sobre a superfície hidrofóbica de octil-sílica a 25 °C, tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4.3 Parâmetros da isoterma de Langmuir ajustada aos dados experimentais de adsorção de LPF sobre octil-sílica (25ºC, pH 7,0, 24h).

Suporte	**R^2**	**q_m (U/g)**	**K_L (U/mL)**
Octil-Sílica	0,977	14193 ± 1141	20,09 ± 4,07

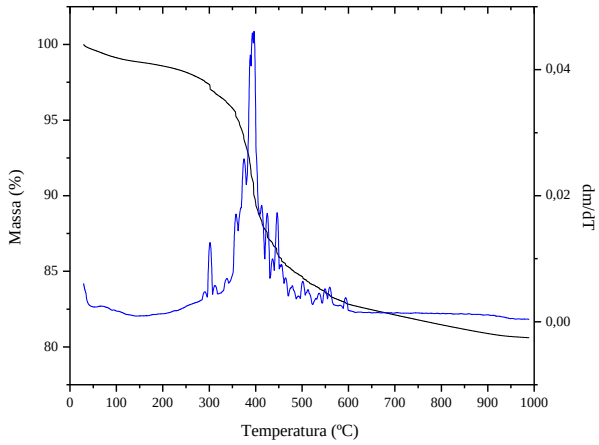
R^2 = coeficiente de correlação

Fonte: Elaborada pela autora.

O derivado LPF-octil-sílica (alta carga) foi analisado quanto à umidade, área superficial, tamanho de poros e termogravimetria. O derivado apresentou umidade de 1,75%, após tratamento com hexano. A área superficial reduziu de 73,20 m^2/g (Tabela 4.1) para 46,10 m^2/g, comprovando adsorção da LPF ao suporte. O diâmetro de poro também sofreu uma redução de 159,50 Å (Tabela 4.1) para 115,50 Å. Mesmo com essa redução, a porosidade do derivado é adequada para a acessibilidade de macromoléculas (substratos e produtos). A redução na área superficial de octil-sílica também foi observada por Blanco *et al.* (2004), que estudaram a funcionalização de sílica mesoporosa para a imobilização de lipase de *Candida antarctica* B.

Na Figura 4.5 encontram-se apresentadas as curvas TG/DTG do derivado de LPF-octil-sílica, preparado com alta carga, em atmosfera de ar sintético.

Figura 4.5 Análise termogravimétrica do derivado LPF-octil-sílica (linha preta é a termogravimetria e linha azul é a termogravimetria derivada).



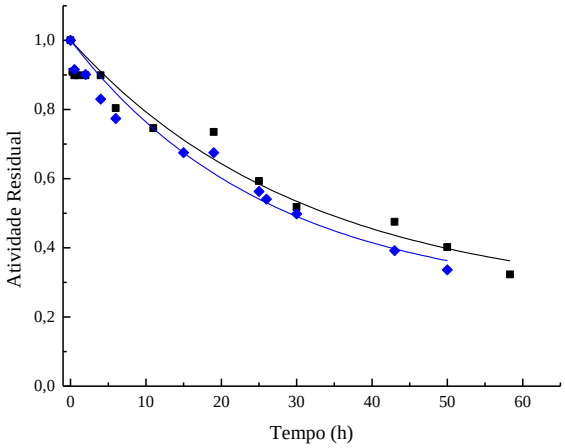
Fonte: Elaborada pela autora.

De 0 a 200ºC o derivado perdeu 1,6% de massa, devido à agua em sua estrutura. Entre 300 e 600°C observa-se uma perda de massa em torno de 17,1%. Entretanto, o principal evento de perda de massa foi observado em 395°C (15,5%), com eventos menores em 420 e 450°C. Com perda de massa devido aos grupos octil corresponde a 6,2% (indicado pela análise termogravimétrico do suporte sem enzima), pode-se concluir que uma perda de massa de 9,3% foi devida à enzima adsorvida ao suporte. Blanco *et al.* (2007), também observaram uma perda de massa de 14% na faixa de temperatura de 200 e 400°C, associando essa perda à carga enzimática do suporte.

4.5 Estabilidade Térmica da LPF (Estimativa do Tempo de Meia-Vida)

A estabilidade térmica de LPF solúvel e imobilizada em octil-sílica foi investigada em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0, 60ºC. A Figura 4.6 mostra as curvas de inativação térmica desses biocatalisadores.

Figura 4.6 Perfil de inativação térmica a 60ºC, tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0 de LPF solúvel (■) e imobilizada em octil-sílica (♦).



Fonte: Elaborada pela autora.

O modelo de Sadana e Henley (1987) foi ajustado aos dados experimentais e usado para estimar o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$, Equação 3.10) da LPF solúvel e LPF-octil-sílica. Os resultados são mostrados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 Tempo de meia-vida a 60°C, pH 7,0, da LPF solúvel e LPF-octil-sílica.

	LPF Solúvel	**LPF-Octil-Sílica**
$t_{1/2}$ (h)	34,0	29,0

Fonte: Elaborada pela autora.

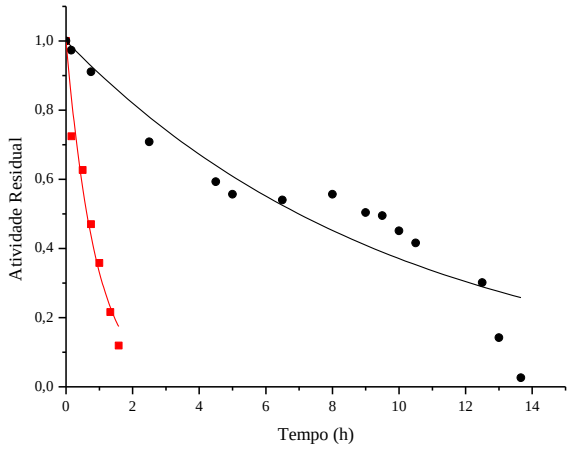
A Figura 4.6 mostra perfis semelhantes de inativação para LPF em ambas as formas (solúvel e imobilizada), rendendo tempos de meia-vida muito próximos (Tabela 4.4). Dois fatores podem ter contribuído para a estabilidade da enzima solúvel: (i) lipases em solução, dentre elas LPF, tendem a formar agregados bimoleculares (MM em torno de 66 kDa para LPF), os quais são menos ativos e mais estáveis que a forma monomolecular da enzima (PALOMO *et al.*, 2003a; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2003); (ii) a enzima solúvel pode conter proteínas estabilizantes em sua formulação, como por exemplo, albumina, que é usada para estabilizar soluções enzimáticas (BLANCO *et al.*, 2004). Essa última hipótese é reforçada pela banda em torno de 66 kDa observada na eletroforese (Figura 4.3) da LPF solúvel e imobilizada em octil-sílica.

Embora a imobilização hidrofóbica interfacial de lipases possa render derivados estáveis, devido a forte interação que pode ser estabelecida entre proteína e suporte, a comparação da estabilidade do derivado com a enzima solúvel fica prejudicada devido aos efeitos citados acima que podem estar presentes na preparação enzimática solúvel.

4.6 Estabilidade Térmica da LPF na Presença de Etanol

A estabilidade térmica de LPF solúvel e imobilizada em octil-sílica foi investigada a 45ºC, pH 8,0 (tampão fosfato de sódio 100 mM) e na presença de 36% (v/v) de etanol. As curvas de inativação térmica são mostradas na Figura 4.7.

Figura 4.7 Perfil de inativação térmica a 45°C (pH 8,0) na presença de etanol (36%, v/v) da LPF solúvel (■) e imobilizada em octil-sílica (●).



Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 4.5 apresenta os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) dos biocatalisadores, estimados a partir do modelo de Sadana e Henley (1987), ajustados aos dados experimentais de inativação térmica.

Tabela 4.5 Tempo de meia-vida de LPF solúvel e LPF-octil-sílica a 45°C, pH 8,0 e na presença de etanol (36%, v/v).

	LPF Solúvel	**LPF-Octil-Sílica**
$t_{1/2}$ (h)	0,66	7,76

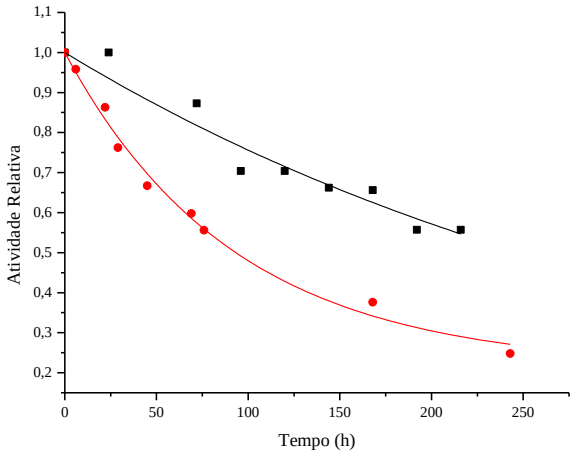
Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se na Tabela 4.5 que o derivado preparado em octil-sílica apresentou um tempo de meia-vida aproximadamente 12 vezes maior ao da enzima solúvel. Neste caso, a LPF solúvel, mesmo na possível presença de agregados bimoleculares e de proteínas estabilizantes, não se pode preservar do efeito inativante do etanol. A estabilidade do derivado LPF-octil-sílica na presença deste solvente orgânico o torna adequado a muitas bioconversões de interesse comercial, nas quais etanol age como solvente ou substrato, tais como, síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos (biodiesel) e aromas (butirato de etila, por exemplo).

4.7 Estabilidade Térmica do Derivado de LPF-Octil-Sílica nas Condições de Síntese de Biodiesel

Visando à utilização do derivado LPF-octil-sílica na síntese de biodiesel, a estabilidade térmica deste derivado (com baixa e alta carga enzimática) foi investigada na presença de óleo de soja e etanol (razão molar 1:7) a 40ºC. As curvas de inativação térmica são mostradas na Figura 4.8.

Figura 4.8 Perfil de inativação a 40°C de LPF-octil-sílica, baixa (●) e alta (■) carga (5 e 40 mg de proteína/g de suporte, respectivamente) na presença de óleo de soja e etanol (razão Molar 1:7).



Fonte: Elaborada pela autora.

A partir das curvas de inativação (modelo de Sadana e Henley, 1987, ajustado aos dados experimentais), estimou-se o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da LPF-octil-sílica imobilizada com baixa e alta carga enzimática. Os resultados são mostrados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 Tempo de meia-vida a 40°C da LPF-octil-sílica na presença de óleo de soja e etanol (razão molar 1:7).

	Baixa carga (5 mg de proteína / g de suporte)	**Alta carga (40 mg de proteína / g de suporte)**
$t_{1/2}$ (h)	93,3	249,3

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se na Tabela 4.6 que o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da LPF imobilizada em alta carga foi em torno de 2,7 vezes maior em relação à LPF imobilizada em baixa carga. Isso se deve possivelmente à presença de efeitos difusivos na medida da atividade da enzima imobilizada em alta carga, ou seja, a velocidade da reação é mais alta que a de difusão, devido à alta concentração de enzima por volume de catalisador. Consequentemente, a velocidade aparente é menor que aquela esperada para a correspondente concentração de enzima. À medida que parte da enzima inativa-se, a

velocidade de reação diminui, mas o sistema continua controlado pela difusão do reagente, com uma maior estabilidade térmica aparente do sistema. Este efeito torna-se atrativo do ponto de vista industrial, pois o biorreator poderá ser operado por maior tempo (caso o processo seja contínuo) ou por maior número de ciclos (caso o processo seja batelada) com a mesma carga catalítica (mesma massa de biocatalisador no reator).

4.8 Atividades de Esterificação e Hidrólise de Lipases Imobilizadas

A atividade de esterificação do derivado LPF-octil-sílica, bem como de lipases imobilizadas comerciais (LPF IM, CALB IM, LTL IM), foi medida a 37ºC na síntese de butirato de butila a partir de butanol e ácido butírico (razão molar 1:1), em heptano. As atividades hidrolíticas foram medidas a 25ºC, pH 7,0, na hidrólise de butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB). A Tabela 4.7 mostra os valores das atividades hidrolíticas e de esterificação, medidas conforme descrito em Materiais e Métodos.

Tabela 4.7 Atividades hidrolíticas e de esterificação de lipases imobilizadas.

Derivados	**Atividade de Hidrólise ($U_{p\text{-NPB}}/g$)[1]**	**Atividade de Esterificação (U_{Est}/g)[2]**
LPF-octil-sílica[3]	59,0	16,4
CALB IM	62,0	586,5
LTL IM	132,0	96,5
LPF IM	37,0	50,0

[1] $U_{p\text{-NPB}}$ = atividade a 25ºC, pH 7,0 na hidrólise de *p*-NPB.

[2] U_{Est} = Unidade de esterificação, definida como a taxa de formação de 1 μmol de butirato de butila por min a 37ºC a partir de 1-butanol e ácido butírico (razão molar 1:1), em heptano.

[3] Foi utilizado derivado com baixa carga (5 mg de proteína/g de suporte).

Fonte: Elaborada pela autora.

As lipases comerciais imobilizadas de *Candida antarctica* B (CALB IM) e *Thermomyces lanuginosus* (LTL IM) apresentaram maior atividade de esterificação, sendo que para a CALB IM esta atividade foi em torno de 9 vezes superior à atividade hidrolítica. Lipases imobilizadas de *Thermomyces lanuginosus* (LTL IM) e *Candida antarctica* B (CALB IM) também apresentaram maior atividade de hidrólise.

Comparando as duas lipases de *P. fluorescens* (Tabela 4.7) observa-se propriedades catalíticas distintas: LPF IM (LPF imobilizada covalentemente em resina acrílica ativada com grupos epóxidos) apresentou maior atividade de esterificação e LPF-octil-sílica (LPF adsorvida hidrofobicamente em sílica funcionalizada com grupos octil) apresentou maior atividade de hidrólise. Palomo *et al.* (2003a) reporta que as propriedades catalíticas de uma lipase podem ser alteradas por técnicas de imobilização que promovam diferentes orientações da enzima ao suporte, ou seja, imobilização através de diferentes regiões de sua superfície. No derivado LPF-octil-sílica, a enzima é orientada ao suporte pela sua região mais hidrofóbica (lado interno da tampa que protege o sítio ativo) e no derivado LPF IM a enzima é orientada pela sua região mais rica em grupos $–NH_2$, –OH, –SH, etc. (MATEO *et al.*, 2000).

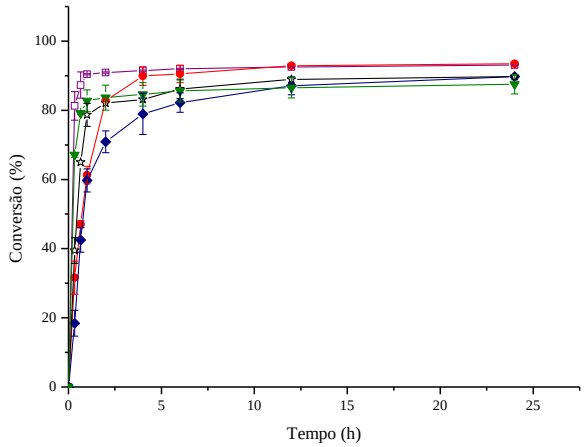
4.9 Síntese do Oleato de Etila

Além da hidrólise de triacilglicerídeos, importante para o metabolismo de gorduras, lipases podem ser usadas em outras aplicações de interesse industrial, tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico. Por exemplo, lipases podem ser usadas na síntese de ésteres de ácidos graxos como ingredientes para cosméticos ou surfactantes, síntese de intermediários "chaves" na química orgânica ou farmacêutica, tais como, álcoois, ácidos carboxílicos e aminas quirais (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al*., 1998).

De acordo com Hazarika *et al.* (2002), os ésteres etílicos (oleatos) podem ser utilizados como plastificantes, lubrificantes e fluidos hidráulicos. Doymaz (2004) e Lewicki (2006) reportam que oleato de etila pode ser utilizado na desidratação osmótica de tomates e pimentões, promovendo a perda de água, e consequentemente, induzindo o aumento no teor de açúcar, bem como lhes conferindo uma cor luminosa.

Neste contexto, LPF imobilizada em octil-sílica foi utilizada na síntese de oleato de etila e a conversão da reação de esterificação comparada com aquelas obtidas por lipases imobilizadas disponíveis comercialmente (LTL IM, CALB IM e LPF IM). A reação foi conduzida a 37ºC, por 24 h, 250 rpm e com uma razão molar ácido oleico:etanol de 1:1. Os perfis de conversão com o tempo são mostrados na Figura 4.9.

Figura 4.9 Conversão da síntese de oleato de etila, a 37°C, 24 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1, usando LTL IM (□), LPF IM (●), CALB IM (♦), LPF-octil-sílica baixa carga (☆) (carga enzimática de 106 U_{Est}/g de ácido) e LPF-octil-sílica alta carga (▼) (1% de derivado).



Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se observar na Figura 4.9 que todos os derivados foram eficientes na síntese de oleato de etila, chegando a conversões na ordem de 87-93% após 12 horas de reação. Após 1 h de reação, LTL IM atingiu uma conversão de aproximadamente 90% e LPF-octil-sílica em torno de 80%. As lipases comerciais CALB IM e LPF IM renderam uma conversão da ordem de 60% no mesmo período de tempo.

Neste trabalho, lipase de *Pseudomonas fluorescens* foi imobilizada em suportes sólidos porosos visando a sua aplicação em meio orgânico (baixa porcentagem de água) e em meio aquoso. Para o primeiro caso, LPF foi imobilizada em suportes hidrofóbicos, visando particularmente a sua aplicação na síntese de biodiesel, aromas e ésteres graxos de açúcares; no segundo caso, LPF foi imobilizada em suportes hidrofílicos visando sua aplicação em hidrólise enantiosseletiva. Os próximos tópicos deste trabalho abordarão essas aplicações, mostrando os principais resultados obtidos com os biocatalisadores preparados e comparando-os com biocatalisadores imobilizados disponíveis comercialmente.

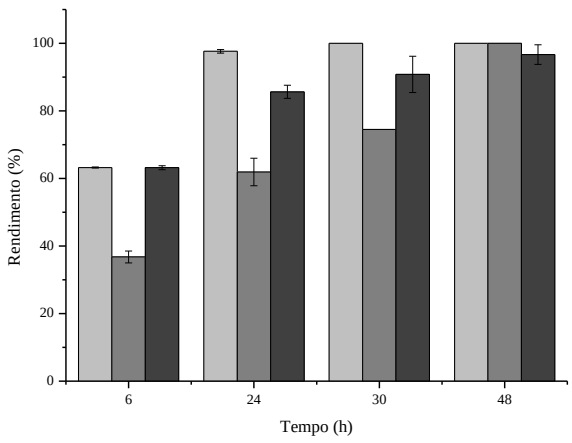
4.10 Síntese de Biodiesel

Na síntese de biodiesel por via etanólica, foram utilizadas duas fontes de triacilglicerídeos, óleo de babaçu e óleo de soja. No primeiro caso, utilizaram-se LPF imobilizada em octil-sílica, XAD 7HP e poliestireno, com atividades aparentes de 1574, 635 e 582 U_{azeite}/g de suporte, respectivamente. Os derivados comerciais selecionados para comparação foram CALB IM e LTL IM.

Todas as reações foram processadas a 40ºC, razão molar óleo/álcool 1:7, 500 rpm, 0,2 g de biocatalisador/g de substrato, na ausência ou na presença de peneira molecular. A Figura 4.10 mostra o rendimento da reação de transesterificação do óleo de babaçu em ésteres etílicos (biodiesel) com o tempo.

Todos os derivados atingiram um rendimento em torno de 100% após 48 horas de reação. As diferenças nos rendimentos com o tempo devem-se a cargas enzimáticas distintas no reator. Como foram utilizados 0,2 g de biocatalisador/g de substrato em todas as sínteses, a carga enzimática efetiva no reator era de aproximadamente 116, 127 e 315 U_{azeite}/g de substrato, respectivamente para LPF-poliestireno, LPF-XAD 7HP e LPF-octil-sílica.

Figura 4.10 Rendimento de transesterificação de óleo de babaçu em ésteres etílicos a 40ºC, razão molar óleo:etanol igual a 1:7, agitação de 500 rpm e carga enzimática de 0,2 g de biocatalisador/g de substrato. Reações catalisadas por LPF-octil-sílica (■), LPF-XAD 7HP (■) e LPF-Poliestireno (■).



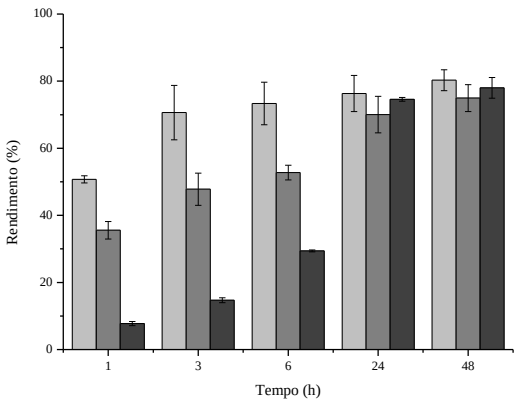
Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando a Figura 4.10, observa-se que com 24 h de reação o derivado LPF-octil-sílica apresentou um rendimento em torno de 100%, enquanto os demais derivados alcançaram este rendimento em 48 h de reação. Observa-se também que após 6h de reação, o derivado LPF-poliestireno apresentou um rendimento semelhante ao do derivado LPF-octil-sílica, mesmo com uma carga enzimática no reator 2,7 vezes menor. A diferença mais significativa do poliestireno para o octil-sílica é a maior umidade do primeiro. Neste contexto, seria interessante estudar-se futuramente o desempenho do biocatalisador LPF-octil-sílica na síntese de biodiesel controlando sua porcentagem de água. XAD 7HP, embora tenha umidade maior que a do octil-sílica, apresenta poros menores (64 Å), podendo possivelmente apresentar problemas difusionais.

Mendes *et al.* (2012) obtiveram rendimentos similares ao obtido neste trabalho (100%) na transesterificação de óleo de babaçu e etanol (razão molar 1:9) a 45ºC, 72 h, catalisada por LPF imobilizada em esferas grandes de PHB. Paula *et al*. (2007) obtiveram rendimento de 75% na transesterificação de óleo de babaçu e etanol (razão molar 1:10) a 40ºC, 48 h, catalisada por lipase de pâncreas de porco imobilizada em POS-PVA ativada com glutaraldeído.

A Figura 4.11 mostra os rendimentos das reações de transesterificação com o tempo do óleo de soja em ésteres etílicos (biodiesel), utilizando LPF-octil-sílica e as lipases comerciais imobilizadas CALB IM e LTL IM, na ausência de peneira molecular.

Figura 4.11 Rendimento de transesterificação de óleo de soja em ésteres etílicos a 40ºC, razão molar óleo:etanol igual a 1:7, agitação de 500 rpm, sem peneira molecular. Reações catalisadas por LPF-octil-sílica (■), LTL IM (■) e CALB IM (■) (carga enzimática de 0,2; 0,13 e 0,15 g de biocatalisador/g de substrato, respectivamente).



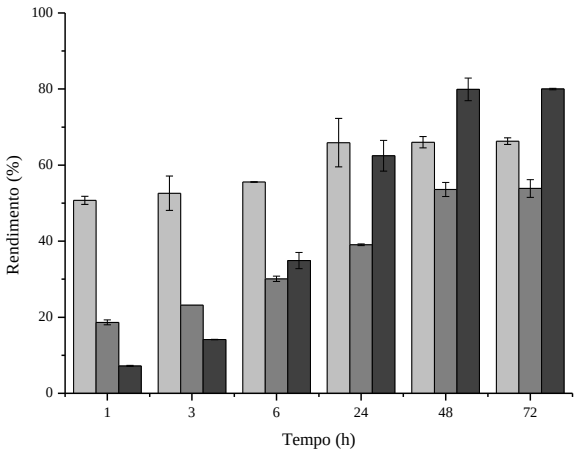
Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se na Figura 4.11 desempenho similar para todos os biocatalisadores (rendimento em torno de 80% após 48 h de reação). A diferença nos rendimentos ao longo do tempo deve-se a cargas enzimáticas diferentes no reator.

Rendimentos superiores (87 a 100%) são reportados na literatura (ver Tabela 2.2) na produção de biodiesel de óleo de soja catalisada por diferentes lipases, entretanto, em alguns trabalhos a transesterificação é realizada com metanol, o qual apresenta grandes desvantagens em relação ao etanol, tais como, toxicidade, não renovável e derivado do petróleo. Rodrigues *et al*. (2010) obtiveram 100% de rendimento na transesterificação de óleo de soja e etanol, entretanto, etanol foi alimentado em duas etapas.

A transesterificação de óleo de soja e etanol também foi realizada na presença de peneira molecular, mantendo-se as demais condições operacionais. A Figura 4.12 mostra os rendimentos das reações com o tempo.

Figura 4.12 Rendimento de transesterificação de óleo de soja em ésteres etílicos a 40ºC, razão molar óleo/etanol igual a 1:7, agitação de 500 rpm e 1,0 g de peneira molecular. Reações catalisadas por LPF-octil-sílica (■), LTL IM (■) e CALB IM (■) (carga enzimática de 0,2; 0,13 e 0,15 g de biocatalisador/g de substrato, respectivamente).



Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se na Figura 4.12 que peneira molecular prejudicou o desempenho dos biocatalisadores LPF-octil-sílica e LTL IM; os rendimentos não ultrapassaram 66 e 54%, respectivamente, mesmo com 72 h de reação. O rendimento com CALB IM manteve-se inalterado, 80% em 48 h de reação. Provavelmente, a diferença nos rendimentos de

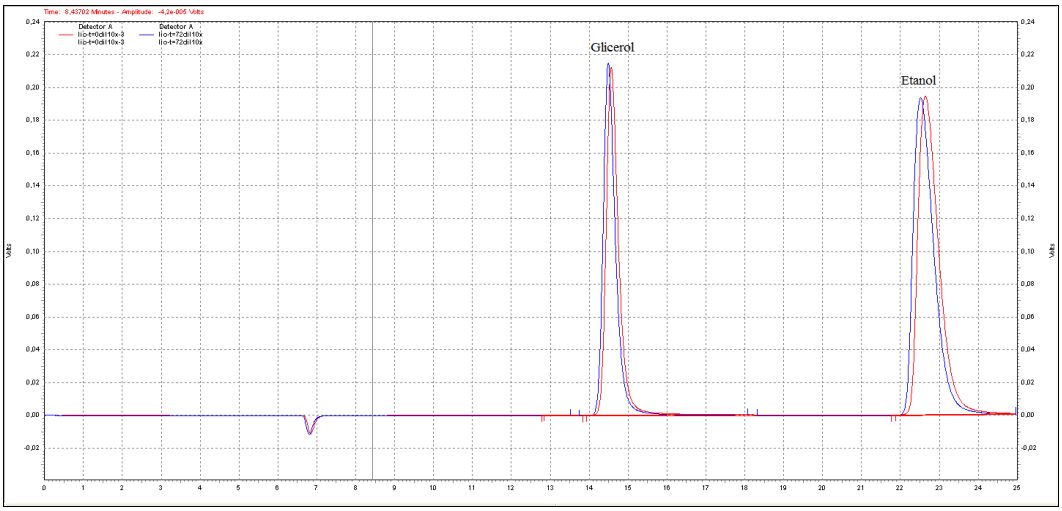
transesterificação foi devido à porcentagem de água do meio reacional. Os derivados possuíam as seguintes umidades: 4,66%, 1,94% e 1,75%, respectivamente para CALB IM, LTL IM e LPF-octil-sílica. Como se pode notar, CALB IM apresentava quase 2,5 vezes mais água do que os outros derivados e, portanto, a peneira molecular pode ter removido excessivamente água dos biocatalisadores, necessária para manter a atividade catalítica da enzima (polaridade do sítio ativo, conformação 3D, etc.).

4.10.1 Ensaios de Adsorção de Glicerol no Biocatalisador LPF-Octil-Sílica

É amplamente reportado na literatura que a enzima imobilizada mais utilizada em biotransformações é a lipase de *Candida antarctica* tipo B (NELSON, FOGLIA e MARMER, 1996; SHIMADA *et al*., 1999; WATANABE *et al*., 2000; DU *et al*., 2004; CHANG *et al*., 2005; RODRIGUES *et al.*, 2008). Esta enzima é fornecida pela Novozymes sob a denominação comercial de Novozym 435 e é fisicamente adsorvida sobre a resina macroporosa Lewatit VPOC1600. Entretanto, estudos realizados por Séverac *et al*. (2011) mostraram que a natureza hidrofílica deste suporte é uma limitação no campo da catálise heterogênea, particularmente na produção de biodiesel. Glicerol é adsorvido sobre o suporte resultando em uma drástica redução da atividade enzimática. Provavelmente, glicerol forma uma camada hidrofílica ao redor da enzima, resultando em limitações difusionais na transferência de massa dos triglicerídeos para a enzima. Portanto, embora preparações de lipases imobilizadas possam ser obtidas comercialmente, o desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados é de considerável importância.

O derivado LPF-octil-sílica foi incubado em uma solução de glicerol e etanol e mantido sob agitação a 40ºC por 72 h. As concentrações inicial e final de glicerol em solução foram medidas por RI-HPLC. A Figura 4.13 mostra os cromatogramas de glicerol para os tempos inicial e final do ensaio. Pode-se observar que após 72 h, o derivado LPF-octil-sílica não havia adsorvido glicerol (a intensidade dos picos de glicerol para a amostra inicial e final era a mesma). Portanto, o derivado LPF-octil-sílica mostrou-se com propriedades vantajosas para a produção de biodiesel em processo contínuo, uma vez que dispensa operações de lavagem do biocatalisador para sua regeneração.

Figura 4.13 Cromatograma (RI-HPLC) de glicerol em solução para o teste de adsorção no derivado LPF-octil-sílica (linha vermelha é o tempo inicial e linha azul é o tempo final).

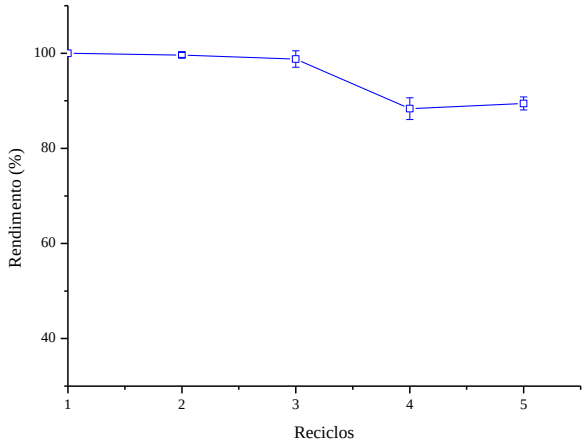


Fonte: Elaborada pela autora.

4.10.2 Estabilidade Operacional (Reuso) do derivado LPF-octil-sílica na síntese de biodiesel

O derivado LPF-octil-sílica foi utilizado em bateladas sucessivas de transesterificação de óleo de soja e etanol a 40ºC, 24 h, 500 rpm de agitação, razão molar 1:7 (óleo:etanol) e 0,2 g de derivado/g de substrato. Entre uma batelada e outra o derivado era lavado com hexano. Ésteres etílicos produzidos a cada batelada eram quantificados por cromatografia gasosa. A Figura 4.14 mostra os rendimentos de transesterificação para 5 bateladas sucessivas.

Figura 4.14 Rendimentos de transesterificação de óleo de soja e etanol em bateladas sucessivas, catalisada por LPF-octil-sílica a 40ºC, razão molar óleo:etanol de 1:7, agitação de 500 rpm e carga enzimática de 0,2 g de catalisador/g de substrato. O rendimento da primeira batelada foi considerado igual a 100%. As barras representam desvios padrões de replicatas.



Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se na Figura 4.14 que o derivado LPF-octil-sílica foi consideravelmente estável. A partir da terceira batelada houve uma perda da atividade e consequentemente uma diminuição, em torno de 10%, no rendimento da síntese de biodiesel. Como nas três primeiras bateladas não se observou perda de atividade, pode-se descartar a hipótese de desprendimento de enzima do suporte nas condições operacionais. Em geral, lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos que se assemelham a seus substratos naturais (neste caso, octil-sílica) permanecem fortemente adsorvidas a eles na forma aberta, dificilmente sendo eluídas de tais superfícies, por serem as lipases completamente insolúveis em meio orgânico (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998). A queda de atividade deve-se, portanto, a inativação da enzima pela combinação temperatura/solvente orgânico.

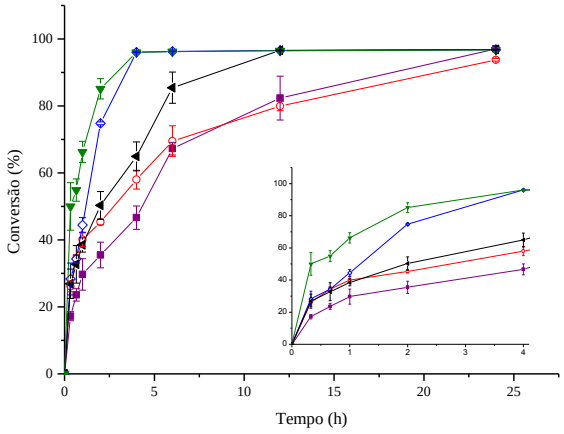
4.11 Sínteses de Ésteres Aromatizantes

LPF-octil-sílica (baixa e alta carga) e as enzimas imobilizadas comerciais LPF IM, CALB IM e LTL IM foram utilizadas na síntese dos aromas de morango (acetato de butila), frutado (acetato de hexila), banana (acetato de isoamila), abacaxi (butirato de butila) e abacaxi (butirato de etila). Baixa e alta carga referem-se à carga proteica oferecida

na imobilização igual a 5 e 40 mg de proteína/g de suporte, respectivamente. Todas as reações foram conduzidas a 37ºC, 24 h, 250 rpm e razão molar 1:1 (ácido:álcool). As Figuras 4.15 a 4.19 mostram as conversões das reações de esterificação com o tempo.

Na reação de esterificação do acetato de butila (Figura 4.15), observa-se que todos os derivados renderam em torno de 100% de conversão após 24 h de reação. CALB IM e LPF-octil-sílica (alta carga) foram mais eficientes, atingindo 97% em apenas 4 h de reação, ou em 12 h para o derivado LPF-octil-sílica (baixa carga).

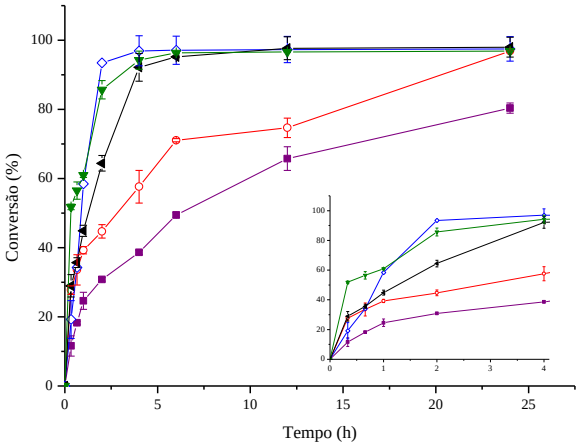
Figura 4.15 Conversão da síntese de acetato de butila (Morango) a 37°C, 24 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1 e usando LTL IM (■), LPF IM (○), CALB IM (◊), LPF-octil-sílica baixa carga (◀) (carga enzimática de 200 U_{Est}/g de ácido) e LPF-octil-sílica alta carga (▼) (1% de derivado). As barras representam desvios padrões de replicatas.



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 4.16 mostra o perfil de conversão de esterificação para o acetato de hexila. Observa-se que os derivados LPF-octil-sílica (baixa e alta carga) e CALB IM foram superiormente eficientes aos demais, atingindo 97% de conversão com apenas 6 horas de reação.

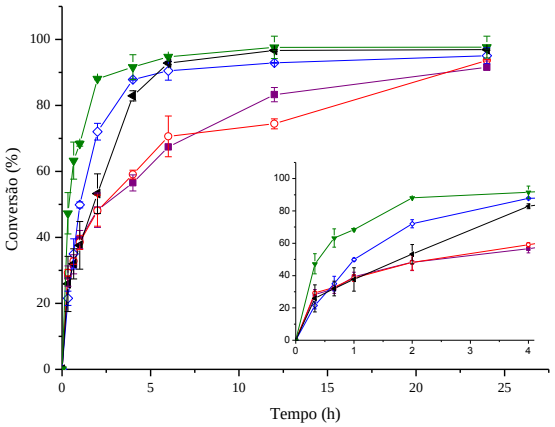
Figura 4.16 Conversão da síntese de acetato de hexila (Frutado) a 37°C, 24 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1 e usando LTL IM (■), LPF IM (○), CALB IM (◊), LPF-octil-sílica baixa carga (◄) (carga enzimática de 200 U_{Est}/g de ácido) e LPF-octil-sílica alta carga (▼) (1% de derivado). As barras representam desvios padrões de replicatas.



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 4.17 mostra o perfil de conversões da síntese de acetato de isoamila. Observa-se que o derivado LPF-octil-sílica (baixa e alta carga) renderam 83 e 92%, respectivamente, de conversão em apenas 4 h de reação.

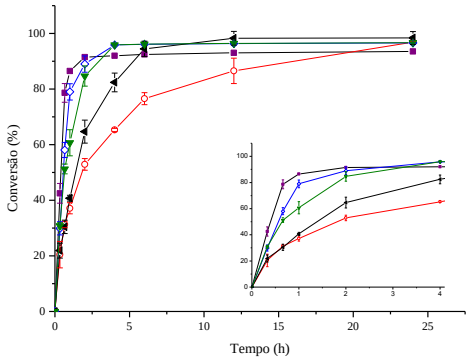
Figura 4.17 Conversão da síntese de acetato de isoamila (Banana) a 37°C, 24 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1 e usando LTL IM (■), LPF IM (○), CALB IM (◊), LPF-octil-sílica baixa carga (◄) (carga enzimática de 200 U_{Est}/g de ácido) e LPF-octil-sílica alta carga (▼) (1% de derivado). As barras representam desvios padrões de replicatas.



Fonte: Elaborada pela autora.

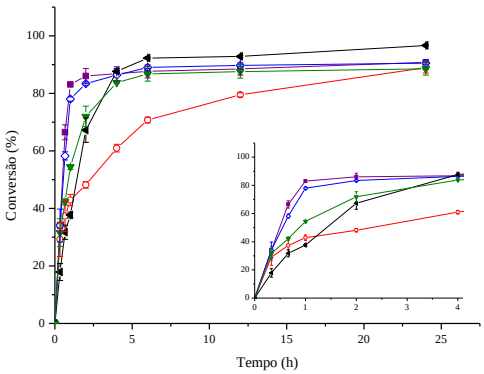
As Figuras 4.18 e 4.19 mostram os perfis de conversões com o tempo para as sínteses de butirato de butila e butirato de etila. Utilizando os derivados LPF-octil-sílica, LTL IM e CALB IM conseguiu-se conversões de aproximadamente 95 e 90% nas sínteses de butirato de butila (Figura 4.18) e butirato de etila (Figura 4.19), respectivamente. O derivado comercial LPF IM foi menos eficiente, necessitando de 24 h para atingir conversões similares.

Figura 4.18 Conversão da síntese de butirato de butila (Abacaxi) a 37°C, 24 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1 e usando LTL IM (■), LPF IM (○), CALB IM (◊), LPF-octil-sílica baixa carga (◄) (carga enzimática de 200 U_{Est}/g de ácido) e LPF-octil-sílica alta carga (▼) (1% de derivado). As barras representam desvios padrões de replicatas.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.19 Conversão da síntese do butirato de etila (Abacaxi) a 37°C, 24 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1 e usando LTL IM (■), LPF IM (○), CALB IM (◊), LPF-octil-sílica baixa carga (◄) (carga enzimática de 200 U_{Est}/g de ácido) e LPF-octil-sílica alta carga (▼) (1% de derivado). As barras representam desvios padrões de replicatas.



Fonte: Elaborada pela autora.

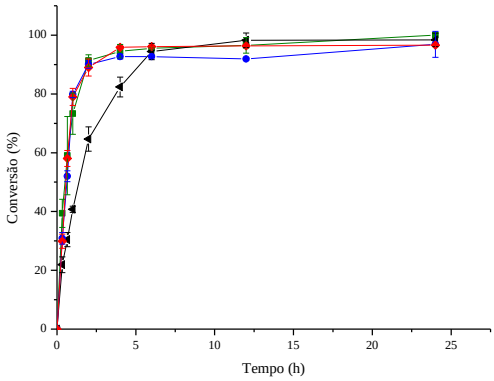
A literatura reporta vários trabalhos de sínteses enzimáticas de aromas (Tabela 2.3), com conversões variando de 72 a 100%. Uma comparação mais rigorosa com os resultados obtidos neste trabalho é dificultada, pois as condições reacionais são muito distintas (diferentes temperaturas, razões molares ácido:álcool, carga enzimática no reator, espécie de lipase, etc.). Entretanto, pode-se concluir que o derivado preparado neste trabalho (LPF-octil-sílica) apresentou um bom desempenho comparado aos biocatalisadores comerciais imobilizados, com conversões (todas acima de 90%) atrativas do ponto de vista industrial.

4.11.1 Síntese de Butirato de Butila – Acompanhamento da Reação por Cromatografia Gasosa e Titulação

Em todas as sínteses de aromas apresentadas anteriormente, a reação de esterificação foi acompanhada pelo consumo de ácido por titulometria. Com o intuito de se verificar a precisão deste método, butirato de butila foi produzido nas mesmas condições anteriores, acompanhando-se a reação pelo consumo de ácido (titulometria) e pelo consumo de álcool (cromatografia gasosa).

Pode-se verificar (Figura 4.20) que as conversões calculadas a partir do consumo de ácido (analisado por titulometria) e do consumo de álcool (analisado por CG) concordam significativamente bem. Conversões acima de 96% foram obtidas com os derivados LPF-octil-sílica e CALB IM após 6 horas de reação.

Figura 4.20 Conversão da síntese de butirato de butila a 37°C, 24 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1 e carga enzimática de 200 U_{Est}/g de ácido. A conversão foi acompanhada por titulação, usando os biocatalisadores de LPF-octil-sílica baixa carga (◀) e CALB IM (◆) e por cromatografia gasosa, usando LPF-octil-sílica baixa carga (■), CALB IM (●). As barras representam desvios padrões de replicatas.



Fonte: Elaborada pela autora.

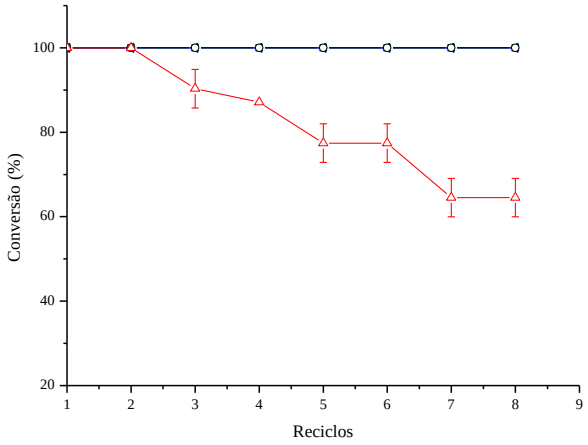
4.11.2 Estabilidade Operacional (Reuso) dos Derivados na Síntese de Butirato de Butila

Para que um processo enzimático seja economicamente viável do ponto de vista industrial é necessário que, além de fatores inerentes a qualquer reação química, o custo do biocatalisador seja reduzido. Uma maneira de atingir esse objetivo é trabalhar-se com enzimas imobilizadas e estabilizadas, de tal forma que um reator possa ser operado continuamente por longos períodos de tempo, sem troca do biocatalisador, ou que este possa ser reutilizado em vários ciclos de operações em batelada, utilizando-se reatores de tanque agitado.

As estabilidades operacionais dos biocatalisadores LPF-octil-sílica, LTL IM, CALB IM e LPF IM foram estudadas em uma série de ensaios sucessivos de esterificação, com remoção dos biocatalisadores por filtração e lavagem com heptano ao final de cada batelada.

A Figura 4.21 mostra as conversões das reações de esterificação em oito ciclos operacionais, reutilizando os biocatalisadores imobilizados.

Figura 4.21 Reuso de lipases imobilizadas na síntese do butirato de butila a 37 °C, 12 h, 250 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1, carga enzimática de 200 U_{Est}/g de ácido e usando LTL IM (○), LPF IM (Δ), CALB IM (■), LPF-octil-sílica baixa carga (◀). A conversão da primeira batelada foi considerada 100%. As barras representam desvios padrões de replicatas.



Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se observar que todos os derivados, com exceção da LPF IM, se mantiveram altamente estáveis após oito ciclos reacionais, mantendo a máxima conversão de ácido butírico. Após 7 ciclos reacionais utilizando a lipase comercial imobilizada (LPF IM), observa-se uma perda em sua atividade catalítica de aproximadamente 40%.

4.12 Ésteres de Açúcares

A biossíntese de ésteres graxos de açúcares (surfactantes não iônicos, biodegradáveis, atóxicos, não irritantes e inodoros) é uma rota muito atrativa do ponto de vista ambiental e econômico. A especificidade das enzimas em meio orgânico permite a obtenção de produtos muito mais puros, além de que o uso desses biocatalisadores permite que a reação seja conduzida em condições suaves de temperatura e pH. Diferentemente, a produção de ésteres graxos de açúcares por processos químicos requer que a reação seja conduzida a altas temperaturas e na presença de catalisadores alcalinos e solventes tóxicos (piridina, dimetilformamida – DMF, dimetilsulfóxido – DMSO, etc.), resultando em alto consumo de energia, formação de produtos indesejáveis e baixa seletividade (PATIL, LEONARDIS e NAG, 2011; SUTILI *et al.*, 2013).

O grande “gargalo” na derivatização de carboidratos em meio orgânico é a solubilização do sacarídeo. Somado a isso, a rota enzimática enfrenta ainda a dificuldade de preservar a atividade catalítica do biocatalisador nesse meio. Solventes orgânicos usualmente empregados em processos químicos (DMF e DMSO) dissolvem sacarídeos, porém, inativam enzimas e não são compatíveis com muitas aplicações dos derivados de carboidratos (EL SEOUD *et al*., 2007).

Dentre os solventes orgânicos mais utilizados em acilação de açúcares, destacam-se o *terc*-butanol e o 2-metil-2-butanol. Além de serem compatíveis com as lipases (PAULA, BARBOZA e CASTRO, 2005), essas não são específicas para esses álcoois terciários.

Neste trabalho investigou-se a eficiência do biocatalisador LPF-octil-sílica e da enzima imobilizada comercial CALB IM na síntese de ésteres graxos de açúcares (frutose e lactose) na presença de *terc*-butanol e 2-metil-2-butanol. Como modelo, ácido oleico e láurico foram utilizados como doadores acila.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os perfis de conversão com o tempo foram construídos com os valores médios e os desvios padrões (barras).

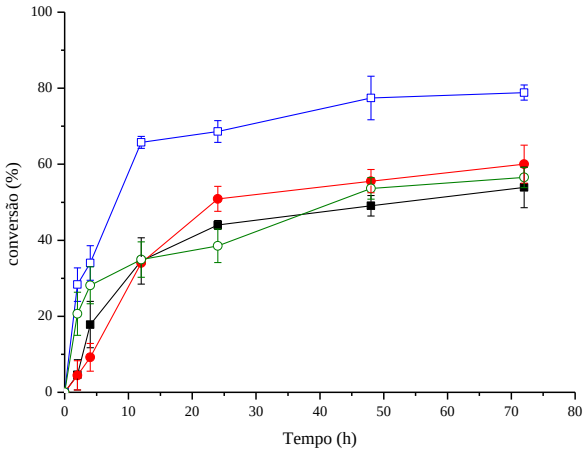
A Figura 4.22 mostra os perfis de conversões com o tempo para as esterificações entre ácido oleico e frutose, na presença dos dois solventes pré-selecionados.

Conversões molares de 79 e 57% (CALB IM e LPF-octil-sílica, respectivamente) foram obtidas utilizando-se *terc*-butanol como solvente. Na presença de 2-metil-2-butanol as conversões atingiram 54% (CALB IM) e 60% (LPF-octil-sílica). De acordo com estes resultados, *terc*-butanol foi o melhor solvente na síntese de oleato de frutose utilizando-se CALB IM como biocatalisador. Em se tratando do derivado LPF-octil-sílica, a escolha do solvente pode ser baseada em custo e toxicidade, pois ambos, *terc*-butanol e 2-metil-2-butanol, conduzem a conversões similares.

A literatura reporta conversões de 52 a 95% (Tabela 2.4) em sínteses de ésteres graxos de açúcares utilizando diferentes sistemas reacionais. Por exemplo, Neta *et al.* (2012) obtiveram 74 e 70% de conversão na síntese de oleato de frutose, catalisada por lipase imobilizada comercial de *Candida antarctica* B e imobilizada em quitosana, respectivamente. As condições reacionais foram as seguintes: 40ºC, 72 h de reação, 0,5

mmol de açúcar e de ácido graxo (1:1), sulfato de sódio anidro (0,1 g) e etanol como solvente orgânico. Interessante neste caso foi a escolha de etanol como solvente, pois este, em excesso, pode competir com a frutose na reação de esterificação, com formação de oleato de etila como subproduto. Entretanto, os pesquisadores não reportam a seletividade da reação.

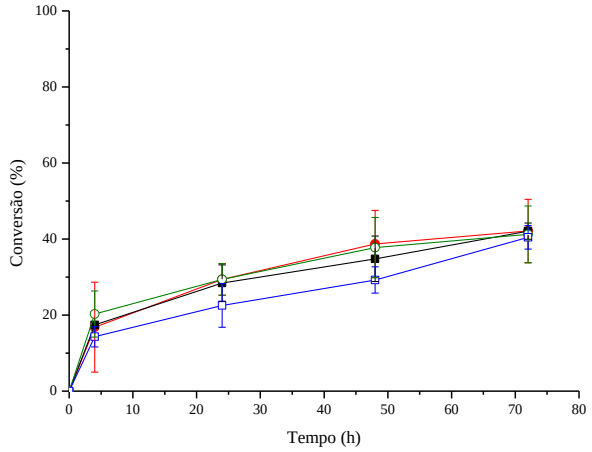
Figura 4.22 Perfis de conversões na síntese de oleato de frutose a 45 °C, 72 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:1, concentração de açúcar de 25 mM, usando CALB IM (□) e LPF-octil-sílica (○) na presença do solvente *terc*-butanol e CALB IM (■) e LPF-octil-sílica (●) na presença do solvente 2-metil-2-butanol, (0,5 g de derivado e 1,5 g de peneira molecular).



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 4.23 mostra os perfis de conversões em função do tempo de reação para as esterificações entre ácido oleico e lactose. As conversões máximas oscilaram em torno de 40% após 72 h de reação na presença de ambos solventes (*terc*-butanol e 2-metil-2-butanol) e biocatalisadores (LPF e CALB imobilizadas). A baixa conversão observada para a síntese de ésteres de lactose pode ser atribuída a (i) impedimento estérico ao sítio ativo da enzima e/ou problemas difusionais, pois a molécula de lactose é aproximadamente duas vezes maior que a de frutose; (ii) baixa velocidade de reação, devido a baixa solubilidade da lactose nos solventes orgânicos testados.

Figura 4.23 Conversão da síntese de oleato de lactose a 45 °C, 72 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:1, concentração de açúcar de 50 mM, usando CALB IM (■) e LPF-octil-sílica (●) na presença do solvente *terc*-butanol e CALB IM (□) e LPF-octil-sílica (○) na presença do solvente 2-metil-2-butanol, (0,5 g de derivado, 1,5 g de peneira molecular).



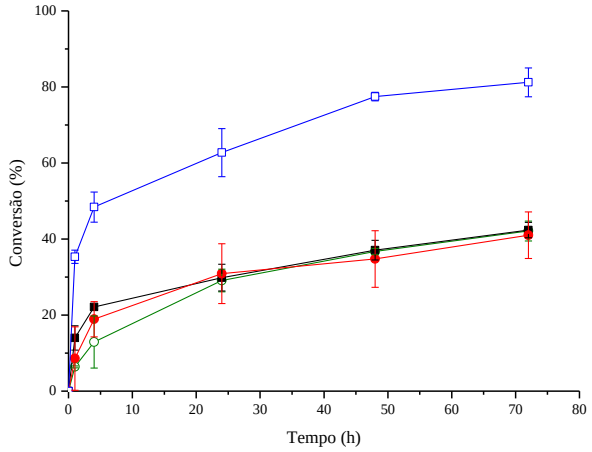
Fonte: Elaborada pela autora.

A literatura reporta conversão acima de 70% (ZAIDAN *et al*., 2012) na acilação da lactose com ácido cáprico (razão molar 2:1) a 55ºC, 48 h, usando acetona como solvente e lipase de *Candida rugosa* imobilizada em mica ativada com grupos aminos.

Neta *et al.* (2012) obtiveram conversões acima de 80% na síntese de oleato de lactose (40ºC, 72 h de reação, razão molar lactose:ácido oleico 1:1) com CALB imobilizada. Entretanto, usaram etanol como solvente para a solubilização da lactose e não reportam se houve ou não formação de oleato de etila.

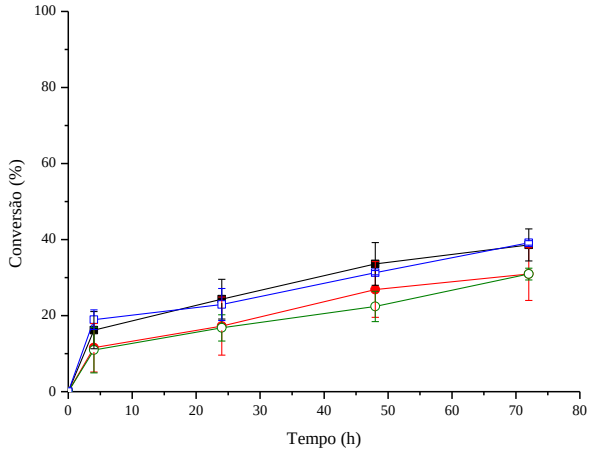
As Figuras 4.24 e 4.25 mostram as conversões nas sínteses de laurato de frutose e laurato de lactose, usando as mesmas condições operacionais descritas anteriormente. Conversão máxima de 81% foi atingida com 72 h na reação de esterificação da frutose catalisada por CALB IM na presença de 2-metil-2-butanol. Para o biocatalisador LPF-octil-sílica, lactose e o solvente *terc*-butanol, as conversões não ultrapassaram 40%.

Figura 4.24 Conversão da síntese de laurato de frutose a 45 °C, 72 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:1, concentração de açúcar de 25 mM, usando CALB IM (■) e LPF-octil-sílica (●) na presença do solvente *terc*-butanol e CALB IM (□) e LPF-octil-sílica (○) na presença do solvente 2-metil-2-butanol, (0,5 g de derivado, 1,5 g de peneira molecular).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.25 Conversão da síntese de laurato de lactose a 45 °C, 72 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:1, concentração de açúcar de 50 mM, usando CALB IM (■) e LPF-octil-sílica (●) na presença do solvente *terc*-butanol e CALB IM (□) e LPF-octil-sílica (○) na presença do solvente 2-metil-2-butanol, (0,5 g de derivado, 1,5 g de peneira molecular).

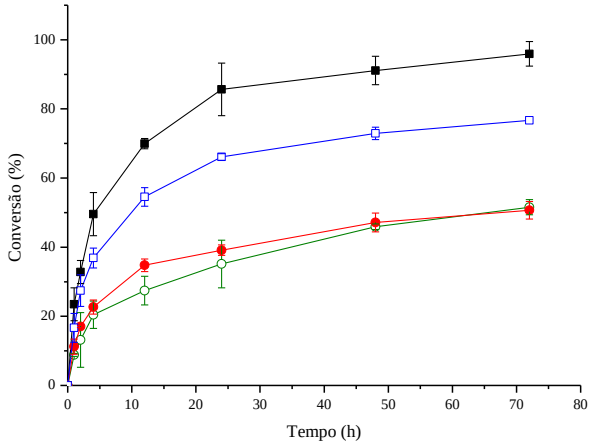


Fonte: Elaborada pela autora.

A partir destes resultados selecionou-se ácido oleico, frutose e *terc*-butanol para um estudo da influência da razão molar açúcar:ácido na conversão da reação de esterificação.

A Figura 4.26 mostra os perfis de conversão com o tempo na síntese de oleato de frutose a diferentes razões ácido:açúcar (1:2, 25 mM de ácido; 2:1, 50 mM de ácido). Observa-se que CALB IM converteu 96% na razão molar 1:2 e LPF-octil-sílica converteu 50% na razão molar 2:1, conversão essa inferior à obtida na razão molar 1:1 (57%).

Figura 4.26 Conversão da síntese de oleato de frutose a 45 °C, 72 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:2 usando CALB IM (■) e LPF-octil-sílica (○) e 2:1 usando CALB IM (□) e LPF-octil-sílica (●) (0,5 g de derivado) na presença do solvente *terc*-butanol.

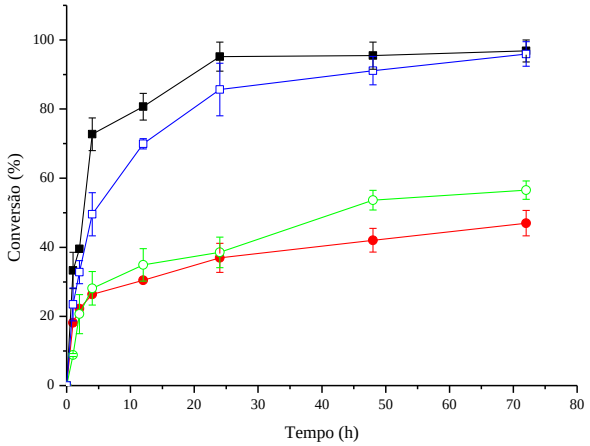


Fonte: Elaborada pela autora.

Com base nestes resultados, realizou-se a síntese de oleato de frutose variando a temperatura de 45 para 55°C (Figura 4.27), utilizando a razão molar ácido:carboidrato de 1:1 com o derivado LPF-octil-sílica e 1:2 com a lipase comercial (CALB IM) em *terc*-butanol.

Observa-se (Figura 4.27) que a 55ºC a conversão atingiu 96% em 24 h de reação, utilizando CALB IM como biocatalisador. O derivado LPF-octil-sílica apresentou uma pequena redução na sua atividade a esta temperatura, atingindo uma conversão de 46%, enquanto que a 45°C alcançou 57% de conversão.

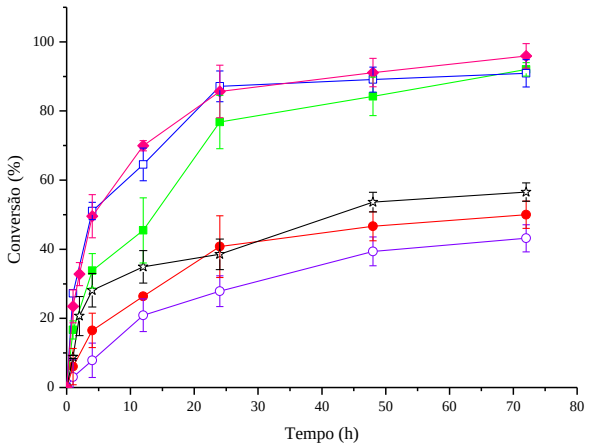
Figura 4.27 Conversão da síntese de oleato de frutose, na presença do solvente *terc*-butanol, 72 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:1, usando LPF-octil-sílica a 45 °C (○) , LPF-octil-sílica a 55 °C (●) e 1:2 usando CALB IM a 45 °C (□), CALB IM a 55 °C (■) (0,5 g de derivado).



Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 4.28 têm-se os perfis das conversões do oleato de frutose a 45 °C, variando a massa de derivado (0,25; 0,5 e 1,0 g) no meio reacional e usando a razão de ácido:carboidrato 1:1 (LPF-octil-sílica) e 1:2 (CALB IM) em *terc*-butanol.

Figura 4.28 Conversão na síntese de oleato de frutose a 45 °C, 72 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:1 usando 0,25 g (○), 0,5 g (☆) e 1,0 g (●) de LPF-octil-sílica e 1:2 usando a 0,25 g (■), 0,5 g (◆) e 1,0 g (□) de CALB IM na presença do solvente terc-butanol.



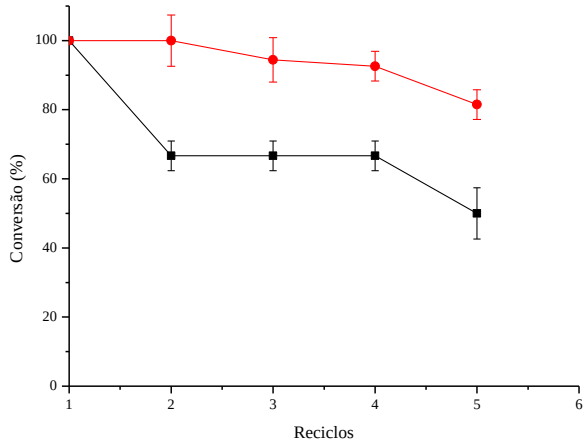
Fonte: Elaborada pela autora.

Ao variar a massa de derivado na reação de esterificação de oleato de frutose observou-se que ao utilizar a CALB IM como catalisador, não houve diferenças significativas entre as três massas usadas (0,25; 0,5 e 1,0 g); as conversões ficaram entre 90 e 96%. Verificou-se que ao utilizar 0,25 g de enzima a velocidade da reação foi levemente reduzida para os dois biocatalisadores em estudo. Nas reações catalisadas por LPF-octil-sílica a melhor conversão (57%) alcançada foi utilizando 0,5 g de derivado.

4.12.1 Estabilidade Operacional (Reuso) dos Derivados na Síntese do Oleato de Frutose

A Figura 4.29 mostra o reuso do derivado de LPF-octil-sílica e CALB IM na reação de esterificação de oleato de frutose, utilizando as melhores condições reacionais encontradas neste trabalho.

Figura 4.29 Reuso das lipases na síntese do oleato de frutose a 45 °C, 48 h, 250 rpm, razão molar ácido:açúcar de 1:1 e usando LPF-octil-sílica (■) e 1:2 usando CALB IM (●) na presença do solvente terc-butanol (0,5 g de derivado). Considerou-se rendimento da primeira batelada 100%.



Fonte: Elaborada pela autora.

Depois de cada ciclo, os biocatalisadores foram filtrados, lavados com *terc*-butanol e reutilizados em um novo ciclo de reação. A 45ºC, ambas as lipases imobilizadas mostraram uma perda na atividade catalítica em *terc*-butanol. A diminuição da atividade catalítica provavelmente deve-se à inativação da enzima causada por desnaturação da proteína. Esta inativação foi mais acentuada para o derivado LPF-octil-sílica, com uma

redução de 50% de atividade, enquanto que a lipase comercial CALB IM apresentou uma redução de apenas 20% no quinto ciclo de reação.

Resumindo, as melhores condições encontradas neste trabalho para a síntese enzimática de um biossurfactante em reator tipo tanque agitado foram:

(i) Éster graxo de açúcar: oleato de frutose;
(ii) Conversão: 96%;
(iii) Biocatalisador: Lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada (CALB IM);
(iv) Solvente: *terc*-butanol;
(v) Razão molar frutose:ácido oleico: 2:1;
(vi) Temperatura: 45ºC (para reuso do biocatalisador em 04 ciclos);
(vii) Massa de biocatalisador: 3,5 g/g de ácido;
(viii) Tempo reacional: 48 h.

4.13 Preparação de Derivados de LPF para Aplicação em Hidrólise Enantiosseletiva

Como amplamente reportado na literatura e discutido anteriormente, lipases comumente formam agregados bimoleculares em solução. Esses agregados possuem propriedades catalíticas diferenciadas em relação a sua forma monomolecular. Esses agregados são formados pela interação entre duas moléculas através das regiões hidrofóbicas que circundam o sítio ativo, particularmente o lado interno da "tampa". A presença de surfactantes (Triton X, por exemplo) no meio pode desfazer esses agregados, alterando a atividade, a estabilidade e a enantiosseletividade da enzima. Outra forma de modular as propriedades catalíticas de uma lipase é a sua imobilização em suportes com distintas ativações, o que permite que a enzima seja orientada ao suporte por diferentes regiões da superfície da molécula. A enzima pode assim ser imobilizada pela sua região mais hidrofóbica, pela sua região mais rica em grupos aminos, mais rica em cargas positivas, negativas, etc (PALOMO *et al.*, 2002).

Neste contexto, serão discutidas estratégias de imobilização de LPF por ligação covalente uni e multipontual, na forma monomolecular ou na forma de agregados bimoleculares, na conformação aberta (forma ativa) ou fechada. Derivados de LPF preparados em suportes com alta porcentagem de água (octil-agarose e glioxil-agarose) foram utilizados na hidrólise enantiosseletiva de (*R,S*)-2-hidróxi-4-fenilbutirato de etila. Derivados de LPF preparados em suportes com baixa porcentagem de água (octadecil-

Sepabeads e Glioxil-Sepabeads) foram utilizados na síntese de oleato de benzila por transesterificação de azeite de oliva e álcool benzílico em ciclohexano.

4.13.1 Imobilização de LPF em Suportes Ativados com Grupos Glioxil

LPF foi imobilizada em agarose e Sepabeads ativados com grupos glioxil (aldeídos alifáticos lineares), na presença ou ausência de um surfactante (Triton X-100, TX) e em pH 8,5 ou 10,5.

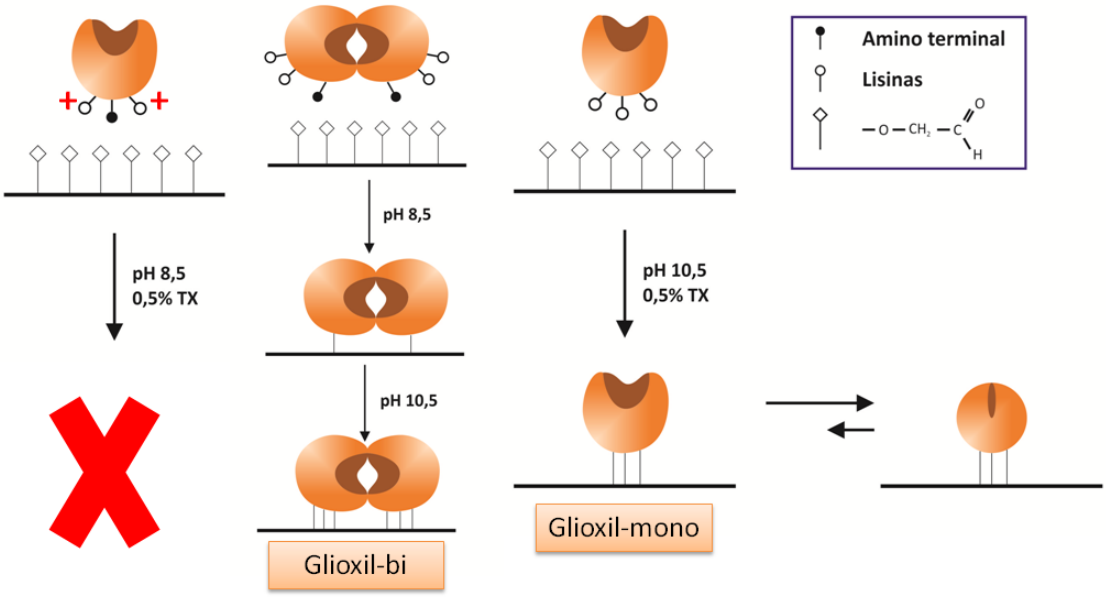
Em pH 8,5 e na ausência de TX LPF encontra-se na forma de agregados bimoleculares e, portanto, é capaz de imobilizar-se em suportes glioxil através de seus grupos aminos terminais (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2003). A imobilização em suportes glioxil somente é possível se houver a formação simultânea de pelo menos duas ligações reversíveis (bases de Schiff) entre os grupos aldeídos no suporte e os grupos aminos dos resíduos de lisinas ou aminos terminais da enzima (GUISÁN, 1988). A existência de dois NH_2-terminal na mesma superfície planar no agregado bimolecular, explicaria porque agregados de LPF são capazes de serem imobilizados covalentemente em suportes glioxil. Após a imobilização da enzima pelos NH_2-terminais, o derivado pode ser incubado em pH 10,5 por 24 h, para a formação de ligações covalentes adicionais, agora entre aldeídos no suporte e aminos desprotonados de resíduos de lisina da enzima. Entretanto, a formação excessiva de ligações covalentes adicionais enzima-suporte pode causar inativação da enzima imobilizada por distorção da estrutura tridimensional da enzima. Isso explica, provavelmente, a redução observada na atividade do derivado glioxil-bimolecular (A Tabela 4.8 mostra que 98% da atividade oferecida foi imobilizada, mas a recuperação de atividade na enzima imobilizada foi de 70%). Estes derivados foram chamados de glioxil-agarose-bi ou glioxil-Sepabeads-bi.

Em pH 8,5 e na presença de TX (0,5%, v/v), LPF está na forma monomolecular e, portanto, é imobilizada com baixa eficiência em suportes glioxil, mesmo após 24 h de reação. Nestas condições, o grupo amino mais reativo é o NH_2-terminal da enzima; os grupos aminos de lisinas estão protonados e, portanto, não são capazes de formarem bases de Schiff.

Em pH 10,5 e na presença de TX (0,5%, v/v), LPF imobilizou-se nos suportes glioxil com taxas moderadas (6 h em glioxil-agarose e 24 h em glioxil-Sepabeads). Nestas condições, LPF está na forma monomolecular e cada monômero pode

ser imobilizado através da sua região mais rica em resíduos de lisinas. Entretanto, LPF não possui alta densidade de resíduos de lisinas e os suportes glioxil-Sepabeads não possuem alta densidade de grupos aldeídos. Isso explicaria a menor velocidade de imobilização de LPF neste suporte. Observa-se na Tabela 4.8 que LPF, na forma monomérica, imobiliza-se eficientemente em suporte glioxil (rendimento de 95%), e 75% da atividade imobilizada é recuperada. Estes derivados foram chamados de glioxil-agarose-mono ou glioxil-Sepabeads-mono. A Figura 4.30 ilustra a imobilização de LPF em suportes ativados com grupos glioxil em pH 8,5 ou 10,5, com ou sem Triton X-100.

Figura 4.30 Representação esquemática da forma de imobilização de LPF em suportes ativados com grupos glioxil em pH 8,5 ou 10,5, com ou sem Triton X-100.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.13.2 Imobilização de LPF em BrCN-Agarose

LPF foi imobilizada em BrCN-agarose, na presença de TX (0,5%, v/v), a 4ºC, pH 7 por 20 min. Nestas condições LPF foi imobilizada na forma monomérica, produzindo um derivado de LPF para ser usado como referência no estudo das propriedades catalíticas e na estabilidade da lipase. Em geral, a imobilização de enzimas nestas condições ocorrerá somente por ligação covalente aldeído-NH_2-terminal, e estas preparações imobilizadas servirão de modelo para as propriedades da enzima na ausência de fenômenos intermoleculares (PALOMO *et al.*, 2003a; GUISÁN, 1988). Lipases têm

mostrado uma forte tendência de formar agregados de lipase-lipase, tornando difícil o estudo de moléculas de lipase isoladas na forma solúvel (WILSON *et al.*, 2006; PALOMO *et al.*, 2004). O rendimento da imobilização obtido nestas condições foi de 30% (Tabela 4.8). Como esperado, o rendimento da imobilização não foi muito alto, mas a formação de qualquer ligação covalente multipontual foi evitada. Após a imobilização, o detergente foi removido por lavagem com água destilada, e este derivado foi usado como referência no estudo do comportamento de LPF monomérica, sem a formação de agregados bimoleculares.

4.13.3 Imobilização de LPF por Adsorção em Suportes Hidrofóbicos

LPF foi imobilizada em octil-agarose e octadecil-Sepabeads por adsorção hidrofóbica interfacial em pH 7, baixa força iônica (5 mM) e 25ºC. A Tabela 4.8 mostra os resultados de rendimento de imobilização e recuperação de atividade.

Tabela 4.8 Resultados de rendimento de imobilização (RI) e atividade recuperada (AR) de LPF imobilizada em suportes glioxil e hidrofóbicos. Carga oferecida: 5 mg de proteína/g de suporte.

Suportes Ativados	**Condições**	**Triton X 100 (%)**	**RI (%)**	**AR (%)**
BrCN-agarose	4ºC, pH 7,0 (TFNa 100 mM), 20 min	0,5	30	95
Octil-agarose	25ºC, pH 7 (TFNa 5 mM), 6 h	-	99	150
Octadecil-Sepabeads	25ºC, pH 7 (TFNa 5 mM), 10 h	-	99	300
Glioxil-bimolecular	25ºC, pH 8,5 (TBNa 100 mM), 24h	-	98	70
Glioxil-monomérico	25ºC, pH 10,5 (TBNa 100 mM), 6 ou 24 h	0,5	95	75

TFNa = tampão fosfato de sódio; TBNa = tampão bicarbonato de sódio

Fonte: Elaborada pela autora.

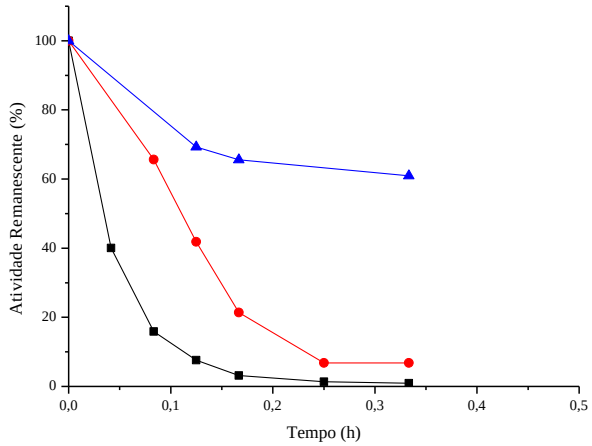
Observa-se que LPF imobilizou-se totalmente nestes suportes hidrofóbicos (rendimentos de 99%), rendendo derivados hiperativados: a atividade recuperada foi de 150% em octil-agarose e 300% em octadecil-Sepabeads.

A imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos por adsorção interfacial (SABUQUILLO *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998) permite que se conserve a conformação aberta da lipase em uma fase sólida, representando uma metodologia simples para se obter biocatalisadores de lipase altamente ativos. A natureza hidrofóbica do suporte permite a hiperativação da enzima, com a imobilização da mesma na conformação aberta (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2008). Este fato depende da natureza hidrofóbica da "tampa" (por exemplo, número de aminoácidos) ou da área ao redor do sítio ativo de uma lipase em particular.

4.14 Modificação da LPF Imobilizada com Inibidor Irreversível

A modificação das lipases por ligação covalente do resíduo serina do centro catalítico com um inibidor irreversível (por exemplo, dietil-*p*-nitrofenilfosfato) será mais rápida quando o centro ativo da lipase estiver em conformação aberta. De fato, a inativação da LPF adsorvida em octil-agarose é muito mais rápida que a inativação do derivado monomérico na presença de detergente (Figura 4.31). A modificação do derivado bimolecular é também mais rápida que a do derivado monomérico, provavelmente pelo fato dos dois centros ativos (abertos) estarem em contato próximo.

Figura 4.31 Inibição irreversível dos derivados octil-agarose (■), glioxil-agarose-bi (●) e glioxil-agarose-mono (▲) com dietil-*p*-nitrofenilfosfato



Fonte: Elaborada pela autora.

4.15 Hidrólise enantiosseletiva de (*R,S*)-2-hidróxi-4-fenilbutirato de etila (HPBE)

Na Tabela 4.9 pode-se observar que a enantiosseletividade do derivado LPF-octil-agarose (E > 100) é bem maior que a do derivado unipontual LPF-BrCN-agarose (E = 7) e do derivado multipontual LPF-glioxil-agarose-mono (E = 27,9). A adsorção hidrofóbica de LPF na conformação aberta mostrou ser um fator essencial para a melhoria da enantiosseletividade da enzima.

Tabela 4.9 Hidrólise enantiosseletiva de (*R,S*)-2-hidróxi-4-fenilbutirato de etila (HPBE) a 25ºC, pH 7,5, e agitação de 150 rpm por 24 h. Meio reacional: 10 mL de solução 5 mM de (*R,S*)-HPBE em TFNa 25 mM e 0,5 de lipase imobilizada.

Derivados de LPF	**Enantiosseletividade (E)**
LPF-BrCN-Agarose	7
LPF-Octil-Agarose	>100
LPF-Glioxil-Agarose-mono	27,9
LPF-Glioxil-Agarose-bi	>100

Fonte: Elaborada pela autora.

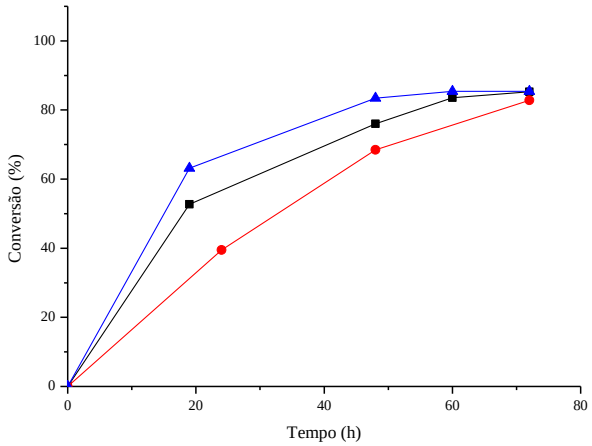
O derivado bimolecular (LPF-glioxil-agarose-bi, E > 100) foi mais seletivo que o derivado monomérico (LPF-glioxil-agarose-mono, E = 27,9). Comparado com o derivado LPF-octil-agarose, o derivado bimolecular exibiu similar enantiosseletividade.

4.16 Transesterificação Enzimática de Óleo de Oliva e Álcool Benzílico

A transesterificação enzimática de óleo de oliva e álcool benzílico (síntese de oleato de benzila) foi realizada a 25ºC e catalisada pelos biocatalisadores preparados octadecil-Sepabeads e glioxil-Sepabeads (suportes com baixa porcentagem de água).

Esta reação modelo é facilmente realizada em solventes orgânicos (por exemplo, ciclohexano) e facilmente acompanhada por HPLC-UV. O derivado bimolecular (LPF-glioxil-Sepabeads-bi) foi mais ativo que o monomérico, LPF-glioxil-Sepabeads-mono (Figura 4.32). Dentre os derivados preparados, o mais ativo foi LPF-octadecil-Sepabeads. A conversão máxima da síntese (85%, com base no consumo de álcool benzílico), foi obtida com todos os derivados testados, entretanto, com tempos distintos de reação.

Figura 4.32 Conversão da síntese enzimática de oleato de benzila via transesterificação do azeite de oliva com álcool benzílico. A reação foi realizada a 25°C, razão molar álcool:azeite de 1:2, com o solvente ciclohexano e os derivados de LPF octadecil-Sepabeads (▲), glioxil-Sepabeads-bi (■) e glioxil-Sepabeads-mono (●).



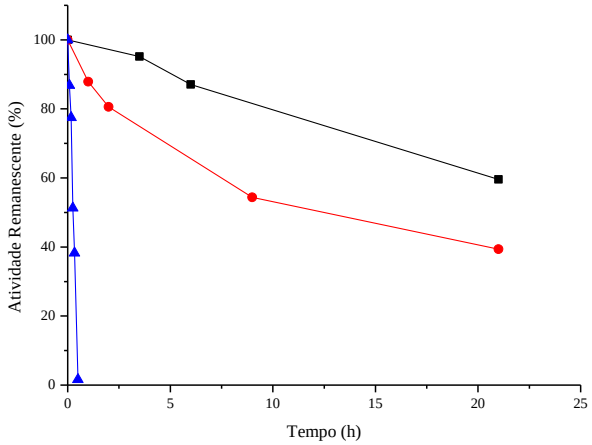
Fonte: Elaborada pela autora.

4.17 Estabilidade dos Derivados de LPF-Sepabeads

4.17.1 Estabilidade Térmica

O derivado bimolecular LPF-glioxil-Sepabeads-bi foi muito mais estável a 65ºC (pH 7,0) que o monomérico (LPF-glioxil-Sepabeads-mono), que por sua vez foi levemente menos estável que o derivado hidrofóbico LPF-octadecil-Sepabeads (Figura 4.33). O efeito estabilizante mais relevante parece ser a estabilização da configuração aberta da LPF.

Figura 4.33 Estabilidade térmica a 65ºC, tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 dos derivados de LPF octadecil-Sepabeads (■), glioxil-Sepabeads-bi (●) e glioxil-Sepabeads-mono (▲).

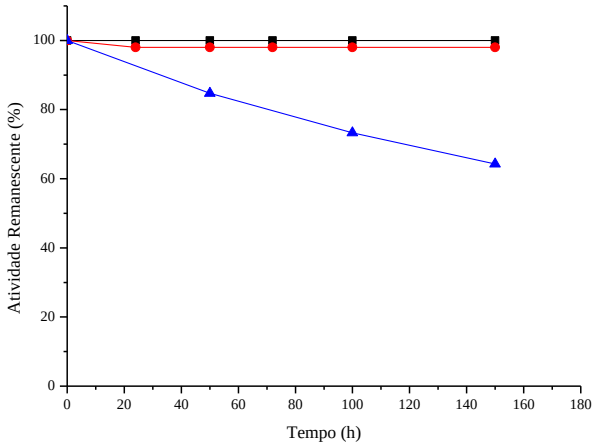


Fonte: Elaborada pela autora.

4.17.2 Estabilidade Térmica em Solventes Orgânicos

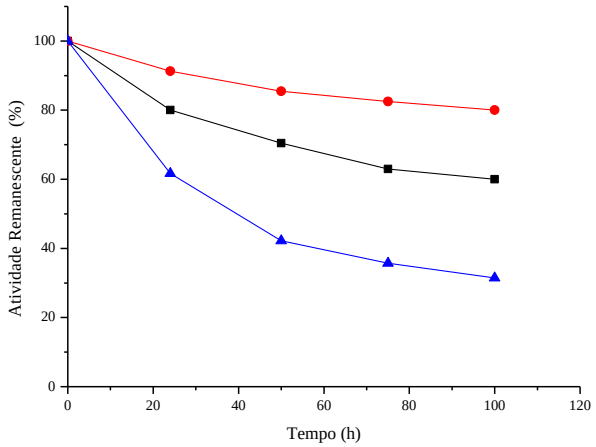
Todos os derivados preparados em Sepabeads (octadecil ou glioxil) foram bastante estáveis em ciclohexano a 60°C. O derivado monomérico LPF-glioxil-Sepabeads-mono foi o menos estável (Figura 4.34). Entretanto, em um solvente mais polar (2-metil-2-butanol) todos os derivados foram menos estáveis (Figura 4.35), mas mantendo-se a ordem de estabilidade glioxil-bi > glioxil-mono.

Figura 4.34 Inativação dos derivados de LPF octadecil-Sepabeads (■), glioxil-Sepabeads-bi (●) e glioxil-Sepabeads-mono (▲) incubados em 100 % do solvente Ciclohexano, a 60°C. Em diferentes tempos estas amostras foram utilizadas na reação de transesterificação do azeite de oliva com álcool benzílico a 25°C.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.35 Inativação dos derivados de LPF octadecil-Sepabeads (■), glioxil-Sepabeads-bi (●) e glioxil-Sepabeads-mono (▲) incubados em 100 % do solvente 2-metil-2-butanol, a 60°C. Em diferentes tempos estas amostras foram utilizadas na reação de transesterificação do azeite de oliva com álcool benzílico a 25°C.



Fonte: Elaborada pela autora.

5 CONCLUSÕES

- A derivatização da sílica com grupos octil resultou em um aumento de hidrofobicidade da superfície de aproximadamente 3 vezes. Este suporte (octil-sílica) apresentou poros com diâmetros (≈ 16 nm) de 2 a 3 vezes maiores em relação aos suportes comerciais poliestireno e XAD 7HP. Essas características o tornam adequado à imobilização de enzimas, particularmente lipases, para uso em reações em meio orgânico.
- O melhor derivado de lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) foi obtido por imobilização da enzima por adsorção hidrofóbica interfacial em octil-sílica a 25ºC, baixa força iônica (tampão fosfato de sódio 5 mM) e pH 7,0. Nestas condições, o rendimento de imobilização e a recuperação de atividade foram de 91% e 82%, respectivamente, rendendo um derivado de LPF com atividade hidrolítica de 650 U_{azeite}/g de suporte.
- O suporte octil-sílica permitiu um carregamento em torno de 130 mg de proteína/g de suporte, rendendo um derivado de LPF com atividade teórica de 11256 U_{azeite}/g. A isoterma de Langmuir ajustou-se aos dados experimentais de adsorção hidrofóbica de LPF em octil-sílica, demonstrando que a adsorção ocorre em monocamadas. O modelo de Langmuir previu um carregamento máximo do suporte de 14193 U_{azeite}/g de suporte.
- Lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em octil-sílica (LPF-octil-sílica) apresentou estabilidade térmica e em meio orgânico adequada para sua aplicação em reações de esterificação e transesterificação. Em solução aquosa (tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0) LPF imobilizada (baixa carga – 5 mg de proteína/g de suporte) e solúvel apresentaram estabilidades térmicas a 60ºC similares (meia-vida em torno de 30 h). Entretanto, em solução etanólica (36%, v/v) a 45ºC e pH 8,0 LPF imobilizada foi em torno de 12 vezes mais estável que a enzima solúvel. Em meio anidro (óleo de soja e etanol, razão molar 1:7) a 40ºC os derivados de LPF apresentaram meias-vidas de aproximadamente 93 h (LPF baixa carga – 5 mg de proteína/g de suporte) e 249 h (LPF alta carga – 40 mg de proteína/g de suporte), mostrando-se atrativos para a produção enzimática de biodiesel.

- Na síntese de oleato de etila o derivado LPF-octil-sílica mostrou eficiência de conversão similar aos biocatalisadores imobilizados comerciais (LTL, LPF e CALB). Conversões em torno de 90% foram obtidas após 12 h a 37ºC, 250 rpm e razão molar álcool/ácido de 1:1.
- LPF-octil-sílica foi adequado à produção de biodiesel de óleo de babaçu e soja. Nas condições estabelecidas (40º C, razão molar óleo:etanol de 1:7, 500 rpm e 0,2 g de biocatalisador/g de substrato) as reações de transesterificação forneceram rendimentos de 100% (transesterificação de óleo de babaçu por 24 h) e 80% (transesterificação de óleo de soja por 48 h). Lipase de *Candida antarctica* imobilizada (CALB IM) apresentou rendimento similar na etanólise do óleo de soja. O derivado LPF-octil-sílica pode ser reutilizado em três bateladas de transesterificação de óleo de soja, nas condições acima, sem perda significativa de atividade.
- Na síntese de aromas (acetato de butila, acetato de hexila, acetato de isoamila, butirato de butila e butirato de etila) a 37ºC e 250 rpm, por esterificação de ácidos graxos e álcool (razão molar 1:1), usando 200 U_{Est}/g de ácido, o derivado LPF-octil-sílica apresentou ótimo desempenho comparado aos biocatalisadores comerciais imobilizados (CALB, LPF e LTL), rendendo conversões em torno de 95% em 12 h de reação. Além disso, o derivado LPF-octil-sílica pode ser reutilizado em oito bateladas de síntese de butirato de butila (37ºC, 12 h, 250 rpm, razão molar ácido/álcool 1:1, 200 U_{Est}/g de ácido) sem nenhuma perda de atividade. Comportamento similar foi obtido com os biocatalisadores comerciais LTL e CALB.
- Na síntese de ésteres de açúcares, o melhor resultado foi obtido na acilação da frutose com ácido oleico, na presença de *terc*-butanol. Lipase de *Candida antarctica* B imobilizada (CALB IM) rendeu uma conversão de 96% (55º C, 24 h, razão molar ácido oleico/frutose de 1:2), enquanto o derivado LPF-octil-sílica rendeu 57% (45ºC, 72 h, razão molar de 1:1). A estabilidade operacional da lipase imobilizada CALB foi maior que a do derivado LPF-octil-sílica em bateladas repetidas de síntese de oleato de frutose a 45ºC e 48 h, provavelmente por a enzima estar covalentemente ligada ao suporte no primeiro derivado.

- Ésteres graxos de lactose (oleato e laurato) foram preparados com conversões menores (em torno de 40%), tanto com CALB IM como LPF-octil-sílica após 72 h de reação a 45ºC.
- Imobilização de LPF nos suportes hidrofóbicos octil-agarose e octadecil-Sepabeads (adsorção hidrofóbica interfacial) rendeu derivados hiperativados (150 e 300% de atividade recuperada, respectivamente), com rendimentos de imobilização de 99%. Entretanto, a imobilização de LPF (tanto agregados bimoleculares como monômeros) em suportes (agarose e Sepabeads) ativados com grupos glioxil rendeu derivados menos ativos (70 a 75% de atividade recuperada).
- LPF imobilizada covalentemente na forma de agregados bimoleculares em suporte glioxil-Sepabeads se mostraram mais estáveis (termicamente e na presença de solventes orgânicos) do que LPF imobilizada covalentemente na forma de monomérica.
- A enantiosseletividade da lipase de *Pseudomonas fluorescens* pode ser modulada por sua imobilização em diferentes suportes. LPF imobilizada em octil-agarose (monômeros com conformação aberta) e em glioxil-agarose (agregados bimoleculares com conformação aberta) mostraram-se mais seletivos (E > 100) na hidrólise de (*R*,*S*)-2-hidróxi-4-fenilbutirato de etila do que LPF imobilizada na forma monomérica em glioxil-agarose (conformação fechada) (E = 27,9).
- LPF imobilizada em octadecil-Sepabeads e glioxil-Sepabeads (agregados bimoleculares e forma monomérica) exibiram similar desempenho na síntese de oleato de benzila por transesterificação de azeite de oliva e álcool benzílico a 25ºC, razão molar álcool:azeite de 1:2, na presença de ciclohexano (85% de conversão em 72 h).

6 SUGESTÕES

Para aperfeiçoamento neste estudo, propõem-se as seguintes etapas:

- Realizar a síntese de ésteres etílicos (biodiesel) e ésteres graxos de açúcares variando a porcentagem de água no meio reacional.

- Realizar a síntese de ésteres graxos de açúcares em meio não-convencional.

- Utilizar diferentes configurações de reatores (leito fixo e leito fluidizado) na síntese enzimáticas de ésteres.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor sp*. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 32, p. 589-595, 2003.

ABDULMALEK, E.; SAUPI, H. S. M.; TEJO, B. A.; BASRI, M.; SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; RAHMAN, M. B. A. Improved enzymatic galactose oleate ester synthesis in ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 37-43, 2012.

AEHLE, W. **Enzymes in Industry: Production and Applications.** Wiley VCH, 2 ed., 2004.

AL-DURI, B.; ROBINSON, E.; MCNERLAN, S.; BAILIE, P. Hydrolysis of edible oils by lipases immobilized on hydrophobic supports: Effects of internal support structure. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** v. 72, p. 1351-1359, 1995.

AL-ZUHAIR, S. The effect of substrate concentrations on the production of biodiesel by lipase-catalysed transesterification of vegetable oils. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology,** v. 81, p. 299-305, 2006.

AMUDA, O. S.; GIWA, A. A.; BELLO, I. A. Removal of heavy metal from industrial wastewater using modified activated coconut shell carbon. **Biochemical Engineering Journal,** v. 36, p. 174-181, 2007.

ARAGÃO, V. C.; ANSCHAU, A.; PORCIUNCULA, B. D. A.; THIESEN, C.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova,** v. 32, p. 2268-2272, 2009.

BALAT, M.; BALAT, H.A critical review of bio-diesel as a vehicular fuel. **Energy Conversion and Management,** v. 49, p. 2227-2741, 2008.

BARNWAL, B.K.; SHARMA, M. P. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** v. 9, p. 363-378, 2005.

BASTIDA, A; SABUQUILLO, P; ARMISEN, P; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R; HUGUET, J; GUISÁN, J. M.A Single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 58,p. 486-493, 1998.

BAYRAMOGLU, G.; KAYA, B.; ARICA, M. Y. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto spacer-arm attached poly (GMA-HEMA-EGDMA) microspheres. **Food Chemistry,** v. 92, p. 261-268, 2005.

BELTER, P.A.; CUSLLER, E.L.; WEI-SHOU, H., **Bioseparations: downstream processing for biotechnology.** Wiley-interscience, 1988.

BERNAL, C.; ILLANES, A.; MESA, M.; SIERRA, L.; WILSON, L. Immobilization of lipase from *Candida antarctica* B in meso-macroporous glyoxil silica for sugar ester synthesis. In: **XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Búzios, 2012.

BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Preparation of a very stable immobilized biocatalyst of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology,** v. 121, p. 284- 289, 2006.

BEZBRADICA, D.; MIJIN, D.; SILER-MARINKOVIC, S.; KNEZEVIC, Z. The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 45, p. 97-101, 2007.

BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of enzymes and cells**. 2. ed. Totowa: Humana Press, 1997. 465 p.

BICKERSTAFF, G. F. Impact of genetic technology on enzyme technology. **Genetic Engineering Biotechnology**, v. 15, p. 13-30, 1995.

BOSLEY, J. A.; PEILOW, A. D. Immobilization of lipases on porous polypropylene: Reduction in esterification efficiency at low loading. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** v. 74, p. 107-111, 1997.

BLANCO, R. M.; GUISÁN, J. M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 11, p. 360-366, 1989.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; FERNÁNDEZ-PEREZ, M.; OTERO, C.; DÍAZ-GONZÁLEZ, G. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization characterization of the support and the catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 30, p. 83-93, 2004.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; MUÑOZ, N.; SERRA, E. Ethanol improves lipases immobilization on a hydrophobic support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 47, p. 13-20, 2007.

BOLIVAR, J. M.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; GODOY, C.; RODRIGUES, D. S.; RODRIGUES, R. C.; BATALLA, P.; ROCHA-MARTÍN, J.; MATEO, C.; GIORDANO, R. C. L.; GUISÁN, J. M. The presence of thiolated compounds allows the immobilization of enzymes on glyoxyl agarose at mild pH values: New strategies of stabilization by multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 477-483, 2009.

BONDIOLI, P.; GASPAROLI, A.; LANZANI, A.; FEDELI, E.; VERONESE, S.; SALA, M. Storage stability of biodiesel. **Journal of American Oil Chemists' Society,** v. 72, p. 669-702, 1995.

BORGES, M. R. **Síntese enzimática de ésteres de açúcar: surfactantes e polímeros como novos materiais ambientalmente seguros.** 2007, Tese (Doutorado em Ciências e

Engenharia de Materiais) – Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.** 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001.

BOSCOLO, M. Sucroquímica: Síntese e potencialidade de aplicações de alguns derivados químicos de sacarose. **Química Nova,** v. 26, p. 906-912, 2003.

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

BRADY, L.; BRZOZOWSKY, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; THIM, L. MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature,** v. 343, pp. 767-770, 1990.

CABRERA, Z.; PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, GUISÁN, J. M. Partial and enantioselective hydrolysis of diethyl phenylmalonate by immobilized preparations of lipase from *Thermomyces lanuginose*. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 40, p. 1280-1285, 2007.

CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology,** v. 97, p. 2195-2210, 2006.

CANAKÇI, M.; VAN GERPEN, J. Biodiesel production via acid catalysis. **Transactions of the ASAE,** v. 42, p. 1203-1210, 1999.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Biocatalisadores imobilizados. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento Ano IX,** n. 36. Disponível em http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio36/biocatalizadores_36.pdf. Acesso em 25 de Janeiro de 2013.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova,** v. 28, p. 614-621, 2005.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, p.75-80, 2003.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica,** v. 23, p. 60-70, 2006.

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

CASTRO-OCHOA, L.D.; RODRIGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R.O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 37, p. 648-654, 2005.

CHANG, H. M.; LIAO, H. F.; LEE, C. C.; SHIEH, C. J. Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology,** v. 80, p. 307-312, 2005.

CHEN, C.-S.; FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIH, C. J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, p. 7294-7299, 1982.

COSTA NETO, P. R. C.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova,** v. 23, p. 531-537, 2000.

CÔTÉ, A.; SHARECK, F. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces collicolor* A 3(2). **Enzyme and Microbial Technology,** v. 42, p. 381-388, 2008.

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

DARNOKO, D.; CHERYAN, M. Kinetics of palm oil transesterification in a batch reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** v. 77, p. 1263-1267, 2000.

DASILVEIRA NETO, B. A.; ALVES, M. B.; LAPIS, A. A. M.; NACHTIGALL, F. M.; EBERLIN, M. N.; DUPONT, J.; SUAREZ, P. A. Z. 1-n-Butyl-3-methylimidazolium tetrachloro-indat (BMI·InCl4) as a media for the synthesis of biodiesel from vegetable oils. **Journal of Catalysis,** v. 249, p. 154-161, 2007.

DIZGE, N.; KESKINLER, B.Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Bioenergy,** v. 32, p. 1274-1278, 2008.

DOYMAZ, I. Effect of pre-treatments using potassium metabisulphide and alkaline ethyl oleate on the drying kinetics of apricots. **Biosystems Engineering,** v. 89, p. 281-287, 2004.

DU, W.; XU, Y. Y.; ZENG, J.; LIU, D. H. Novozym 435-catalysed transesterification of crude soya bean oil for biodiesel production in a solvent-free medium. **Biotechnology and Applied Biochemistry,** v. 40, p. 187-190, 2004**.**

EL SEOUD, O. A.; KOSCHELLA, A.; FIDALE, L. C.; DORN, S.; HEINZE, T. Applications of ionic liquids in carbohydrate chemistry: A window of opportunities. **Biomacromolecules,** v. 8, p. 2629-2647, 2007.

ERICSSON, D. J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANDSTROM, A. G.; BACKVALL, J. E.; MOWBRAY, S. L. X-Ray structure of *Candida antarctica*

lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of Molecular Biology,** v. 376, p. 109-119, 2008.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry.** Berlin: Springer-Verlag, 1997, 454p.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 197-212, 2010.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISEN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 93, p. 185-197, 1998.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GODOY, C. A.; MENDES, A. A.; LOPEZ-GALLEGO, F.; GRAZU, V.; DE LAS RIVAS, B.; PALOMO, J. M.; HERMOSO, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose. **Biomacromolecules,** v. 9, p. 2553-2561, 2008.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 82, p. 232-237, 2003.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; TERRENI, M.; MATEO, C.; BASTIDA, A.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; DALMASES, P.; HUGUET, J.; GUISÁN, J. M. Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 28, p. 389-396, 2001.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova,** v. 28, p. 19-23, 2005.

FERRER, M.; PLOU, F. J.; FUENTES, G.; CRUCES, M. A.; ANDERSEN, L.; KIRK, O.; CHRISTENSEN, M.; BALLESTEROS, A. Effect of the immobilization method of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on sucrose acylation. **Biocatalysts and Biotransformations**, v. 20, p. 63-71, 2002.

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.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 74, 1997.

GEORGOGIANNI, K. G.; KONTOMINAS, M. G.; POMONIS, P. J.; AVLONTIS, D.; GERGIS, V. Alkaline conventional and *in Situ* transesterification of cottonseed oil for the production of biodiesel. **Energy & Fuels,** v. 22, p. 2110-2115, 2008.

GERIS, R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja – Reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova,** v. 30, p. 1369-1373, 2007.

GUISÁN, J. M. Aldehyde gels as activated support for immobilization stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 10, p. 375-382, 1988.

GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M.; HEIDELBERG, T.; CHISTI, Y. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. **Process Biochemistry,** v. 46, p. 2079-2090, 2011.

GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. Effects of degree of deacetylation and crosslinking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers,** v. 66, p. 43-54, 2006.

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

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances,** v. 27 p. 782-798, 2009.

HAZARIKA, S.; GOSWAMI, P.; DUTTA, N.N.; HAZARIKA, A.K. Ethyl oleate synthesis by porcine pancreatic lipase in organic solvents. **Chemical Engineering Journal,** v. 85, p. 61-68, 2002.

HE, H.; WANG, T.; ZHU, S. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using supercritical methanol process. **Fuel,** v. 86, p. 442-447, 2007.

HERNANDEZ, K.; GARCIA-VEDUGO, E.; PORCAR, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Hydrolysis of triacetin catalyzed by immobilized lipases: effect of the immobilization protocol and experimental conditions on diacetin yield. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 48, p. 510-517, 2011.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinions in Biotechnology,** v. 13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology,** v. 16, p. 396-403, 1998.

JANG, M.G.; KIM, D. K.; PARK, S. C.; LEE, J. S.; KIM, S. W. Biodiesel production from crude canola oil by two-step enzymatic processes. **Renewable Energy,** v. 42, p. 99-104, 2012.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; MATSUMOTO, T.; BAN, K.; KONDO, A.; SHIMADA, Y.; NODA, H.; NOMOTO, F.; OHTSUKA, K.; IZUMOTO, E.; FUKUDA, H. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-

containing system without an organic solvent. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, p. 627–631, 1999.

KENNEDY, J. F. **Enzyme Technology.** *In*: REHM, H. J.; REED, G. (Eds.). Biotechnology. v. 7a. Weinheim: VCH, 1987.

KIM, S. H.; KIM, S.-J.; PARK, S.; KIM, H. K. Biodiesel production using cross-linked *Staphylococcus haemolyticus* lipase immobilized on solid polymeric carriers. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p. 10-16, 2013.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C.; Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology,** v. 13, p. 345-351,2002.

KISS, M. A.; SEFANOVITS-BÁNYAI, É.; TÓTH, Á.; BOROSS, L. Extractive synthesis of ethyl-oleate using alginate gel co-entrapped yeast cells and lipase enzyme. **Engineering in Life Sciences,** v. 4, n.5, p. 460-464, 2004.

KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature,** v. 409, p. 241-246, 2001.

KLIBANOV, A. M. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. **Advances in Applied Microbiology,** v. 29, p. 1-28, 1983.

KNEZEVIC, Z.; BOBIC, S.; MILUTINOVIC, A.; OBRADOVIC, B.; MOJOVIC, L.; BUGARSKI, B. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. **Process Biochemistry,** v. 38, p. 313-318, 2002.

KNEZEVIC, Z.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JAKOVLJEVIC, Z. PRODANOVIC, R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit (R) supports by covalent attachment. **Biochemical Engineering Journal,** v. 30, p. 269-278, 2006.

KUCEK, K. T. **Otimização da transesterificação etílica do óleo de soja em meio alcalino**. 2004. 123 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

KUMAR, R.; MODAK, J.; MADRAS, G. Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. **Biochemical Engineering Journal,** v. 23, p. 199-202, 2005.

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. Enzimatic transesterification of *Jatropha* oil. **Biotechnology for Biofuels,** v. 2, p. 1-7, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature,** v.277, p.680-685, 1970.

LEE, D. H.; KIM, J. M.; SHIN, H. Y.; KANG, S. W.; KIM, S. W. Biodiesel production using a mixture of immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* lipases. **Biotechnology and Bioprocess Engineering,** v. 11, p. 522-525, 2006.

LEE, S.-H.; PARK, O.-J.; UH, H.-S. A chemoenzymatic approach to the synthesis of enantiomerically pure (S)-3-hidroxy-γ-butyrolactone. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 79, p. 355-362, 2008.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica.**3. ed., São Paulo, 2002.

LEWICKI, P. P. Design of hot air drying for better foods. **Trends in Food Science & Technology,** v. 17, p. 153-163, 2006.

LI, Y.; GAO, F.; WEI, W.; QU, J.-B.; MA, G.-H. ; ZHOU, W.-Q. Pore size of macroporous polystyrene micrspheres affects lipase immobilization. **Journal of Molrcular Catalysis B: Enzymatic,** v. 66, p. 182-189, 2010.

LIMA, L. N.; ARAGON, C. C.; MATEO, C.; PALOMO, J. M.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOLI, P. W.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G. Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent attachment. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 118-123, 2013.

LIU, C.-H.; HUANG, C.-C.; WANG, Y.-W.; LEE, D.-J; CHANG, J.-S. Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by *Burkholderia* lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. **Applied Energy**, v. 100, p. 41-46, 2012.

LIU, X.; PIAO, X.; WANG, Y.; ZHU, S. Calcium ethoxide as a solid base catalyst for the transesterification of soybean oil to biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 22, p. 1317-1317, 2008.

LLER, R. K**. The Chemistry of Silica:** solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry. Wiley, 1979, 866p.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology,** v. 116, p. 1-10, 2005.

LOTERO, E.; LIU, Y.; LOPEZ, D. E.; SUWANNAKARN, K.; BRUCE, D. A.; GOODWIN JR, J. G. Synthesis of biodiesel via acid catalysis. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 44, p. 5353-5363, 2005.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology,** v. 70, p. 1-15, 1999.

MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. **Microporous and Mesoporous Materials,** v. 118, p. 334-340, 2009.

MADALOZZO, A. D. **Síntese de ésteres etílicos utilizando uma lipase recombinante de *Rhizopus oryzae*.** 2011. 149 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímicas) – Ciências Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova,** v. 33, p. 1559-1568, 2010.

MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Multifunctional epoxy supports: a new tool improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. **Biomacromolecules,** v. 1, p. 739-745, 2000.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivityvia immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MATEO, C.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; HIDALGO, A.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; ABIAN, O.; PALOMO, J. M.; BETANCOR, L.; PESSELA, B. C. C., GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. **Biomacromolecules,** v. 4, p. 772-777, 2003.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews,** v. 10, p. 248-268, 2006.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel.** 2009, 194 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C. Preparation and application of epoxy-chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. **Reactive and Functional Polymers,** v. 73, p. 160-167, 2013.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; RODRIGUES, D. S.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P. W.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: Influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,** v. 38, p. 1055-1066, 2011a.

MENDES, A. A.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. C. L.; CASTRO, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 109-115, 2011b.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; VÉLEZ, A. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; CASTRO, H. F. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 50, p. 505-511, 2012.

MENDES, A. A.; RODRIGUES, D. S.; FILICE, M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M.; PALOMO, J. M. Regioselective monohydrolysis of per-*o*-acetylated-1-substituted-β-glucopyranosides catalyzed by immobilized lipases. **Tetrahedron,** v. 64, p. 10721-10727, 2008.

MHETRAS, N.; PATIL, S.; GOKHALE, D. Lipase of *Aspergillus niger* NCIM 1207: a potential biocatalyst for synthesis of isoamyl acetate. **Indian Journal of Microbiology,** v. 50, p. 432-437, 2010.

MIKKELSEN, S. R.; CORTON, E. **Bioanalytical chemistry.** New Jersey: John Wiley & Sons, 2004, 382 p.

MILETIC, N.; ABETZ, V.; EBERT, K.; LOOS, K. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on polystyrene nanoparticles. **Macromolecular Rapid Communications,** v. 31, p. 71-74, 2010.

MOREIRA, A. B. R.; PEREZ, V. H.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica–PVA composite. **Energy & Fuels**, v. 21, p. 3689–3694, 2007.

MOZHAEV, V. V.; MELIK-NUBAROV, N. S.; SIKSNIS, V.; MARTINEK, K. Strategy for stabilizing enzymes. Part one: increasing stability of enzymes via their multi-point interaction with a support. **Biocatalysis,** v. 3, p. 179-187, 1990.

NARANJO, J. C.; CÓRDOBA, A.; GIRALDO, L.; GARCÍA, V. S.; PIRAJÁN, J. C. M. Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 66, p. 166-171, 2010.

NELSON, L.A.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** v. 73, p. 1191-1195, 1996.

NETA, N. A. S.; SANTOS, J. C. S.; SANCHO, S. O.; RODRIGUES, S.; GONÇALVES, L. R. B.; RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A. Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. **Food Hydrocolloids,** v. 27, p. 324-331, 2012.

OLIVEIRA, J. S.; LEITE, P. M.; SOUZA, L. B.; MELLO, V. M.; SILVA, E. C.; RUBIM, J. C.; MENEGHETTI, S. M. P.; SUAREZ, P. A. Z. Characteristics and composition of *Jatropha gossypiifolia* and *Jatropha curcas* L. oils and application for biodiesel production. **Biomass and Bioenergy,** v. 33, p. 449-453, 2009.

OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; CASTRO, H. F. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 23, p. 632-636, 2000.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipase. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 27, p. 187-204, 2000.

PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. **Biomacromolecules,** v.4, p. 1-6, 2003.

PALOMO, J. M.; MUNOZ, G.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (Octadecyl-Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 19-20, p. 279-286, 2002.

PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FUENTES, M.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of Mucor miehei lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins Hydrolytic resolution of (R,S)-2-butyroyl-2-phenylacetic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 21, p. 201-210, 2003.

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. **Journal of Chromatography A,** v. 1038, p. 267-273, 2004.

PALOMO, J.M.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 36, p. 447-454, 2005.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lípases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova,** v. 29, p. 93-99, 2006.

PATIL, D.; LEONARDIS, A.; NAG, A. Synthesis of biosurfactants from natural resources. **Journal of Food Biochemistry,** v. 35, p. 747-758, 2011.

PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C. S.; CASTRO, H. F. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. **Química Nova,** v. 28, p. 792-796, 2005.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; CASTRO, H. F. 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.

PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: Catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology,** v. 82, p. 281-288, 2007.

PEREIRA, G. H. A. **Estudo da imobilização multipontual da penicilina G acilase em sílica ativada com grupos glioxil.** 1996. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.

PETERSON, C.; MÖLLER, G.; HAWS, R.; ZHANG, X.; THOMPSON, J.; REECE, D. **Optimization of a batch type ethyl ester process.** Disponível em: <http://journeytoforever.org/biofuel_library/ethyl_esters.html>. Acesso em: 08 de agosto de 2011.

PETKAR, M.; LALI, A.; CAIMI, P.; DAMINATI, M . Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 39, p. 83-90, 2006.

PRLAINOVIC, N. Z.; BEZBRADICA, D. I.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. D.; STEVANOVIC, S. I.; IVIC, M. L. A.; USKOKOVIC, P. S.; MIJIN, D. Z. Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on multi walled carbon nanotubes. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, p. 279-285, 2013.

QUINTELLA, C. M.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A.; COSTA NETO, P. R.; TORRES, E. A.; CASTRO, M. P.; JESUS, C. A. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. **Química Nova,** v. 32, p. 793-808, 2009.

RADHIKA, M.; PALANIVELU, K. Adsorptive removal of chlorophenols from aqueous solution by low cost adsorbent – Kinetics and isotherm analysis. **Journal of Hazardous Materials,** v. 138, p. 116-124, 2006.

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMINGOS, A. K.; WILHELM, H. M. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento,** v. 31, p. 28-37, 2003.

RASHID, U.; ANWAR, F.; MOSER, B. R.; KNOTHE, G. *Moringa oleifera* oil: A possible source of biodiesel. **Bioresource Technology,** v. 99, p. 8175-8179, 2008.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.147-148, p.237-250, 2009.

RESINDION. **ReliZyme™ and Sepabeads® EC Enzyme carriers**. Disponível em http://www.resindion.com/images/stories/resindion/download/RESINDION_ReliZyme_SepabeadsEC_giu12_web.pdf. Acesso em 24 de janeiro de 2013.

RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan

and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 51, p. 100-109, 2008.

RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. F. M.; SILVA, M. A. S.; MATOS, J. R. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da zidovudina (AZT). **Acta Farmacêutica Banaerense,** v. 24, p. 383-387, 2005.

RODRIGUES, R. C.; PESSELA, B. C. C.; VOLPATO, G.; FERNÁDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M.; AYUB, M. A. Z. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1268-1273, 2010.

RODRIGUES-NOGALES, J. M.; ROURA, E.; CONTRERAS, E. Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach. **Process Biochemistry,** v. 40, p. 63-68, 2005.

ROHM AND HAAS COMPANY. **Ficha Técnica PDS 0529A da Amberlite XAD7HP,** Sao Paulo, 1999.

ROMERO, M. D.; CALVO, L.; ALBA, C.; DANESHFAR, A. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. **Journal of Biotechnology,** v. 127, p. 269-277, 2007.

ROSSET, I. G.; TAVARES, M. C. H.; ASSAF, E. M.; PORTO, A. L. M. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and H^1NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General**, v. 392, p. 136-142, 2011.

RUTHVEN, D. M. **Principles of adsorption and adsorption processes**. New York: John Wiley, 1984. 433 p.

SAAD, E. B. **Etanólise do óleo de milho empregando catalisadores alcalinos e enzimáticos.** 2005, 115 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SABEDER, S.; HABULIN, M.; KNEZ, Z. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. **Journal of Food Engineering,** v. 77, p. 880-886, 2006.

SABUQUILLO, P.; REINA, J.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Interfacial affinity chromatography of lipases: separation of different fractions by selective absorption on supports activated with hydrophobic groups. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1388, p. 337-348, 1998.

SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 30, p. 717-723, 1987.

SALIS, A.; BHATTACHARYYA, M. S.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for

biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 57, p. 262-269, 2009.

SALIS, A.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Use of lipases for the production of biodiesel. *In:* POLAINA, J.; MacCABE, A. P. (eds.) **Industrial Enzymes,** Springer: Dordrecht, 2007.

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

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

SAPONJIC, S.; KENEZEVIC-JUGOVIC, Z. D.; BEZBRADICA, D. J.; ZUZA, M. G.; SAIED, O. A.; BOSKOVIC-VRAGOLOVIC, N.; MIJIN, D. Z. Use of *Candida rugosa* lipase immobilized on Sepabeads for the amyl caprylate synthesis: batch and fluidized bed reactor study. **Electronic Journal of Biotechnology,** v. 13, p. 1-15, 2010.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** v. 9, p. 199-210, 1998.

SECUNDO, F.; MIEHE-BRENDLE, J.; CHELARU, C.; FERRANDI, E. E.; DUMITRIU, E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials,** v. 109, p. 350-361, 2008.

SÉVERAC, E.; GALY, O.; TUROUN, F.; PANTEL, C. A.; CONDORET, J. S.; MONSAN, P.; MARTY, A. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: analysis of the economical impact. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 48, p. 61-70, 2011.

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

SHIH, I.-L.; HUNG, S.-H.; CHEN, F.-Y.; JU, H.-Y.; SHIEH, C.-J. Optimized synthesis of lipase-catalyzed L-menthyl butyrate by *Candida rugosa* lipase. **Food Chemistry,** v. 100, p. 1223-1228, 2007.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** v. 76, p. 789-793, 1999.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SHUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 133-142, 2002.

SHU, Z.Y.; JIANG, H.; LIN, R.F.; JIANG, Y.M.; LIN, L.; HUANG, J.Z. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 62, p. 1-8, 2010.

SILVA, C. C. C. M.; AGUIAR, M. F.; FERREIRA, T. B.; ARANDA, D. A. G.; SOUZA, M. M. V. M. Comparação da atividade do catalisador do tipo hidrotalcita na transesterificação do óleo de soja bruto e refinado. *In*: 5º CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 2008, Lavras. **Anais do 5º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel.** Lavras: UFLA, 2008.

SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. C. L.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 16-24, 2012.

SILVA. W. O. B.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisophae*. **Process Biochemistry,** v. 40, p. 321-326, 2005.

SKORONSKI, E.; BONETTI, T. M.; JOÃO, J. J.; FÚRIGO JÚNIOR, A. Estudo cinético da obtenção de ésteres utilizando a enzima Lipozyme TL IM como catalisador. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 897-902, 2010.

SLEJKO, L. F. **Adsorption Technology: a step-by-step approach to process evaluation and application.** New York: Marcel Dekker, 1985.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 77-79, p. 745-757, 1999.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 33, p. 97-103, 2003.

SUAREZ, P. A. Z.; MENENGHITTI, S. M. P. 70° Aniversário do biodiesel em 2007: Evolução histórica e situação atual no Brasil. **Química Nova,** v. 30, p. 2068-2071, 2007.

SUN, P.; CHEN, Y.; WANG, H.; LI, J.; GAO, J.; WANG, H.; ZHENG, X.; ZHANG, S. Lipase-catalyzed synthesis and characterization of myristoyl maltose ester. **European Food Research Technology**, v. 233, p. 253-258, 2011.

SUTILI, F. K.; RUELAA, H. S.; LEITE, S. G. F.; MIRANDA, L. S. M.; LEALA, I. C. R.; SOUZA, R. O. M. A. Lipase-catalyzed esterification of steric hindered fructose derivative by continuous flow and batch conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 85- 86 p. 37- 42, 2013.

TAKAÇ, S.; BAKKAL, M. Impressive effect of immobilization conditions on the catalytic activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase to ward S-naproxen production. **Process Biochemistry,** v. 42, p. 1021-1027, 2007.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K. Biodiesel production with immobilized lipase: A review, **Biotechnology Advances,** v. 28, p. 628-634, 2010.

TANI, K.; SUZUKI, Y. Influence of titania matrix on retention behaviour in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A,** v. 722, p. 129-134, 1996.

THAKAR, A.; MADAMWAR, D. Enhanced ethyl butyrate production by surfactant coated lipase immobilized on silica. **Process Biochemistry,** v. 40, p. 3263-3266, 2005.

TIOSSO, P. C.; PERNA, R. S.; TARDIOLI, P. W.; AMUD, A. E.; SOARES, C. M. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Imobilização de lipase de *Candida rugosa* via adsorção interfacial em octadecil-Sepabeads. In: **XV Encontro Anual de Iniciação Científica,** Londrina, 2006.

TODA, M.; TAKAGAKI, A.; OKAMURA, M.; KONDO, J. N.; HAYASHI, S.; DOMEN, K. HARA, M. Biodiesel made with sugar catalyst. **Nature**, v. 438, p. 178, 2005.

TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 67, p. 52-59, 2010.

VICENTE, G.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresource Technology,** v. 92, p. 297-305, 2004.

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

VINU, A.; MIYAHARA, M.; ARIGA, K. Biomaterial immobilization in nanoporous carbon molecular sieves: influence of solution pH, pore volume and diameter. **Journal of Physical Chemistry B,** v. 109, p. 6436-6441, 2005.

WANG, W.; MIO, S.; WANG, P.; ZHANG, S. Highly efficient synthesis of sucrose monolaurate by alkaline protease protex 6L. **Bioresource Technology,** v. 109, p.7-12, 2012.

WARDLE, D. A. Global sale of green air travel supported using biodiesel. **Renewable Sustainable Energy Reviews,** v. 7, p. 1-64, 2003.

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

WIKIPÉDIA. Disponível em http://pt.wikipedia.org/wiki/Poliestireno. Acesso em dezembro de 2012.

WILKINSON, B.; BACHMANN, B.O. Biocatalysis in pharmaceutical preparation and alteration.**Current Opinion in Chemical Biology,** v. 10, p. 169-176, 2006.

WILSON, L.; PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ILLANES, A.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Effect of lipase-lipase interactions in the activity, stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes sp*. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 39, p. 259-264, 2006.

XU, Y.; NORDBLAD, M.; WOODLEY, J. M. A two-stage enzymatic ethanol-based biodiesel production in a packed bed reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 162, p. 407-414, 2012.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M.; Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 438-450, 1998.

YE, R.; PYO, S.-H.; HAYES, D. G.; Lipase-catalyzed synthesis of saccharide-fatty acid esters using suspensions of saccharide crystals in solvent-free media. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** v. 87, p. 281-293, 2010.

YU, W. H.; FANG, M.; TONG, D. S.; SHAO, P. XU, T. N. ZHOU, C. H. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hexagonal mesoporous silicas and selective esterification in nonaqueous medium. **Biochemical Engineering Journal,** v. 70, p. 97-105, 2013.

ZAIDAN, U. H.; RAHMAN, M. B. A.; OTHMAN, S. S.; BASRI, M.; ABDULMALEK, E.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; SALLEH, A. B. Biocatalytic production of lactose ester catalyzed by mica-based immobilized lipase. **Food Chemistry,** v. 131, p. 199-205, 2012.

ZHANG, J.; HOU, Z.; YAO, C.; YU, Y. Purification and properties of a lipase from a *Bacillus* strain for catalytic resolution of (R)-Naproxen. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 18, p. 205-210, 2002.

ZHENG, S.; KATES, M.; DUBÉ, M. A.; MCLEAN, D. D. Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil. **Biomass and Bioenergy,** v. 30, p. 267-272, 2006.

APÊNDICE A

Figura A.36 Curva padrão para determinação de proteínas pelo método de Bradford.

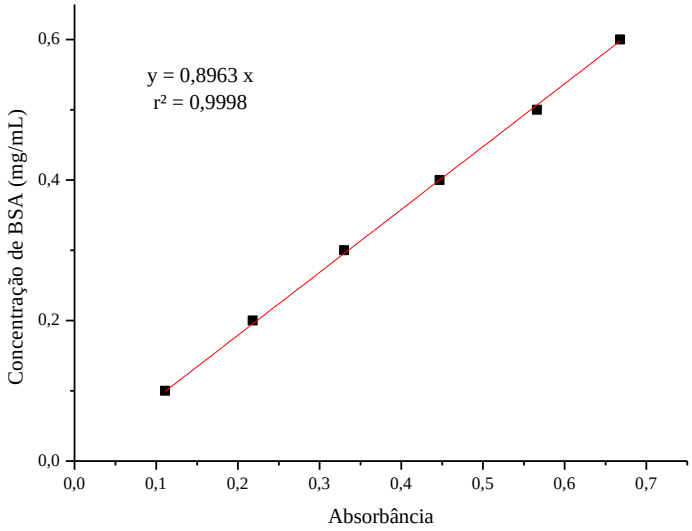


Figura A.37 Curva padrão para determinação da hidrofobicidade (rosa de bengala).

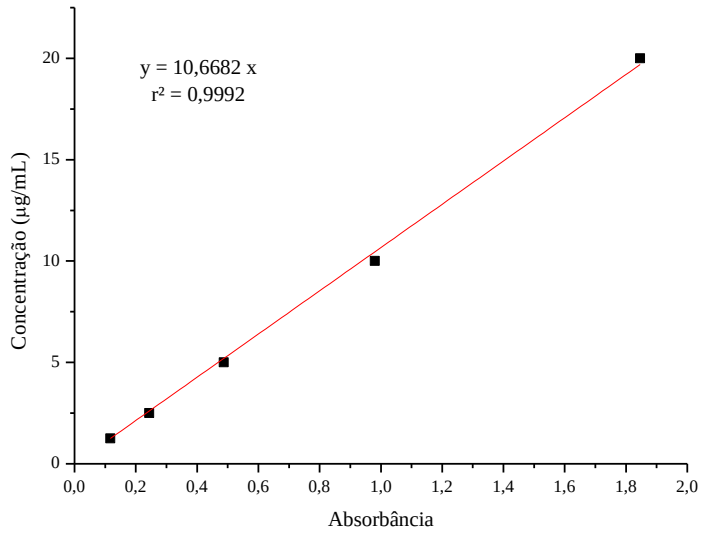


Figura A.38 Curva padrão para determinação da concentração de butanol.