

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

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL UTILIZANDO ETANOL E
ÓLEO DE SOJA OU DE MACAÚBA, CATALISADA POR LIPASE DE
MAMONA E DE *Thermomyces lanuginosus***

Felipe de Almeida Silva

São Carlos
2015

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

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL UTILIZANDO ETANOL E
ÓLEO DE SOJA OU DE MACAÚBA, CATALISADA POR LIPASE DE
MAMONA E DE *Thermomyces lanuginosus***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Mestrando: Felipe de Almeida Silva

Orientador: Profa. Dra. Raquel de L. C. Giordano

Co-orientadores: Prof. Dr. Adriano A. Mendes

Dr. Willian Kopp

São Carlos

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

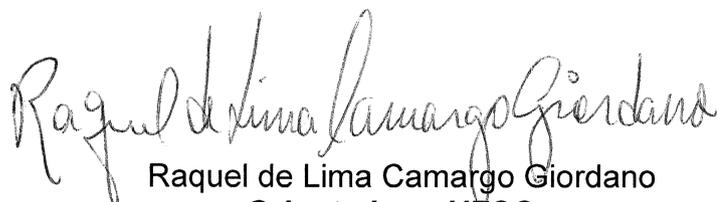
S586e Silva, Felipe de Almeida
Estudo da produção de biodiesel utilizando etanol e óleo de soja ou de macaúba, catalisada por lipase de mamona e de *Thermomyces lanuginosus* / Felipe de Almeida Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
140 p.

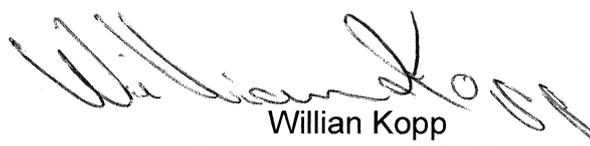
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Transesterificação. 2. Hidroesterificação. 3. Óleos vegetais. 4. Lipase vegetal. 5. Mamona. I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE FELIPE DE ALMEIDA SILVA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 27 DE FEVEREIRO DE 2015.

BANCA EXAMINADORA:


Raquel de Lima Camargo Giordano
Orientadora, UFSCar


Willian Kopp
Coorientador, UFSCar


Adriano Aguiar Mendes
Coorientador, UNIFAL


Sandra Cerqueira Pereira
EMBRAPA


Paulo Waldir Tardioli
UFSCar

*Dedico esse trabalho aos meus pais,
Elis e Joaquim, pelo incentivo,
confiança e apoio:
ontem, hoje e sempre!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Jeová Deus, pela vida concedida, pela instrução e revigoração que Sua palavra fornece. “Digno és, Jeová, sim, nosso Deus, de receber a glória, e a honra, e o poder, porque criaste todas as coisas e porque elas existiram e foram criadas por tua vontade.” – Apo. 4:11

À minha família: minha mãe Elis pelo apoio, ombro amigo, carinho e dedicação mesmo a distância; ao meu pai Joaquim pelo apoio incondicional, interesse e confiança; minha irmã Débora pelo carinho e atenção dispensada todos os momentos.

À Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano, pela oportunidade de cursar o mestrado sob sua orientação; pela atenção, pelos conselhos e paciência materna. Agradeço a disposição em cuidar não apenas da minha formação acadêmica, mas por inculcar valores e ideais que me qualificam como um profissional completo.

Agradeço ao Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes pela confiança em minha capacidade e trabalho; pelos conselhos e co-orientação; pela prontidão e agilidade em contribuir mesmo estando distante.

Ao Dr. Willian Kopp agradeço a disposição não apenas co-orientar o trabalho, mas a oportunidade de trabalhar lado-a-lado ao longo de todo o projeto; discutir resultados e contribuir sempre. Agradeço as sugestões, as reuniões, os bons conselhos e a amizade.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Paulo W. Tardioli e Dra. Sandra Cerqueira Pereira, pela disposição em aceitar o convite de ser da comissão avaliadora deste trabalho. Ao Prof. Dr. Rubens Monti pelas sugestões dadas no exame de qualificação.

À minha namorada Patrícia com muito amor e carinho, pela amizade e companheirismo. Por alegrar os meus dias e me acalmar nos momentos críticos. Suas palavras animadoras certamente me pouparam alguns cabelos brancos!

À amiga Thaís agradeço o companheirismo, apoio, amizade e prazerosas conversas ao cursar disciplinas e realizar experimentos. À Agnes agradeço não apenas a amizade, mas também as contribuições e ajuda prática, sempre nos “mínimos detalhes”. Também aos colegas de Laboratório de Tecnologia Enzimática Vinícius, Lionete, Margarita e Laiane agradeço a disposição em contribuir

para a realização desse trabalho. Aos colegas do Departamento de Engenharia Química: Geisa, Ananda, Vanessa, William, Renata, Jéssica, Margarita, Mayerlenis, Rafael, Gabriel, Gilson, Helberth, Vitor e Murilo. Aos técnicos Tiago, Alyne e Thaís.

Ao Matheus, Allan e Augusto pela amizade, apoio em todas as horas e em especial por participarem da “busca da macaúba perdida”. Aos amigos Gustavo e Melissa pela companhia e boas risadas. Aos amigos de São Carlos, Mogi das Cruzes e São Paulo pelo apoio e palavras de incentivo.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química que contribuíram para a minha formação; em especial ao Prof. Dr. Roberto C. Giordano pela disposição em contribuir para este trabalho.

A UFSCar e aos órgãos de fomento CAPES e CNPq, pelo financiamento da bolsa de estudos, materiais e equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

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

"Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,
a eletricidade e a energia atômica: a vontade."

– Albert Einstein

RESUMO

O biodiesel representa uma alternativa sustentável para suprir a crescente demanda energética mundial. A síntese desse combustível vem utilizando principalmente a reação de transesterificação (alcoólise) de óleos e gorduras, que resulta em elevados rendimentos, em curto período reacional. Uma rota alternativa que vem sendo estudada é a hidroesterificação, que consiste na hidrólise do óleo vegetal (triglicerídeo), purificação dos ácidos graxos formados (AGL), seguida pela esterificação destes com etanol, resultando em produtos e coprodutos de alta qualidade. Este trabalho teve como objetivo estudar a síntese de biodiesel pelas rotas de transesterificação e hidroesterificação do óleo de soja e de castanha de macaúba com etanol, catalisadas por lipases de sementes dormentes de mamona (ESM) em meio isento de solventes. Foi estudado e definido como melhor protocolo para preparação do ESM a incubação em acetona 4°C por 4h sem lavagens posteriores com acetona. O ESM apresentou uma elevada atividade catalítica do extrato enzimático em reações de hidrólise em meio ácido (pH 4,5). Entretanto, não houve atividade em reações de transesterificação e esterificação, devido possivelmente à sua baixa estabilidade na presença de solventes orgânicos e álcoois. ESM mostrou baixa estabilidade em temperaturas muito acima da ambiente. Verificou-se a completa conversão nas hidrólises do óleo de soja após 6 h de reação, na ausência de sais, 37 °C, 1.000 rpm, 4% m/v de ESM. Nestas mesmas condições, atingiu-se 90% para o óleo de macaúba. Foi a seguir realizado estudo cinético da hidrólise do óleo de soja catalisado por ESM, estudando-se influência da concentração de catalisador e de substrato nas velocidades iniciais; e da temperatura ao longo da reação. Usando-se 1% m/V de ESM, a máxima velocidade inicial de reação foi obtida para a concentração de óleo de 147 mM (128,2 g/L de óleo), observando-se redução da velocidade para concentrações mais altas de óleo, indicando a queda na atividade da enzima nessas condições. O modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição incompetitiva pelo substrato conseguiu representar bem o comportamento dos dados experimentais ($R^2=0,96$). Os valores estimados para os parâmetros cinéticos foram: $V_{Máx}$ ($2,85 \pm 0,75$ mM/min), K_M ($182,95 \pm 65,80$ mM) e K_I ($217,23 \pm 95,34$ mM). Esses resultados revelam aplicação promissora de ESM como biocatalisador robusto na hidrólise de óleos visando à produção de concentrado de AGL. Uma vez que lipase de ESM não catalisa reação de

esterificação, os ácidos graxos livres produzidos na hidrólise foram purificados e empregados na síntese de ésteres etílicos em meio isento de solventes, utilizando-se como biocatalisador lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) imobilizada covalentemente em resina epóxi. A máxima conversão em ésteres, de 85%, foi obtida após 2 horas de reação empregando AGL do óleo de soja; e conversão de 71% dos AGL de macaúba após 6 horas de reação. A baixa estabilidade térmica da lipase de mamona motivou a realização de estudo preliminar de purificação da enzima presente no ESM, visando posterior imobilização da enzima. A imobilização de enzimas permite sua reutilização e aumento de estabilidade, dependendo da estratégia utilizada. Os ensaios de extração da enzima em diferentes pHs mostraram máxima seletividade em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,0 e máximo rendimento em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. Foram realizados testes de adsorção física em suportes hidrofóbicos e iônicos. Os resultados preliminares obtidos mostraram que a lipase de mamona foi altamente adsorvida em suportes ativados com grupos amino (83%), sendo possível verificar a atividade hidrolítica tanto nos derivados como nos sobrenadantes contendo a lipase desorvida.

Palavras-chave: Transesterificação, Hidroesterificação, Óleos vegetais, Lipase vegetal, Mamona.

ABSTRACT

Biodiesel, a fuel produced from renewable sources, is a sustainable substitute to meet the growing global energy demand. The transesterification (alcoholysis) of oils and fats is the route most used in biodiesel synthesis, resulting in high yields in a reduced reaction period. An alternative route for the synthesis of biodiesel is the hydroesterification process that consists of the hydrolysis of vegetable oil (triglyceride), purification of the formed free fatty acids (FFA), followed by esterification with ethanol, resulting in high quality products and co-products. This dissertation aimed to study the synthesis of biodiesel by transesterification and hydroesterification of soybean and macaw palm kern oils with ethanol, catalyzed by lipase of dormant seeds of castor bean crude extract (CBCE) in solvent-free media. It was studied and defined as the best protocol for preparing CBCE the incubation in acetone 4 °C for 4 hours with no subsequent washings with acetone. The CBCE showed a high catalytic activity of the enzyme extract in hydrolysis reactions in acid medium (pH 4.5). However, no activities were observed in esterification and transesterification reactions, possibly due to the low stability in the presence of organic solvents and alcohols. The CBCE showed low stability at temperatures higher than ambient temperatures. The complete conversion of soybean oil in the hydrolysis was reached after 6 h of reaction, in the absence of salt, 37 °C, 1,000 rpm, 4% w/v CBCE. Under the same conditions, it reached up to 90% conversion of macaw palm oil. Subsequently, the kinetic study of soybean oil hydrolysis catalyzed by CBCE was carried, studying the influence of the catalyst and substrate concentration on the initial rates of the reaction; and temperature influence throughout the reaction. Using 1% w/v CBCE, the highest initial reaction rate was obtained for the oil concentration of 147 mM (128.2 g/L oil). For higher substrate concentrations, a decrease of reaction speed was observed, indicating a decrease in enzyme activity under these conditions. The kinetic model of Michaelis-Menten with the substrate inhibition adequately fitted the experimental data ($R^2 = 0.96$). The estimated values for the kinetic parameters were: V_{max} (2.85 ± 0.75 mM / min), K_M (182.95 ± 65.80 mM) and K_I (217.23 ± 95.34 mM). These results reveal a promising application of CBCE as robust biocatalyst in the hydrolysis of oils for the production of concentrated FFA. Since CBCE does not catalyze esterification reaction, the FFA obtained in the hydrolysis were purified and used for the synthesis of ethyl esters in

solvent-free media, using the lipase of *Thermomyces lanuginosus* (TLL) covalently immobilized in epoxy resin as biocatalyst. The maximum ester conversion reached (85%) was obtained after 2 hours of reaction when soybean FFA was used as substrate; and 71% for macaw palm FFA after 6 hours of reaction. The low thermal stability of the CBCE motivated the castor bean lipase purification, aiming subsequent enzyme immobilization. Immobilization allows reuse of enzymes and an increase in its stability, depending on the strategy used. The lipase extraction assays at different pHs showed a maximum selectivity for the 50 mM sodium citrate buffer, pH 4.0 and a maximum yield for the 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. Adsorption experiments on hydrophobic and ionic supports were performed. Preliminary results showed that the castor bean lipase was strongly adsorbed on supports activated with amino groups (83%), where hydrolytic activity was observed both in derivatives as well in the supernatants containing the desorbed lipase.

Keywords: Transesterification, Hydroesterification, Vegetable oils, Plant lipase, Castor bean.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1	Fontes de matéria-prima usadas na produção de biodiesel no Brasil. .23
Figura 2.2	(A) Palmeira Macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i> M.), (B) cacho de coco de macaúba, (C) cocos de macaúba.25
Figura 2.3	Reação de transesterificação para a síntese de biodiesel.29
Figura 2.4	Reação de hidroesterificação para a síntese de biodiesel.32
Figura 2.5	Efeito do pH sobre a atividade lipolítica do extrato sólido de mamona.36
Figura 2.6	Efeito da temperatura sobre a atividade da lipase de mamona.37
Figura 2.7	Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática.39
Figura 2.8	Efeito da temperatura de incubação sobre a formação do produto..... 40
Figura 2.9	Efeito do pH sobre a velocidade inicial de uma reação enzimática.....41
Figura 2.10	Efeito da concentração de enzima sobre as velocidades iniciais de formação de produto.43
Figura 2.11	Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial da reação enzimática.45
Figura 2.12	Esquema do processo de diálise.52
Figura 4.1	Influência do tempo de incubação em acetona sobre a atividade lipolítica de extrato bruto de mamona.78
Figura 4.2	Influência do número de lavagens a atividade hidrolítica de extrato sólido de mamona.80
Figura 4.3	Espectros de varredura das acetonas de lavagem do extrato sólido de mamona e solução de ácido oleico 100 mM.81
Figura 4.4	Estabilidade térmica do extrato sólido de mamona incubado em tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,5 a 30, 40 e 50 °C.....84
Figura 4.5	Estabilidade do extrato sólido de mamona incubado em etanol-óleo de soja (relação molar de 1:3) a 25 °C.....85
Figura 4.6	Hidrólise do óleo de soja catalisado pelo extrato sólido de lipase de mamona em água.87
Figura 4.7	Influência da concentração de catalisador sobre as velocidades iniciais da hidrólise do (A) óleo de soja (B) óleo de macaúba.....89
Figura 4.8	Efeito da concentração de catalisador sobre a cinética de hidrólise do óleo de soja em (A) água destilada, (B) tampão acetato de sódio 100

	mM, pH 4,5; óleo de macaúba em (C) água destilada e (D) tampão acetato 100 mM, pH 4,5.	92
Figura 4.9	Efeito do meio reacional sobre a cinética de hidrólise a 37 °C do óleo de soja água destilada e tampão acetato 100 mM, pH 4,5 de soja utilizando (A) 2% m/v ESM, (B) 4% m/v ESM, (C) 6% m/v ESM; óleo de macaúba em água destilada e tampão acetato 100 mM, pH 4,5 utilizando (C) 2% m/v ESM, (D) 4% m/v ESM, (E) 6% m/v ESM.	94
Figura 4.10	Comportamento do pH do meio reacional ao longo da reação de hidrólise do óleo de soja a 37 °C, 2% m/v de ESM.	95
Figura 4.11	Comparativo do perfil hidrólise do óleo de soja realizada em solução de NaCl 100 mM, pH 4,5 (ajustado com HCl 3M), tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 e água destilada pH 4,5 (ajustado com HCl), a 37 °C catalisado pelo ESM 4% m/v.	97
Figura 4.12	Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato aos dados experimentais de atividade da lipase de mamona presente no extrato sólido de mamona em função da concentração do óleo de soja.	98
Figura 4.13	Rendimento de transesterificação de óleo de soja a (A) 37 °C e (B) 50 °C catalisada pelo extrato sólido de mamona.	100
Figura 4.14	Conversões obtidas na esterificação de AGL e etanol catalisada pela LTL imobilizada após 8h de reação.	103
Figura 4.15	Perfil cinético da esterificação de (A) AGL de soja (B) AGL de macaúba com etanol catalisada pela LTL imobilizada em reator.	104
Figura 4.16	Atividade residual da LTL imobilizada ao longo da reação de esterificação dos AGL de soja e macaúba com etanol em meio isento de solvente.	106
Figura 4.17	Extração da lipase de mamona em diferentes tampões após 12 horas de incubação a 25 °C. Suspensão contendo 2,5g de ESM e 25 mL de tampão.	108
Figura 4.18	Elektroforese SDS-Page em condições desnaturantes da lipase de mamona em tampões variados após 12 horas de incubação, em gel de bis-acrilamida 12% m/v.	111

Figura 4.19 Eletrofese SDS-PAGE em condições desnaturantes da adsorção de lipase de mamona em (A) SMMp octil, (B) SMMp amino e (C) resina Streamline SP XL.....	116
Figura 4.20 Eletrofese SDS-PAGE em condições desnaturantes da adsorção de lipase de mamona em (A) SMMp amino 0,1 e (B) SMMp amino 1,0 mmol de ATPES/g de suporte.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Composição do fruto da macaúba (polpa e castanha) (%).	26
Tabela 2.2	Ácidos graxos presentes no fruto da macaúba.	27
Tabela 2.3	Ácidos graxos presentes no óleo de soja (%).	28
Tabela 2.4	Catalisadores empregados nas reações de transesterificação.	30
Tabela 2.5	Operações unitárias aplicadas na separação e purificação de bioprodutos e suas respectivas propriedades físico-químicas exploradas.....	51
Tabela 2.6	Grupos funcionais de trocadores iônicos.	54
Tabela 3.1	Condições utilizadas na quantificação dos ésteres de etila por cromatografia gasosa.....	63
Tabela 3.2	Tampões empregados para extração de lipase de mamona.	71
Tabela 3.3	Condições empregadas na dessorção da lipase de mamona dos suportes.	73
Tabela 4.1	Comparativo da atividade de extrato sólido de lipase de mamona frente a diferentes substratos.	79
Tabela 4.2	Atividades hidrolíticas do extrato sólido de mamona determinadas na hidrólise de tributirina, e do azeite de oliva e óleo de macaúba emulsificados com goma arábica.	82
Tabela 4.3	Parâmetros cinéticos do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato estimados para a lipase do ESM a 37 °C e pH 4,5.....	99
Tabela 4.4	Concentração de proteínas e atividades das soluções de extração de lipase de mamona.	110
Tabela 4.5	Adsorção de lipase de mamona em suportes hidrofóbicos e iônicos. A	112
Tabela 4.6	Dessorção de lipase de mamona adsorvida em suportes hidrofóbico e iônico.....	114
Tabela 4.7	Adsorção de lipase de mamona em suportes SMMp amino 0,1 e 1,0 mmol/g de suporte. Adsorções realizadas sob agitação constante a 25 °C por 12 horas.	117
Tabela 4.8	Dessorção de lipase de mamona adsorvida em suporte SMMp amino 0,1 e 1,0 em solução NaCl 5M. Os suportes foram incubados sob agitação constante a 25 °C por 1 hora.....	118

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AGL	Ácidos Graxos Livres
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
APTES	3-Aminopropiltrietoxissilano
A _{REC}	Atividade recuperada
BSA	Albumina sérica bovina
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
EDAC	N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodi-imida
ESM	Extrato sólido de mamona
K _i	Constante de inibição
K _M	Constante de Michaelis-Menten
LCR	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
LCR	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
LTL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
MM	Modelo cinético de Michaelis-Menten
P _{Ads}	Proteína adsorvida
p-NPB	Butirato de p-nitrofenila
PSA	Persulfato de amônio
R _{Ads}	Rendimento de adsorção
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio (sigla em inglês)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SMMp	Micro-partículas magnéticas de sílica, <i>silica magnectic microparticles</i>
TEMED	Tetra metil etilenodiamona
V _{Máx}	Velocidade máxima

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.2	Biodiesel.....	22
2.3	Matérias-primas para a produção de biodiesel.....	23
2.3.1	Macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i> M.)	24
2.3.2	Soja (<i>Glycine max</i> L. Merrill).....	27
2.4	Síntese de biodiesel	28
2.4.1	Reação de transesterificação (alcoólise)	29
2.4.2	Reação de hidroesterificação	31
2.5	Enzimas como biocatalisadores	33
2.5.1	Lipases	34
2.5.2	Lipase de Mamona (<i>Ricinus communis</i> L.).....	35
2.5.3	Ricina.....	37
2.6	Cinética das reações enzimáticas.....	38
2.6.1	Efeito da temperatura	38
2.6.2	Efeito do pH.....	40
2.6.3	Efeito da força iônica	42
2.6.4	Efeito da concentração da enzima.....	42
2.6.5	Efeito da concentração de substrato	43
2.6.6	Efeitos de inibição.....	46
2.7	Purificação de enzimas	50
2.7.1	Diálise.....	52
2.7.2	Adsorção por troca iônica	53
2.7.3	Adsorção hidrofóbica	54
2.8	Suportes magnéticos	56
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3.2	Material	58
3.2.1	Sementes e óleos vegetais.....	58
3.2.2	Reagentes consumíveis	58

3.3	Métodos analíticos	59
3.3.1	Determinação da concentração de proteína.....	59
3.3.2	Hidrólise do azeite de oliva	59
3.3.3	Hidrólise da tributirina	60
3.3.4	Hidrólise do butirato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> -NPB)	61
3.3.5	Atividade de esterificação (síntese do butirato de butila e oleato de butila) ..	62
3.3.6	Quantificação dos ésteres de etila (biodiesel) formados por cromatografia gasosa	62
3.4	Procedimento experimental.....	63
3.4.1	Preparo do extrato sólido de mamona.....	63
3.4.2	Avaliação espectrofotométrica da acetona de lavagem.....	64
3.4.3	Estabilidade térmica do extrato sólido de mamona	64
3.4.4	Estabilidade do extrato sólido de mamona em mistura etanol-óleo.....	64
3.4.5	Estudo cinético da hidrólise	65
3.4.6	Síntese de ésteres etílicos (biodiesel) via transesterificação.....	67
3.4.7	Síntese de biodiesel via hidroesterificação	68
3.4.8	Síntese de suportes magnéticos (SMMp).....	69
3.4.9	Ativação das SMMps com grupos octil	70
3.4.10	Ativação das SMMps com grupos amino.....	70
3.4.11	Extração de lipase de mamona em fase aquosa	71
3.4.12	Diálise.....	71
3.4.13	Adsorção em suportes porosos	72
3.4.14	Dessorção do suporte.....	72
3.4.15	Eletroforese SDS-PAGE	73
3.4.16	Cálculo do rendimento de adsorção em termos de proteína extraída em solução	74
3.4.17	Cálculo do rendimento de adsorção em termos de atividade da lipase de mamona.....	75
3.4.18	Cálculo da atividade recuperada da lipase de mamona	75
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.2	Produção de extrato sólido de mamona.....	77
4.3	Determinação da atividade lipolítica do extrato sólido de mamona	81
4.4	Atividade sintética do extrato sólido de mamona	82

4.5	Estabilidade térmica do extrato sólido de mamona	83
4.6	Estabilidade do extrato sólido de mamona em mistura etanol-óleo	85
4.7	Produção de concentrados de ácidos graxos livres a partir de óleos vegetais catalisada por lipase de mamona: Otimização e estudos cinéticos	86
4.7.1	Efeito da temperatura	87
4.7.2	Efeito da concentração de catalisador	88
4.7.3	Efeito da concentração de substrato	97
4.8	Síntese de biodiesel via transesterificação.....	99
4.9	Síntese de biodiesel via hidroesterificação	101
4.9.1	Reação de hidrólise utilizando o extrato sólido de mamona.....	101
4.9.2	Reação de esterificação utilizando lipase imobilizadas	102
4.10	Extração em fase aquosa e purificação da lipase de mamona	106
4.10.1	Extração de lipase de mamona em diferentes valores de pH.....	107
4.10.2	Adsorção da lipase de mamona em suportes iônicos e hidrofóbicos	111
5	CONCLUSÕES	121
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	125
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
ANEXO A	140

1. INTRODUÇÃO

O uso de combustíveis fósseis tem sido tema de extenso debate ao longo das últimas décadas. O seu uso extensivo e contínuo resulta em danos diretos ao meio ambiente – muitas vezes irreparáveis – como mudanças climáticas, deterioração da camada de ozônio, aumento do efeito estufa, chuva ácida, etc. (ATABANI et al., 2012). Felizmente, a preocupação com tais efeitos tem estimulado o aprimoramento e investigação de fontes de energia renováveis (BERGMANN et al., 2013; BORGES; DÍAZ, 2012). Diante da presente situação, é provável que combustíveis renováveis tenham presença marcante na economia mundial nos próximos anos. Em vias gerais, um biocombustível deve ser seguro, extraído de fonte renovável, biodegradável e economicamente viável (NASIR et al., 2013; SILITONGA et al., 2013). Neste aspecto o biodiesel desponta como um biocombustível alternativo ao óleo diesel derivado de petróleo tradicionalmente usado em motores de veículos uma vez que suas propriedades físico-químicas são semelhantes às do diesel de petróleo, o que possibilita o seu uso de forma direta ou misturado ao diesel de petróleo, em motores disponíveis no mercado sem a necessidade de adaptação destes motores (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

Dentre as tecnologias existentes, a transesterificação é um dos métodos mais utilizados para a produção de biodiesel, inclusive em escala industrial, podendo atingir elevados valores de conversão em um reduzido intervalo de tempo (ATABANI et al., 2012; LEUNG et al., 2010).

O catalisador empregado na reação de transesterificação pode ser tanto ácido como alcalino. Apesar dos catalisadores alcalinos apresentarem custo inferior e resultarem em elevadas conversões, é praticamente impossível evitar que a reação de saponificação ocorra paralelamente. Catalisadores ácidos convertem matérias-primas com teores mais elevados de ácidos graxos em ésteres alquílicos (biodiesel) de maneira eficaz. Contudo, exigem um maior tempo de reação e razões molares óleo:álcool mais elevadas. Ambos catalisadores apresentam um elevado consumo de energia e água nas etapas de tratamento pós-reação (DORS et al., 2012; LEUNG et al., 2010; RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008).

Uma rota alternativa para a produção de biodiesel é a de hidroesterificação. Esta ocorre em duas etapas sequenciais: primeiramente todo material é hidrolisado a ácidos graxos e glicerol; sendo os ácidos graxos esterificados posteriormente a alquil ésteres de ácidos graxos (biodiesel) (DE SOUSA et al., 2010; DIAZ et al., 2013). A hidroesterificação tem como vantagem o uso de matérias-primas mais baratas contendo elevada acidez e umidade, além da obtenção de um glicerol mais puro que pode ser utilizado inclusive na indústria farmacêutica (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010; SOARES et al., 2013).

Recentemente, a catálise enzimática tem sido apontada como alternativa aos tradicionais processos de catálise química existentes. Apesar dos desafios envolvidos em seu uso industrial, processos enzimáticos consomem menos energia, produzem menos resíduos e coprodutos, além de operarem em condições brandas de temperatura e pressão (DORS et al., 2012). Lipases são especialmente interessantes para a produção de biodiesel, uma vez que sua função natural é hidrolisar grupos ésteres presentes em moléculas de triacilglicerol de forma parcial ou total. Estas enzimas são capazes de catalisar reações como esterificação, transesterificação e interesterificação de óleos e gorduras em meios aquo-restritos (ADLERCREUTZ, 2013; ATABANI et al., 2012; CASTRO et al., 2004). Além de microrganismos, lipases podem ser obtidas de espécies oleaginosas, como mamona, pinhão manso, girassol e canola (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010; MOUSSAVOU MOUNGUENGUI et al., 2013).

A lipase de mamona (*Ricinus communis* L.) se destaca entre as lipases vegetais devido à sua elevada atividade catalítica em pH ácido e baixo custo de obtenção. As sementes de mamona possuem enzimas de atividade lipolítica em sementes não germinadas (dormentes) (EASTMOND, 2004), o que possibilita a aplicação do extrato das sementes processadas como biocatalisador em algumas reações químicas sem a necessidade de extensivos procedimentos de purificação.

Embora seja possível obter um catalisador eficiente e de baixo custo, a presença da proteína ricina representa um obstáculo para aplicação de lipase de mamona, principalmente, em processos voltados para a síntese de químicos finos e compostos farmacêuticos. Outro empecilho é a baixa concentração de lipase por grama de extrato sólido, que implica no consumo de grandes quantidades de catalisador por reação realizada. Neste contexto, a purificação e concentração da

lipase de mamona se mostra uma maneira de contornar ambos problemas e potencializar sua aplicação de maneira generalizada e sem riscos.

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma das principais culturas do Brasil, sendo utilizada na alimentação (humana e animal) e em diversos setores industriais. Apesar da baixa concentração de lipídios (18% m/m, base úmida), a elevada produtividade deste grão possibilita que a soja seja principal matéria-prima usada na síntese de biodiesel (ANP, 2015). Óleos extraídos de palmeiras como a palma, o dendê e o babaçu também são exploradas como fonte de matéria-prima em usinas de biodiesel em diversas regiões brasileiras. A macaubeira (*Acrocomia aculeata* M.) é especialmente interessante, podendo seu óleo de caráter ácido ser extraído tanto da polpa como da castanha de seu fruto (POETSCH et al., 2012; SILVA et al., 2014).

Embora estudos tenham sido reportados para a produção de ésteres alquílicos (biodiesel) a partir de diferentes matérias-primas graxas, incluindo óleos de soja e de castanha de macaúba (AGUIEIRAS et al., 2014; AVELAR et al., 2013; BRESSANI et al., 2014; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010), a aplicação dos biocatalisadores preparados neste trabalho como extrato enzimático bruto de sementes dormentes de mamona e lipase microbiana de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) imobilizada ainda não foram reportados pela literatura especializada.

Considerando a importância do desenvolvimento e exploração de novos catalisadores e matérias-primas visando a produção de biodiesel, o presente trabalho teve como principal objetivo estudar comparativamente a síntese de biodiesel através das rotas de transesterificação e hidroesterificação do óleo de soja e de macaúba, catalisada pela lipase de mamona. Paralelamente, um estudo detalhado da lipase de mamona foi realizado, visando a sua purificação e concentração. Espera-se que este trabalho contribua para os estudos de obtenção de biodiesel a partir de óleos tanto comestíveis como não comestíveis como fonte lipídica, introduzindo novos conhecimentos e informações.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2 Biodiesel

O biodiesel é um combustível renovável produzido a partir de diversas matérias-primas, comestíveis ou não, como óleos vegetais, gordura animal, óleos residuais (ex. óleo de fritura) e de microalgas, sendo o processo de produção adaptado de acordo com o material utilizado (LEIVA-CANDIA et al., 2014). Suas propriedades físico-químicas são semelhantes às do diesel de petróleo, o que possibilita o uso integral ou misturado ao diesel comercial nos motores existentes no mercado sem grandes modificações (KNOTHE et al., 2006). Em comparação ao óleo diesel de petróleo, o biodiesel apresenta diversas vantagens como menores emissões de gases de exaustão, como dióxido (CO_2) e monóxido (CO) de carbono; não emite compostos de enxofre e compostos aromáticos; possui alto ponto de fulgor, excelente lubricidade e é biodegradável (DEMIRBAS, 2007; KNOTHE et al., 2006).

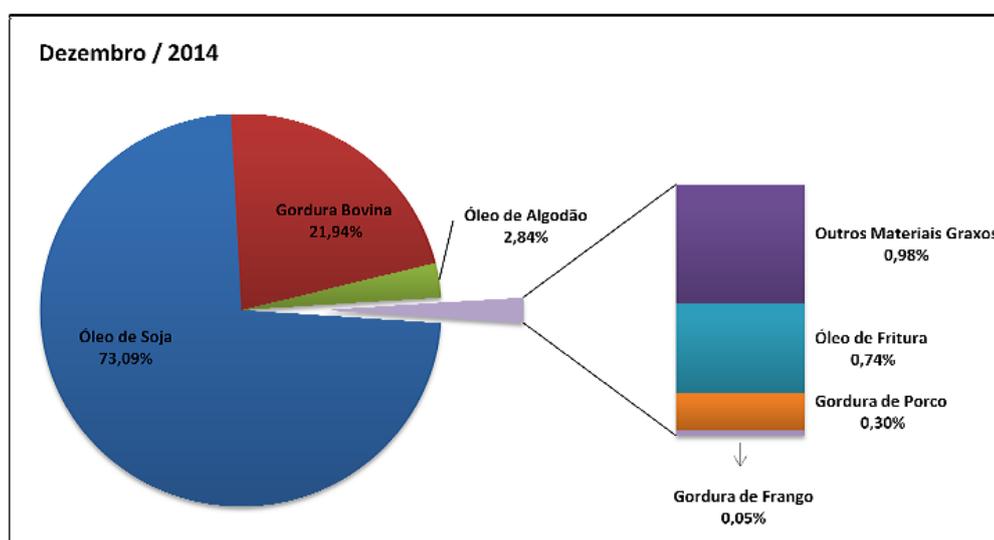
Os altos custos da matéria-prima são um dos principais desafios para a produção do biodiesel, podendo representar 70-80% do custo do produto final (ATABANI et al., 2012; RIBEIRO et al., 2011; YAN et al., 2014). Além dos fatores econômicos, a escolha da matéria-prima usada para produzir o biodiesel deve levar em conta os triglicerídeos presentes no material de partida para a síntese. As propriedades físico-químicas do biodiesel como viscosidade, ponto de névoa, ponto de fulgor e estabilidade à oxidação estão diretamente relacionadas com a matéria-prima escolhida. A presença de ácidos graxos insaturados resulta em um biodiesel com menor viscosidade, maior ponto de névoa, maior ponto de fluidez e menor temperatura de combustão. Por outro lado, longas cadeias saturadas geram um biodiesel com maior número de cetano e ponto de fulgor (GHALY et al., 2010; KNOTHE et al., 2006; RAMOS et al., 2009).

RAMOS et al. (2009) listaram diversos fatores que influenciam a estabilidade do biodiesel, tais como exposição ao ar, traços de metais, presença de peróxidos, luz e a composição em ácidos graxos. De fato, quanto maior a ocorrência de insaturações, mais propenso à oxidação será o produto final (biodiesel) (KNOTHE et al., 2006; RAMOS et al., 2009).

2.3 Matérias-primas para a produção de biodiesel

As mais variadas matérias-primas podem ser empregadas para a produção de biodiesel. A Figura 2.1 apresenta algumas matérias-primas usadas para a produção de biodiesel no Brasil. É possível observar a predominância do óleo de soja como matéria-prima, seguido de gordura bovina e óleo de algodão. Nota-se também o uso de óleo de fritura residual como matéria-prima, um resíduo produzido abundantemente e de baixo custo com potencial para a produção de biodiesel.

Figura 2.1 – Fontes de matéria-prima usadas na produção de biodiesel no Brasil.



Fonte: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP. Boletim mensal do biodiesel, Janeiro de 2015.

A sustentabilidade do processo está intimamente relacionada à matéria-prima escolhida para a produção do biodiesel. Esta pode ser advinda de diferentes fontes: animal (gordura animal), óleos residuais (óleo de fritura), microbiana (a partir de microalgas) e vegetal (oleaginosas). No caso de fonte vegetal, em geral são utilizadas culturas de oleaginosas de maior produtividade e que sejam adaptadas ao clima onde são cultivadas. Por exemplo, óleo de girassol e canola são predominantemente utilizados para a produção de biodiesel na Europa, óleo de soja nos Estados Unidos da América e América Latina e óleo de palma na Ásia (CARVALHO et al., 2013).

Devido à matéria-prima representar 70-80% do custo total do biodiesel, GUI; LEE; BHATIA (2008) consideram o rendimento em termos de ésteres alquílicos

o principal fator na escolha de matéria-prima. Culturas de maior produtividade compensam os custos envolvidos no cultivo e na produção. Todavia, alguns cultivos requerem elevados investimentos desde o plantio até a colheita, sendo estes custos embutidos no preço final da matéria-prima. O uso de culturas que também são utilizadas como alimento é alvo de grande controvérsia, resultando em acalorado debate tanto no meio acadêmico como no setor industrial. Desta forma, tem-se investigado o uso de culturas oleaginosas não utilizadas como alimento (CARVALHO et al., 2013; LEIVA-CANDIA et al., 2014). Nesse contexto, a palmeira macaúba surge como matéria-prima interessante para a produção de biodiesel no Brasil.

2.3.1 Macaúba (*Acrocomia aculeata* M.)

O Brasil, com toda sua diversidade florestal, possui em sua flora uma ampla variedade de plantas com potencial para a produção de biodiesel. Dentre essas, palmeiras (*Arecaceae*) são consideradas as mais promissoras devido às suas características como produtividade, adaptação em diferentes tipos de solos e possibilidade de cultivo simultâneo a outras culturas (MOURA et al., 2009). Algumas destas, como a palma, o dendê e o babaçu, já são exploradas como fonte de matéria-prima em usinas de biodiesel em diversas regiões brasileiras. Dentre as palmeiras ainda pouco exploradas para a produção de biodiesel que apresentam características apreciáveis destaca-se a macaúba.

A macaúba (*Acrocomia aculeata* M.) é uma palmeira típica de áreas tropicais, podendo ser encontrada em uma faixa que abrange desde o sul do México à Argentina (Figura 2.2). No Brasil é encontrada nos estados do Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e em partes do interior de São Paulo, sendo mais abundante em áreas do cerrado (ABREU et al., 2011; WANDECK, 1985). Esta pode apresentar espinhos em seu tronco dependendo da espécie, variando entre 8 e 16 metros de altura e produzindo frutos de 25 – 60 mm de diâmetro (ABREU et al., 2011).

Figura 2.2 – (A) Palmeira Macaúba (*Acrocomia aculeata* M.), (B) cacho de coco de macaúba, (C) cocos de macaúba.



Fonte: Acervo pessoal

A macaubeira apresenta alta produtividade – a segunda dentre as palmeiras – ficando atrás apenas do dendezeiro (*Elaeis guineenses*) (POETSCH et al., 2012; SILVA et al., 2014). ABREU et al. (2011) relatam produtividade acima de 25 t/ha gerando 4.000 kg de óleo, 13.000 kg de carvão e torta proteica, mesmo não sendo cultivada de forma extensiva. Uma vez processado, o coco de macaúba gera diversos produtos. Da polpa é extraído óleo rico em ácido oleico e da castanha óleo com elevado teor de ácido láurico. Tortas ricas em proteínas e fibras são obtidas da castanha e polpa processadas; carvão ou briquete da parte dura do endocarpo (PIRES et al., 2013).

Todavia, um dos grandes empecilhos da exploração em larga escala do óleo de macaúba se deve ao fato da maioria dos cultivos serem extrativistas: os

processos de colheita e extração são feitos de forma rudimentar, refletindo diretamente na produtividade (MOTTA et al., 2002). Em geral, os frutos são colhidos após a queda natural do cacho; extraindo-se o óleo por prensagem. Geralmente, o armazenamento é inadequado, resultando na oxidação do material graxo e elevação da acidez do óleo (MOURA et al., 2009; PIRES et al., 2013). Uma solução viável para contornar essas dificuldades foi sugerida por LOPES et al. (2013), sendo o incentivo à plantação e a modernização do processo de extração do óleo, a fim de que os produtores sejam capazes de fornecer óleo com qualidade e em quantidade de modo a atender a demanda do mercado.

A literatura descreve variadas composições para o coco de macaúba, sendo as condições e local de cultivo o principal motivo para tal variação (CICONINI et al., 2013). A Tabela 2.1 apresenta a composição do fruto da macaúba (polpa e castanha). É possível notar que o fruto apresenta um elevado teor de lipídeos tanto na polpa como na castanha. O óleo extraído da polpa pode ser utilizado para a produção de biodiesel, pois possui alto teor de ácidos graxos insaturados. Por sua vez, o óleo extraído da amêndoa tem aplicação na indústria cosmética devido ao elevado teor de ácido láurico em sua composição.

Tabela 2.1 – Composição do fruto da macaúba (polpa e castanha) (%).

	Polpa	Castanha
Umidade	5,98	4,97
Proteínas	6,72	28,61
Lipídeos	28,94	46,06
Carboidratos	36,22	5,81
Fibra alimentar	20,26	12,49
Cinzas	2,17	2,08

Fonte: COIMBRA; JORGE, 2011b

Conforme apresentado na Tabela 2.2, o óleo de polpa de macaúba é rico em ácido oleico e palmítico: ácidos graxos de cadeia longa monoinsaturada e saturada, respectivamente. GUI et al. (2008) salientam que matérias-primas ricas em ácido oleico são as mais adequadas para a produção de biodiesel, uma vez que o éster resultante tem características mais próximas às do diesel de petróleo. Desta

forma, o óleo de polpa de macaúba é uma matéria-prima promissora para a produção de biodiesel de qualidade. O óleo de polpa possui uma acidez superior ao extraído da castanha, o que reduz significativamente o seu valor comercial, reduzindo os custos do produto final. Essas características indicam o grande potencial do uso do óleo do coco da macaúba como matéria-prima para a produção de biodiesel.

Tabela 2.2 – Ácidos graxos presentes no fruto da macaúba.

Ácidos Graxos	Polpa (%)	Castanha (%)
Caprílico (C8:0)	---	3,67
Cáprico (C10:0)	---	2,79
Láurico (C12:0)	0,39	32,58
Mirístico (C14:0)	0,38	9,21
Palmítico (C16:0)	24,6	8,25
Palmitoleico (C16:1)	4,27	---
Esteárico (C18:0)	1,08	2,24
Oleico (C18:1)	52,57	36,27
Linoleico (C18:2)	2,26	3,82
Saturados	27,1	59,92
Monosaturados	58,84	---
Polisaturados	16,06	---

Fonte: COIMBRA; JORGE, 2011a;2011b

2.3.2 Soja (*Glycine max* L. Merrill)

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é um dos produtos mais comercializados no mundo; podendo ser utilizado de variadas formas, desde a alimentação (humana e animal) até a indústria farmacêutica e siderúrgica (SBARDELOTTO; LEANDRO, 2008). O processamento dos grãos gera o óleo e farelo, podendo ser utilizados como matérias-primas em diversos setores industriais.

A soja é uma cultura temporária, com a colheita em aproximadamente 3 meses após o plantio. No Brasil, a área cultivada de soja tem aumentado a cada ano, sendo previsto para 2015 que 31,66 milhões de hectares sejam cultivados (CONAB, 2015). Segundo a CONAB, a safra 2014/2015 está estimada em 95,9

milhões de toneladas de grãos de soja (CONAB, 2015). A maior parte dos grãos produzidos tem como destino a exportação, sendo também utilizado para a produção de óleo para consumo interno e ração animal (Ministério da Agricultura, 2015).

O grão de soja possui 19% de sua composição mássica em lipídeos (base úmida) (EMBRAPA, 2015), sendo o óleo rico em ácidos graxos de cadeia longa, principalmente ácido linoleico e oleico (Tabela 2.3). Embora o teor de lipídeos presente no grão seja baixo quando comparado às outras oleaginosas, a soja apresenta uma elevada produção e disponibilidade; sendo o óleo de soja a principal matéria-prima utilizada para a produção de biodiesel no Brasil (ANP, 2015).

Tabela 2.3 – Ácidos graxos presentes no óleo de soja (%).

Ácido graxo	Teor (%)
Palmitico (C16:0)	10,7
Esteárico (C18:0)	3,0
Oleico (C18:1)	24,0
Linoleico (C18:2)	56,7
Linolenico (C18:3)	5,5
Araquídico (C20:0)	0,1
Saturados	13,8
Insaturados	86,2

Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2013.

2.4 Síntese de biodiesel

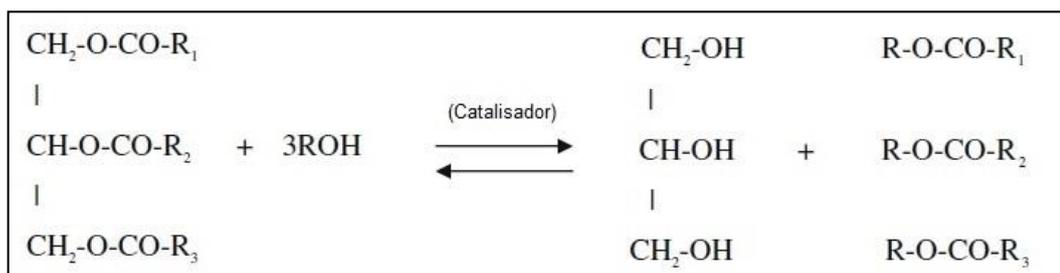
O uso de óleo vegetal como combustível é relatado desde o início do século XX. KNOTHE et al. (2006) relataram o uso de óleo de amendoim como combustível num motor a diesel durante a exposição de Paris. Porém, o uso direto de óleos obtidos de gordura animal e extraídos de plantas não é recomendável, uma vez que a alta viscosidade e a combustão incompleta resultam em problemas operacionais no motor, como formação de goma de oxidação, polimerização e depósitos de carbono no interior do motor e partes adjacentes (RANGANATHAN et al., 2008).

A fim de ser usado como combustível, o material graxo necessita ser modificado quimicamente, otimizando suas propriedades físico-químicas e deixando-o mais semelhante ao diesel de petróleo. O processamento do material graxo pode ser feito aplicando diferentes tecnologias. Dentre os métodos existentes, destacam-se quatro principais: pirólise, diluição em uma mistura de hidrocarbonetos, microemulsão e a transesterificação (alcoólise), sendo a última a mais utilizada, inclusive em escala industrial (ATABANI et al., 2012; LEUNG et al., 2010).

2.4.1 Reação de transesterificação (alcoólise)

A produção de biodiesel pela reação de transesterificação (alcoólise) é amplamente empregada devido aos baixos custos envolvidos e simplicidade da reação. Primeiramente, uma molécula de álcool reage com o triacilglicerol, liberando uma molécula de éster e um diacilglicerol. O diacilglicerol reage novamente com o álcool, liberando outro éster e um monoacilglicerol; e este reage novamente resultando na liberação da terceira molécula de éster e glicerol no meio reacional (LAM; LEE; MOHAMED, 2010; LEUNG et al., 2010). Os ésteres formados têm suas características definidas principalmente pelas cadeias de ácidos graxos dos quais se originaram e pelo álcool utilizado no processo, refletindo diretamente na viscosidade, ponto de fusão, estabilidade, etc. (SILITONGA et al., 2013). A transesterificação consiste em uma reação de equilíbrio químico, conforme mostra a Figura 2.3. Desta forma, para a produção de biodiesel usa-se um excesso de álcool a fim de deslocar o equilíbrio em direção à formação dos produtos. Os álcoois mais empregados para a síntese de biodiesel são metanol e etanol, podendo-se utilizar outros álcoois como propanol, butanol e álcool isoamílico (ATABANI et al., 2012; LEUNG et al., 2010).

Figura 2.3 – Reação de transesterificação para a síntese de biodiesel.



Fonte: Adaptado de LEUNG et al., 2010

A transesterificação do triacilglicerol é realizada na presença de um catalisador, podendo esse ser homogêneo ou heterogêneo. A Tabela 2.4 mostra diferentes tipos de catalisadores utilizados na síntese de biodiesel. Hidróxido de sódio (NaOH) e de potássio (KOH) são os mais utilizados, devido ao baixo custo e resultarem em elevados rendimentos em um menor tempo de reação.

Tabela 2.4 – Catalisadores empregados nas reações de transesterificação.

Tipo de catálise		Catalisador
Homogênea	Alcalina	NaOH, KOH, NaOCH ₃ , KOCH ₃ , NaMeO, K ₂ CO ₃
	Ácida	H ₂ SO ₄ , HCl
Heterogênea	Química	Silicatos de titânio, metais alcalinos terrosos (MgO, CaO, SrO), zircônias amorfas, hidrotalcitas.
	Enzimática	Lipases, esterases

Fonte: LAM et al., 2010; LEUNG et al., 2010

De maneira geral, a catálise homogênea apresenta altos rendimentos na produção de biodiesel. Todavia, como em todos os processos, existem algumas desvantagens. A catálise ácida, por exemplo, demanda um período reacional muito extenso, não sendo prático para fins industriais. Além disso, o reator utilizado precisa ser fabricado com materiais adequados, uma vez que o uso de ácidos pode levar à corrosão dos equipamentos (LEUNG et al., 2010; RANGANATHAN et al., 2008). Por sua vez, a catálise alcalina exige que a matéria-prima utilizada seja isenta ou apresente baixíssimos teores de ácidos graxos livres e umidade. Caso contrário, haverá a formação de sabões devido às reações de saponificação que consomem o catalisador e dificultam a separação do produto. Além disso, o glicerol produzido encontra-se contaminado com resíduo de álcool e sais provenientes do catalisador, resultando na redução do seu valor comercial. Existem ainda dificuldades relacionadas à recuperação do catalisador, necessitando técnicas mais avançadas de separação que elevam o custo do processo e do produto final. Em ambos os casos, têm-se a geração de resíduos ácidos/alcalinos que requerem tratamento do resíduo gerado antes do descarte final (ATABANI et al., 2012; DE SOUSA et al., 2010; LEUNG et al., 2010).

Em tempos recentes, catalisadores enzimáticos têm ganhado espaço como alternativa aos tradicionais catalisadores químicos. Enzimas são catalisadores

biológicos que atuam em diferentes reações biológicas, agindo de modo altamente específico e seletivo. Além de apresentarem atividade catalítica *in vivo*, algumas enzimas são capazes de catalisar reações de interesse industrial *in vitro* (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013). Ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas operam em condições suaves de temperatura e pressão, reduzindo significativamente a demanda energética do processo (MENDES et al., 2013; XUE; WOODLEY, 2012). Para a produção de biodiesel, não há formação de coprodutos indesejáveis (como sabões), sendo o glicerol formado de pureza superior ao obtido quando ácido/base são utilizados como catalisadores.

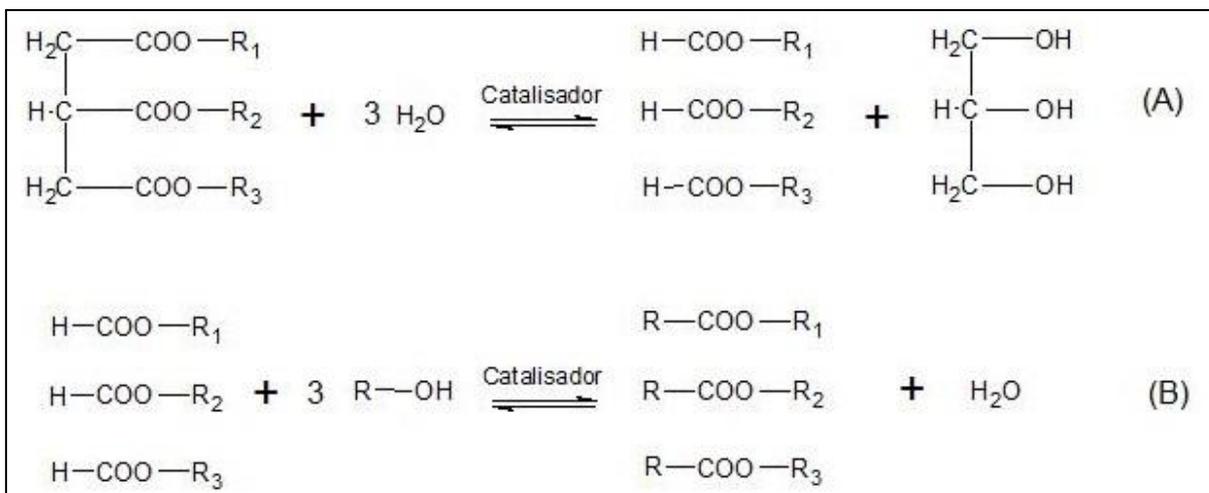
Nos últimos anos tem-se focado no uso de lipases imobilizadas para a produção de biodiesel (DA RÓS et al., 2010; MENDES et al., 2011; MENDES et al., 2012; POPPE et al., 2013). Enzimas imobilizadas são interessantes uma vez que possibilitam a reutilização do catalisador, possibilitam a produção de biodiesel em processos contínuos com conseqüente diminuição do custo do processo (SHELDON; VAN PELT, 2013).

2.4.2 Reação de hidroesterificação

Uma alternativa promissora à transesterificação visando a produção de biodiesel é a reação de hidroesterificação. Esta rota consiste em duas etapas sequenciais: reação de hidrólise do triacilglicerol seguida de esterificação dos ácidos graxos livres previamente purificados com diferentes álcoois, ambas catalisadas por um catalisador químico ou enzimático.

A reação de hidrólise do triacilglicerol é composta de três etapas reversíveis consecutivas. Conforme ilustrado na Figura 2.4-A, tri-, di- e monoacilglicerois são hidrolisados sequencialmente; consumindo uma molécula de água em cada hidrólise, e liberando três moléculas de ácido graxo e uma molécula de glicerol ao término da reação. Após a etapa de hidrólise, a fase orgânica contendo os ácidos graxos livres é separada da fase aquosa contendo o glicerol e o catalisador. Em uma segunda etapa (Figura 2.4 B), os ácidos graxos são esterificados com um álcool resultando na formação de uma mistura de alquil ésteres de ácido graxos (biodiesel) e uma molécula de água (DE SOUSA et al., 2010; DIAZ et al., 2013).

Figura 2.4 – Reação de hidroesterificação para a síntese de biodiesel. (A) Reação de hidrólise, (B) reação de esterificação.



Fonte: Adaptado de ALMARALES et al., 2012

O objetivo da etapa de hidrólise é liberar todos os ácidos graxos da molécula de triacilglicerol, a fim de serem esterificados em uma etapa posterior. Desta forma, a hidroesterificação possibilita a aplicação de qualquer material graxo como matéria-prima, independentemente de seu teor de acidez, uma limitação recorrente na reação de transesterificação alcalina.

A hidroesterificação favorece por sua vez a produção de glicerol de alta qualidade e sem contaminação com álcoois, uma vez que este não tem contato com o álcool utilizado (ex. metanol), que é altamente tóxico (ALMARALES et al., 2012; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2010). Diferente do glicerol obtido por transesterificação química, que necessita de purificação, a hidroesterificação tem como coproduto um glicerol de maior pureza que pode ser comercializado e utilizado nos mais variados processos, inclusive para fins alimentícios e farmacêuticos (TAN; ABDUL AZIZ; AROUA, 2013).

São poucos os trabalhos que utilizam lipases em reações de hidroesterificação relatados na literatura; todavia, alguns autores têm obtido resultados bastante promissores. AGUIEIRAS et al. (2014) reportaram porcentagem de hidrólise de 99% em 6 horas de reação catalisada por lipase de mamona e 91% na etapa de esterificação, empregando lipase de *Rhizomucor miehei*. DE SOUSA et al. (2010) reportaram 97% de conversão em ácidos graxos livres na etapa de hidrólise do óleo de pinhão manso empregando lipase extraída de sementes

germinadas de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para a síntese de ésteres metílicos obtidos via esterificação catalisada por partículas de ácido nióbbico.

2.5 Enzimas como biocatalisadores

Os processos biotecnológicos têm se tornado atraentes para o desenvolvimento de processos químicos sustentáveis, eficientes e ambientalmente “limpos”, podendo complementar ou substituir os existentes (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013; XUE; WOODLEY, 2012). Enzimas (proteínas que apresentam atividade catalítica) atuam em diferentes reações bioquímicas em organismos vivos e possuem comprovada atividade *in vitro*, podendo catalisar diversas reações de interesse industrial.

Enzimas são altamente específicas quanto aos substratos e aos produtos de suas reações; sendo superior aos catalisadores químicos que frequentemente geram coprodutos, muitas vezes indesejados (FERNANDES; CABRAL, 2010). As velocidades de reações enzimáticas são tipicamente de 10^6 a 10^{12} maiores do que as mesmas reações não catalisadas e algumas ordens de grandeza superiores às quimicamente catalisadas (VOET; VOET, 2011). Em contraste ao uso de catalisadores químicos que frequentemente requerem elevadas temperaturas e pressão, enzimas geralmente atuam sob temperaturas brandas, pressão atmosférica e faixa de pH próximo da neutralidade. Conseqüentemente, nota-se uma redução da demanda energética ao longo do processo, assim como de água e de solventes. Além do mais, devido à sua natureza biológica, enzimas são biodegradáveis; não geram intermediários nocivos e geralmente resultam em menor quantidade de resíduos industriais (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013). Tais características possibilitam fabricantes obterem produtos de qualidade igual ou até mesmo superior empregando quantidades menores de matéria-prima.

A tecnologia do DNA recombinante e engenharia de proteínas, ocasionaram um aumento no consumo mundial de enzimas industriais, principalmente devido à redução nos custos de produção e ao advento de enzimas com melhores propriedades para aplicações industriais. Contudo, os custos envolvidos na produção, especialmente na separação e purificação de enzimas ainda é um dos fatores que restringem sua aplicação como catalisadores em muitos

processos (FERNANDES; CABRAL, 2010; HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; SANCHEZ; DEMAIN, 2010).

2.5.1 Lipases

Lipases (glicerol éster acilhidrolases, EC 3.1.1.3) são importantes enzimas de uso industrial. Estas enzimas têm como função natural hidrolisar ésteres. A parte da hidrólise, essas enzimas catalisam reações como esterificação, transesterificação e interesterificação de lipídeos em meio orgânico (ADLERCREUTZ, 2013; ATABANI et al., 2012; CASTRO et al., 2004).

Lipases atuam pelo mecanismo de “ativação interfacial”, apresentando um aumento da atividade catalítica na presença de substâncias hidrofóbicas dispersas em fase aquosa (MENDES et al., 2012). Lipases possuem uma “tampa” de oligopeptídeos que cobre o sítio ativo da enzima. Na ausência de uma interface hidrofóbica, a enzima encontra-se em “conformação fechada” e o sítio ativo isolado do meio reacional. Na presença de uma interface hidrofóbica, há uma mudança na estrutura da enzima, resultando em uma “conformação aberta” que possibilita o acesso de moléculas de substrato (gotas de óleo) ao seu sítio ativo (mecanismo de “ativação interfacial”) (BARROS et al., 2010; CASTRO et al., 2004). Embora algumas lipases de origem microbiana como *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* tenham uma “tampa” anfifílica em sua estrutura, estas não apresentam “ativação interfacial”, indicando que devem atuar por um mecanismo alternativo (CASTRO et al., 2004).

As lipases têm sido amplamente empregadas em diferentes setores industriais. Em 1987, foi lançado no mercado pela empresa dinamarquesa Novozymes uma formulação enzimática chamada Lipolase, contendo lipase de *Thermomyces lanuginosus*, sendo o primeiro detergente a ser produzido em larga escala contendo enzimas de microrganismos recombinantes (NOVOZYMES; A/S, 2013; SALIHU et al., 2012). Em todo o mundo, a lipase utilizada neste produto ainda é adicionada em formulações dos principais detergentes. Outras lipases, tanto selvagens como recombinantes, foram lançadas no mercado com o passar do tempo, com as mais variadas aplicações (MEKALA et al., 2014; SOETAERT; VANDAMME, 2010). Estas enzimas também são empregadas na indústria de

alimentos, química fina, têxtil, papel e celulose, cosmético, farmacêutico, dentre outras. Um dos ramos que vêm ganhando espaço é a aplicação de lipases na produção de biocombustíveis. Diversos estudos publicados relatam o uso de lipases de origem microbiana catalisando reações de transesterificação (alcoólise) de óleos e gorduras para a produção de biodiesel (CASTRO et al., 2004; DORS et al., 2012; MENDES et al., 2012; NARWAL; GUPTA, 2013; SANGALETTI et al., 2013).

Enzimas extraídas de plantas também têm despertado o interesse visando a sua aplicação em escala industrial. Enzimas com atividade proteolítica como a papaína, bromelina e renina são produzidas em larga escala e possuem um mercado já estabelecido (MOUSSAVOU MOUNGUENGUI et al., 2013; SETH et al., 2014). Todavia, são poucos os trabalhos que exploram o uso de lipases vegetais, especialmente visando a produção de biocombustíveis. Para a produção de combustíveis como o biodiesel, é interessante o uso de enzimas vegetais, uma vez que estas não necessitam de elevada purificação a fim de serem usadas como catalisadores (BARROS et al., 2010).

Lipases vegetais podem ser encontradas em sementes de espécies oleaginosas. Estas sementes de plantas oleaginosas possuem uma elevada concentração de lipídeos e baixa quantidade de água em sua composição. A atividade lipolítica de lipases vegetais é, em sua maioria, observada nos estágios iniciais de desenvolvimento da semente (MOUSSAVOU MOUNGUENGUI et al., 2013; SANTOS et al., 2013; TÜTER, 1998), pois durante a germinação, a formação de lipases é induzida a fim de hidrolisar os lipídeos disponíveis na semente para o desenvolvimento da planta (BARROS et al., 2010; SU et al., 2010).

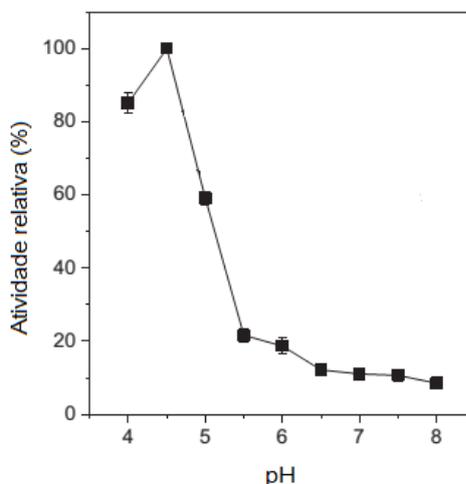
2.5.2 Lipase de Mamona (*Ricinus communis* L.)

Diferente de lipases microbianas que exigem laboriosos processos de purificação, lipases vegetais podem ser aplicadas diretamente em alguns processos, mesmo estando parcialmente purificadas, como o caso da lipase de mamona. A lipase de mamona possui características peculiares e interessantes que podem ser aproveitadas em processos industriais. Diferente de outras espécies oleaginosas, a lipase encontra-se ativa na semente tanto no estágio dormente como durante a fase

de germinação, podendo ser explorada diretamente da semente *in natura* (ALTAF et al., 1997; DE SOUSA et al., 2010; EASTMOND, 2004; SANTOS et al., 2013)

A característica mais interessante da lipase de mamona é a sua elevada atividade catalítica em pH ácido. SANTOS et al. (2013) verificaram uma elevada atividade catalítica em valores de pH ácidos, sendo a mais elevada em pH 4,5 (Figura 2.5). O aumento do pH resulta na inativação da enzima, sendo a atividade catalítica praticamente nula em valores de pH acima de 6,0. O pH ótimo ácido da lipase de mamona permite sua aplicação em condições reacionais não suportadas por muitas lipases, além do uso de matérias-primas de alta acidez sem a necessidade de grandes correções do pH do meio como alguns óleos vegetais não refinados, óleos residuais, etc.

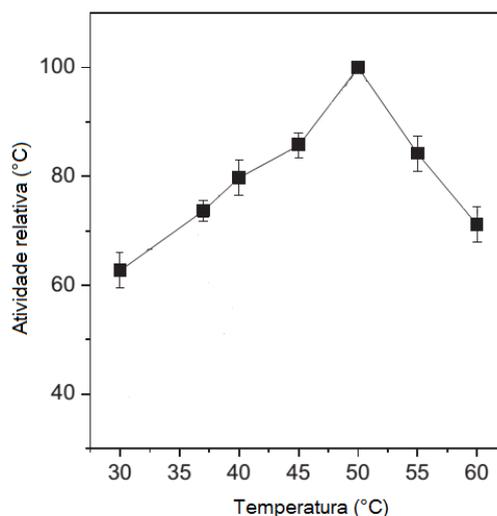
Figura 2.5 – Efeito do pH sobre a atividade lipolítica do extrato sólido de mamona. Atividade determinada pela hidrólise do azeite de oliva a 37 °C após 5 min de reação.



Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2013.

Em termos de temperatura de máxima atividade catalítica, a lipase de mamona possui um comportamento similar ao de outras lipases. Conforme observado na Figura 2.6, a lipase de mamona em extrato sólido apresenta um aumento da atividade acompanhando o incremento da temperatura, alcançando um valor máximo em 50 °C, seguindo de um decréscimo acentuado, provavelmente em virtude da inativação da lipase causada pelos efeitos da temperatura (HARRISON et al., 2003; SANTOS et al., 2013).

Figura 2.6 – Efeito da temperatura sobre a atividade da lipase de mamona. Atividade hidrolítica determinada pela hidrólise do azeite de oliva em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 após 5 minutos de reação.



Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2013.

Alguns trabalhos têm aplicado com grande êxito a lipase de mamona na modificação de óleos, especialmente na etapa de hidrólise. AGUIEIRAS et al. (2014) utilizaram o extrato sólido de lipase de mamona na hidrólise do óleo de polpa macaúba, alcançando 99,6% de conversão em apenas 6 horas de reação, sendo o meio reacional composto de alta concentração de óleo (50% v/v óleo:tampão). Similarmente, BRESSANI et al. (2014) aplicaram o extrato sólido de lipase de mamona na hidrólise de óleo ácido de polpa de macaúba e verificaram 92% de hidrólise em pouco menos de 2 horas. Esses resultados comprovam a eficiência catalítica da lipase de mamona na hidrólise de triglicerídeos.

Todavia, embora seja uma lipase conhecida já por várias décadas, a lipase de mamona carece de estudos mais aprofundados, especialmente no que se refere à sua caracterização e purificação com fins industriais, uma vez que são poucos os trabalhos que investigaram o aspecto estrutural da enzima. EASTMOND (2004) relata similaridades da lipase de mamona com a lipase do fungo *Rhizomucor miehei*, estimando que a lipase de mamona tenha uma massa molecular de 60 kDa.

2.5.3 Ricina

Embora seja possível obter um catalisador eficiente e de baixo custo a partir de sementes dormentes de mamona, a presença da proteína ricina representa

um obstáculo para a aplicação da lipase, principalmente em processos voltados para a síntese de compostos farmacêuticos e química fina. A ricina é uma proteína de 62-66 kDa, composta por duas cadeias polipeptídicas de aproximadamente 32 kDa e 34 kDa unidas por ligações dissulfeto. A cadeia A é uma potente ribotoxina, que inibe a síntese de proteínas em células; enquanto a cadeia B é uma lecitina, que se liga a resíduos de galactose na membrana celular. A concentração letal da ricina está estimada em 2 mg para um adulto quando há exposição entérica (Godoy et al., 2009, Brandon et al., 2014). Devido ao risco potencial desta toxina, torna-se necessária separá-la da lipase de mamona de forma que esta lipase possa ser aplicada de maneira mais generalizada e sem riscos.

2.6 Cinética das reações enzimáticas

Cinética é o estudo das velocidades em que as reações químicas se processam (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2010). A cinética enzimática se dedica ao estudo da velocidade das reações químicas catalisadas por enzimas e a influência que alguns fatores podem ter sobre esta, como temperatura, pH, concentração de substrato, força iônica do meio reacional e a presença de ligantes: substratos, produtos, inibidores e ativadores.

2.6.1 Efeito da temperatura

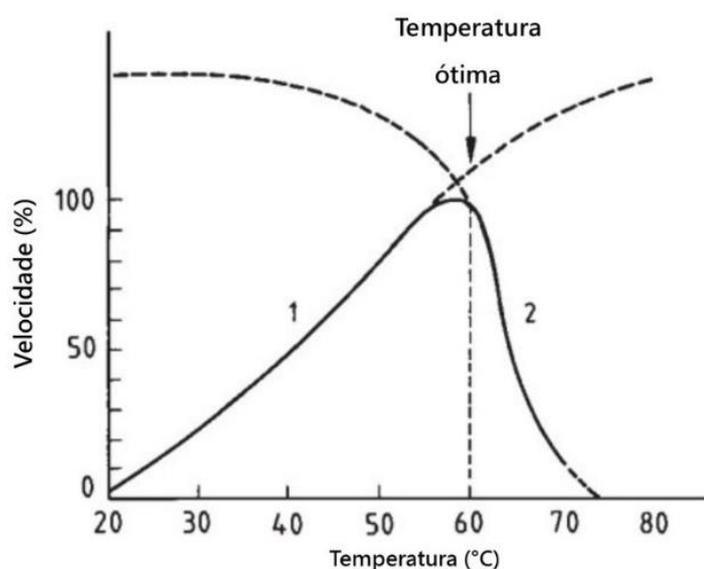
Como qualquer reação química, a velocidade de formação do produto das reações enzimáticas é aumentada com o aumento da temperatura (CORNISH-BOWDEN, 2013). Esse aumento ocorre devido à maior energia cinética fornecida aos reagentes, implicando em um aumento das colisões destes por unidade de tempo.

A atividade catalítica das enzimas é resultado de uma estrutura tridimensional precisa, altamente ordenada, com grupos aminoácidos justapostos. Esse arranjo é responsável por conferir a regioespecificidade enzima-substrato (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008). A estrutura tridimensional da enzima é mantida por uma série de interações fracas (interações de hidrogênio e forças de

van der Waals) entre os resíduos de aminoácidos que a compõem. Com o aumento da temperatura, os átomos das moléculas enzimáticas possuem maiores energias e uma maior tendência a se movimentarem. Por fim, eles adquirem energia suficiente para romper interações fracas que mantêm a configuração espacial da proteína, resultando em desnaturação e consequente perda de atividade catalítica (BAILEY; OLLIS, 1977). Portanto, a elevação da temperatura resultará em um aumento da velocidade em consequência das colisões entre enzima e substrato, mas aumentará também a velocidade de inativação (GIORDANO, 1987).

A Figura 2.7 mostra a variação da velocidade da reação em função da temperatura. A parte ascendente da curva é chamada de temperatura de ativação; sendo a variação da velocidade nesta etapa de acordo com a equação de Arrhenius. A parte descendente é chamada de temperatura de inativação ou inativação térmica (SHULER; KARGI, 2002). A curva de velocidade em função da temperatura para reações enzimáticas apresenta um pico, usualmente chamado de “temperatura ótima”. Este ponto de máximo representa a temperatura de máxima atividade catalítica.

Figura 2.7 – Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática. Velocidade normalizadas tendo a velocidade máxima (40 °C) como referência.

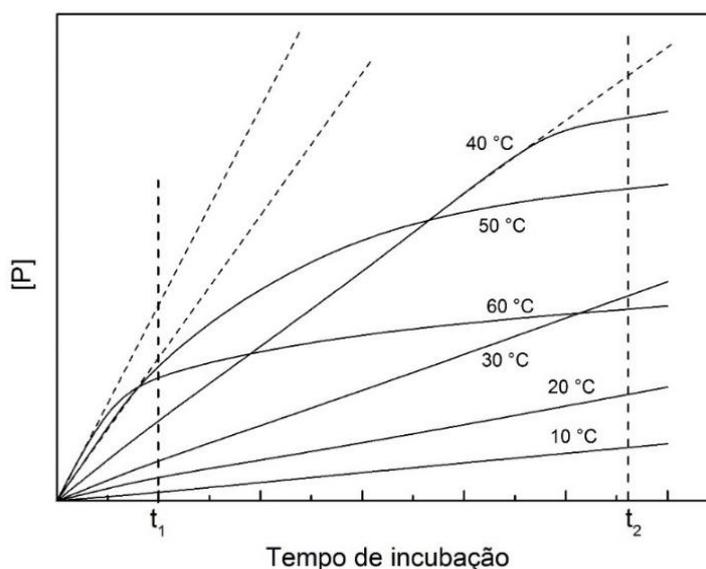


Fonte: Adaptado de AEHLE, 2007

Contudo, a temperatura de máxima atividade catalítica depende do tempo de reação escolhido, conforme mostrado na Figura 2.8. De fato, conforme

descrito por GIORDANO (1987), a verdadeira temperatura ótima de uma determinada enzima é aquela na qual a enzima apresenta uma atividade catalítica constante pelo menos durante o tempo de ensaio. Desta forma, a temperatura de máxima atividade depende do tempo de incubação e, portanto, do processo a ser empregado.

Figura 2.8 – Efeito da temperatura de incubação sobre a formação do produto. As linhas tracejadas indicam as verdadeiras velocidades iniciais de formação de produto a 50 °C e 60 °C.



Fonte: Adaptado de GIORDANO, 1987.

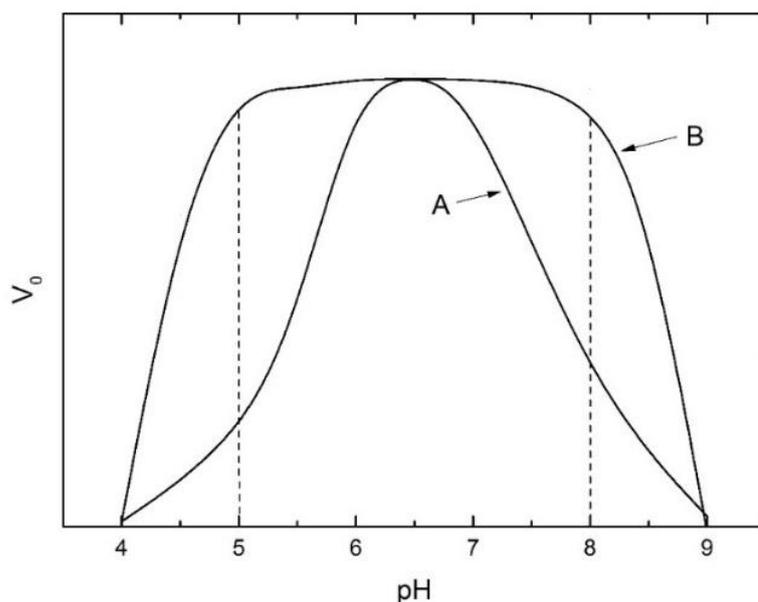
2.6.2 Efeito do pH

Por serem proteínas, enzimas têm propriedades que são sensíveis a variações de pH do meio reacional. De fato, a maioria das enzimas são ativas cataliticamente em uma faixa estreita de pH, geralmente entre 5,0 e 9,0 (BERG et al., 2010). Uma determinada enzima em sua forma íntegra pode conter grupos apresentando cargas positivas e negativas em um dado pH. As cargas eletrostáticas são resultado dos resíduos de aminoácidos que compõem a estrutura tridimensional da proteína (BAILEY; OLLIS, 1977). Algumas enzimas possuem grupos ionizáveis compondo o seu sítio ativo, e estes grupos devem estar em sua forma apropriada (protonado ou desprotonado) para funcionar. Mudanças do pH do meio afetarão profundamente o caráter iônico dos aminogrupos e grupos carboxílicos, causando

interferência no sítio catalítico e mudanças na atividade da enzima, e portanto, na velocidade da reação (LIU, 2013).

Em alguns casos, a alteração observada na atividade catalítica provocada por uma mudança no pH pode ser desfeita retornando às condições de reação originais. Todavia, valores extremos de pH podem causar desnaturação considerável e conseqüentemente inativação da enzima (BAILEY; OLLIS, 1977; GIORDANO, 1987). Esses efeitos podem ser observados na curva de atividade enzimática *versus* pH, conforme apresentado na Figura 2.9.

Figura 2.9 – Efeito do pH sobre a velocidade inicial de uma reação enzimática. Curva A: Atividade observada em função do pH. Curva B: atividade enzimática da enzima em pH 6,8, depois da enzima pré-incubada nos valores indicados de pH, mostrando o efeito do pH na estabilidade da enzima.



Fonte: Adaptado de GIORDANO, 1987.

A curva A (velocidade da reação em função do pH) indica o pH ótimo, mas não explica o porquê da velocidade diminuir abaixo ou acima do valor de máximo. Esse declínio pode ser resultado da formação de uma forma iônica do substrato e/ou da enzima, ou da inativação da enzima, ou da combinação desses fatores.

A curva B mostra o efeito do pH sobre a estabilidade da enzima. Verifica-se assim que a pré-incubação da enzima a pH entre 5,0 e 8,0 não afeta a atividade da enzima a pH 6,8. Logo, o declínio da atividade indicada pela curva A para os intervalos 5,0-6,8 e 6,8-8,0 deve ser provocado pela formação de uma forma

iônica não apropriada do substrato e/ou da enzima. Em pHs inferiores a 5,0 e superiores a 8,0, há a inativação irreversível da enzima.

Em alguns casos onde o substrato da reação possui grupos ionizáveis, o pH do meio reacional afeta a afinidade da enzima pelo substrato. Muitos substratos possuem grupos ionizáveis em sua estrutura, o que resulta em espécies diferentes de acordo com o pH do meio reacional (CORNISH-BOWDEN, 2013). A presença de grupos ionizáveis afeta a concentração do substrato no meio reacional, uma vez que em determinado valor de pH este pode encontrar-se ionizado ou dissociado. Sendo assim, o pH do meio reacional é capaz de afetar diretamente a afinidade da enzima pelo substrato, haja visto que apenas uma espécie (protonada ou não-protonada) é o substrato da reação.

Desta forma, um estudo da estabilidade da enzima é importante para sua caracterização; onde a pré-incubação da enzima por um período menor ou igual ao do ensaio se constitui uma etapa de grande importância.

2.6.3 Efeito da força iônica

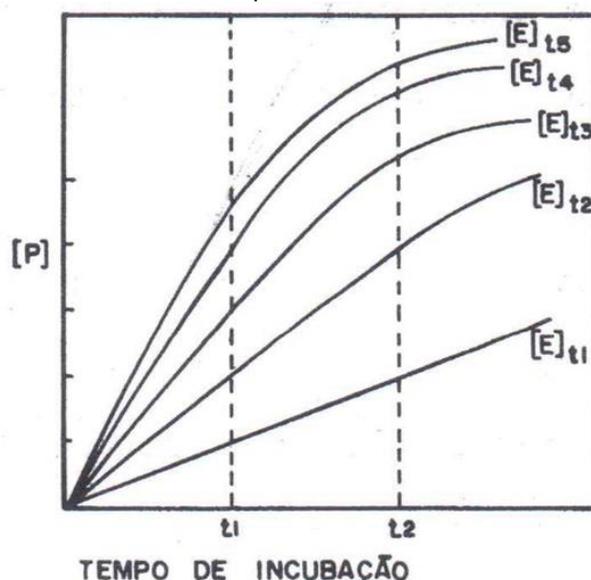
GIORDANO (1987) relata a importância da força iônica no estudo cinético de uma enzima, embora esse fator seja frequentemente ignorado em estudos cinéticos. Em determinado pH, um determinado tampão pode ter forças iônicas diferentes; podendo a enzima ser mais ativa ou mais estável em determinadas concentrações. Similarmente, um tampão pode agir como inibidor da enzima seja por efeito dos íons metálicos seja por semelhança com substratos, atuando como inibidor competitivo.

2.6.4 Efeito da concentração da enzima

A velocidade de uma reação enzimática depende diretamente da concentração de enzima utilizada na reação. Contudo, esta relação é linear somente se as velocidades iniciais forem tomadas; isto é, a velocidade de formação do produto deve ser constante em todo o tempo do ensaio escolhido (DIXON; WEBB, 1964). A Figura 2.10 mostra o aparecimento do produto em função do tempo, para

diferentes concentrações de uma dada enzima e uma concentração fixa de substrato.

Figura 2.10 – Efeito da concentração de enzima sobre as velocidades iniciais de formação de produto.



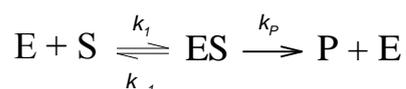
Fonte: GIORDANO (1987)

Similarmente, se uma concentração alta de enzima é escolhida (E_5 , por exemplo), dp/dt não será constante para o intervalo de tempo $0-t_1$, conforme visto na Figura 2.10. Dessa forma, verifica-se que para estudos cinéticos onde velocidades iniciais são tomadas é necessário estabelecer-se os limites de linearidade; isto é, estabelecer a quantidade máxima de produto que pode ser acumulada tal que as relações entre a concentração de produto e o tempo e entre a velocidade de aparecimento do produto e a concentração do produto e concentração da enzima sejam lineares (CORNISH-BOWDEN, 2013; DIXON; WEBB, 1964; GIORDANO, 1987).

2.6.5 Efeito da concentração de substrato

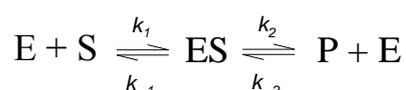
No final do século XIX, muitos pesquisadores tentaram explicar o comportamento de reações enzimáticas em termos dos princípios químicos conhecidos de equilíbrio. Em 1903, Henri propôs a primeira equação geral para reações envolvendo enzimas. Uma das hipóteses levantadas por Henri afirmava que

somente no início da reação os componentes estariam em equilíbrio (chamada de hipótese de equilíbrio rápido) (BAILEY; OLLIS, 1977; CORNISH-BOWDEN, 2013; DIXON; WEBB, 1964; SHULER; KARGI, 2002). Dez anos mais tarde, Michaelis e Menten confirmaram o trabalho de Henri e apresentaram uma versão levemente modificada da equação de velocidade. A teoria de reações catalisadas por enzimas proposta por Michaelis e Menten baseia-se na suposição de que a enzima e o substrato formam um complexo em uma reação reversível. Quando a concentração de substrato se torna alta suficiente para deslocar o equilíbrio em direção à formação do complexo ES, a segunda etapa da reação passa a ser a etapa limitante em termos de velocidade; e a velocidade global da reação torna-se insensível a novos aumentos na concentração de substrato (VOET; VOET, 2011). A reação é dada como:



Onde E, S, ES e P representam a enzima livre, substrato, complexo enzima-substrato e o produto, respectivamente. k_1 , k_{-1} são as constantes de associação e dissociação do complexo ES e k_p é a constante de velocidade para quebra do complexo ES em E + P.

Em 1924, Briggs e Haldane sugeriram uma equação de velocidade que não necessitava da restrição de equilíbrio requerido pelo método Henri-Michaelis-Menten. Eles apontaram que em um curto período após iniciada a reação, o complexo enzima-substrato atinge um estado estacionário onde as taxas de formação e decomposição do complexo ES são iguais (BERG et al., 2010; NELSON et al., 2008; VOET; VOET, 2011). A reação pode ser visualizada como:



A expressão cinética resultante da hipótese de estado estacionário é semelhante à proposta pelo equilíbrio químico, conforme mostrada nas Equações 2.1 e 2.2. Conhecida como equação de Michaelis-Menten, essa equação descreve a

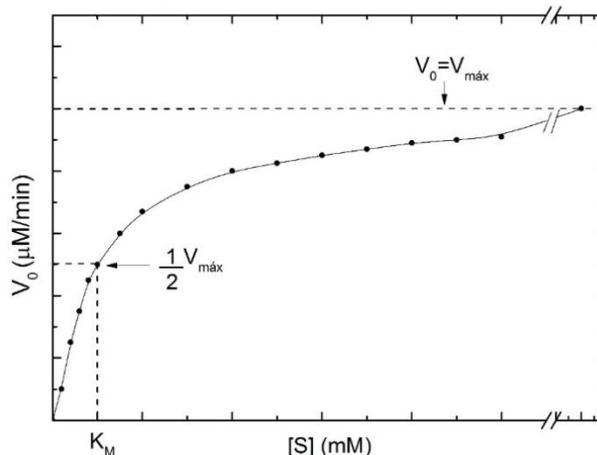
velocidade de uma reação enzimática para um substrato apenas. Ela relaciona a velocidade inicial (V_0), a velocidade máxima ($V_{M\acute{a}x}$) e a concentração inicial de substrato $[S]$; estando todas relacionadas pela constante K_M , chamada de constante de Michaelis-Menten.

$$v_0 = \frac{V_{M\acute{a}x} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (2.1)$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.2)$$

A Figura 2.11 ilustra a influência da concentração de substrato em reações enzimáticas simples (1 substrato), segundo a Equação (2.1).

Figura 2.11 – Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial da reação enzimática.



O valor de K_M para uma enzima depende do substrato utilizado e das condições operacionais tais como pH, temperatura e força iônica. A constante K_M é um importante parâmetro cinético, pois representa a eficiência catalítica da enzima utilizada na reação. Quando $[S] = K_M$, o valor de V_0 na Equação 1 assume o valor de $V_{M\acute{a}x}/2$. Neste caso, K_M é a concentração de substrato em que a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima (VOET; VOET, 2011). Desta forma, uma enzima com K_M baixo atinge a máxima eficiência catalítica em baixas concentrações de substrato (NELSON et al., 2008).

A constante K_M relaciona as constantes de velocidade das etapas intermediárias da reação [$K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$]. Em situações em que $k_{-1} \gg k_2$, assume-se que $K_M \sim k_{-1}/k_1$. Nestas condições, a constante K_M indica a afinidade da enzima

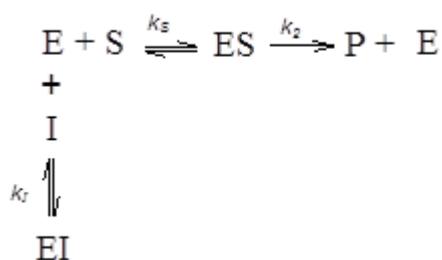
pelo substrato (DIXON; WEBB, 1964; SHULER; KARGI, 2002). Valores altos de K_M indicam uma interação fraca entre enzima e substrato; ao passo que um baixo valor de K_M aponta uma forte interação enzima-substrato (BERG et al., 2010; VOET; VOET, 2011).

2.6.6 Efeitos de inibição

Muitas substâncias são capazes de alterar a velocidade de uma reação catalisada por enzimas. Aquelas que são capazes de reduzir a atividade de uma enzima são conhecidas como inibidores. Existem vários modelos de inibição descritos na literatura. A seguir são tratados quatro modelos clássicos para inibição reversível que ocorrem em sistemas simples, isto é, onde apenas um substrato e um inibidor estão presentes em qualquer sistema de reação. Os modelos e suas respectivas equações gerais serão apresentados. As deduções e manipulações algébricas podem ser encontradas nas referências bibliográficas correspondentes (BERG et al., 2010; DIXON; WEBB, 1964; NELSON et al., 2008; VOET; VOET, 2011).

2.6.6.1 Inibição competitiva

Substâncias que competem diretamente com o substrato original pelo sítio ativo são chamados de inibidores competitivos (BERG et al., 2010). Esses inibidores possuem uma estrutura semelhante ao substrato, sendo capazes de se ligarem ao sítio ativo da enzima; mas se diferem do substrato no sentido de não serem reativos. As Equações 2.3 e 2.4 representam a reação enzimática na presença de um inibidor competitivo, mostrado abaixo:



Onde K_I é a constante de inibição e $[I]$ é a concentração de inibidor.

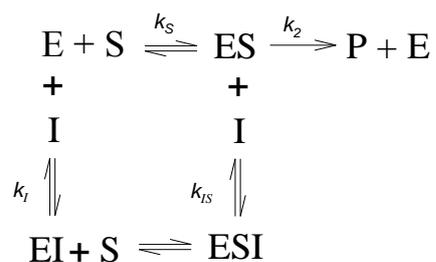
$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S]}{\alpha \cdot K_M + [S]} \quad (2.3)$$

$$\alpha = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \text{ e } K_I = \left(\frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}\right) \quad (2.4)$$

Um inibidor competitivo atua por reduzir a concentração de enzima livre disponível para os substratos se ligarem. Os efeitos deste tipo de inibição podem ser minimizados pelo uso de elevadas concentrações de substrato, deslocando o equilíbrio químico na direção da formação do complexo enzima-substrato.

2.6.6.2 Inibição não-competitiva

Na inibição não-competitiva a molécula de inibidor se liga à enzima em uma região diferente do sítio ativo, causando uma modificação da estrutura tridimensional da enzima e conseqüentemente, seu sítio ativo. Embora seja possível a ligação do substrato à enzima, o novo arranjo tridimensional não é o ideal para estabilizar o estado de transição e catalisar a reação. Esse tipo de inibição tem como característica a existência de um complexo ESI inativo formado pela ligação de S ao complexo EI ou pela ligação de I ao complexo ES; onde o complexo EI tem a mesma afinidade que E pelo substrato (GIORDANO, 1987). O equilíbrio na presença de um inibidor não-competitivo é dado por:



A expressão cinética que representa o fenômeno de inibição não-competitiva é apresentada nas Equações 2.5 a 2.7.

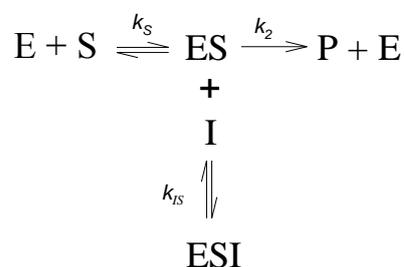
$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S]}{\alpha \cdot K_M + \alpha' \cdot [S]} \quad (2.5)$$

$$\alpha = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \text{ e } K_I = \left(\frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}\right) \quad (2.6)$$

$$\alpha' = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \text{ e } K_{IS} = \left(\frac{[E] \cdot [I]}{[ESI]}\right) \quad (2.7)$$

2.6.6.3 Inibição incompetitiva

Um inibidor incompetitivo é capaz de ligar-se reversivelmente ao complexo enzima-substrato, mas não diretamente à enzima livre. Um inibidor incompetitivo clássico não necessariamente apresenta semelhança estrutural com o substrato; porém a sua ligação ao complexo ES provoca uma distorção na estrutura da enzima. O inibidor incompetitivo afeta diretamente a atividade catalítica da enzima, sem interferir na afinidade desta pelo substrato (NELSON et al., 2008; SHULER; KARGI, 2002; VOET; VOET, 2011). O equilíbrio deste tipo de inibição é descrito por:



A expressão cinética que representa a reação enzimática com inibição incompetitiva é apresentada nas Equações 2.8 e 2.9.

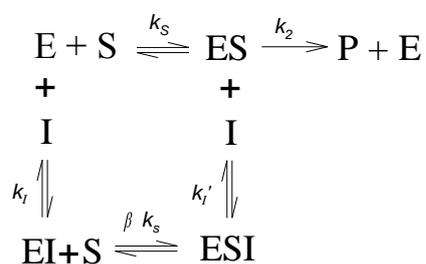
$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S]}{K_M + \alpha' \cdot [S]} \quad (2.8)$$

$$\alpha' = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \text{ e } K_{IS} = \left(\frac{[E] \cdot [I]}{[ESI]}\right) \quad (2.9)$$

Diferentemente da inibição competitiva, a velocidade máxima é reduzida pela presença do inibidor incompetitivo (pois em altas concentrações de substrato, V_0 se aproxima de $V_{\text{Máx}}/\alpha'$). Todavia, em baixas concentração de substrato ($[S] \ll K_M$), o efeito do inibidor incompetitivo passa a ser desprezível. O valor de K_M também é reduzido, uma vez que a concentração de substrato necessária para alcançar metade de $V_{\text{Máx}}$ também é reduzida pelo fator α' (GIORDANO, 1987; SHULER; KARGI, 2002; VOET; VOET, 2011).

2.6.6.4 Inibição mista

A inibição mista resulta quando tanto a enzima como o complexo enzima-substrato se ligam ao inibidor. Esse tipo de inibição pode ser considerado como uma mistura de inibição competitiva parcial e inibição não-competitiva pura quando β (fator que multiplica K_S quando o inibidor se liga à enzima) é maior que 1 (GIORDANO, 1987; SHULER; KARGI, 2002). O equilíbrio é dado por:



Na presença de um inibidor misto, a equação de Michaelis-Menten assume a forma apresentada nas Equações 2.10 a 2.12.

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S]}{\alpha \cdot K_M + \alpha' \cdot [S]} \quad (2.10)$$

$$\alpha = \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \text{ e } K_I = \left(\frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} \right) \quad (2.11)$$

$$\alpha' = \left(1 + \frac{[I]}{K_{i'}} \right) \text{ e } K_I = \left(\frac{[E] \cdot [I]}{[ESI]} \right) \quad (2.12)$$

Os efeitos da inibição mista podem ser verificados tanto em altas como em baixas concentrações de substrato; sendo a velocidade máxima e a constante K_M afetadas pela atuação do inibidor.

2.7 Purificação de enzimas

Uma das etapas críticas de processos biotecnológicos é a separação e purificação da molécula alvo (metabólito celular, enzima, proteínas estruturais, antígenos, etc.). Geralmente essa etapa representa a maior parte do custo do produto final. Nesse contexto, a vantagem competitiva do produto irá depender da escolha criteriosa das técnicas empregadas na purificação, considerando aspectos de inovação e otimização do processo em larga escala (LESER; ASENJO, 1992). A purificação de enzimas, assim como no caso de outros bioprodutos, deve sempre visar o máximo rendimento, resultando em um produto relativamente puro com custos mínimos. Em geral, deve-se sempre considerar as características da molécula alvo presente no extrato e as características finais almejadas. Estas duas informações são fundamentais na escolha das técnicas, limitações das operações e condições usadas.

A estratégia de separação e purificação da biomolécula deve levar em conta suas propriedades físico-químicas, como estabilidade térmica, solubilidade, difusividade, carga, ponto isoelétrico, etc. (HARRISON et al., 2003; VERRALL, 1996). A Tabela 2.5 elenca as operações unitárias tipicamente empregadas no processo de purificação baseado nas propriedades da proteína alvo.

Tabela 2.5 – Operações unitárias aplicadas na separação e purificação de bioprodutos e suas respectivas propriedades físico-químicas exploradas.

Operação	Propriedade físico química
Centrifugação	Velocidade de sedimentação
Filtração	Tamanho da partícula
Microfiltração	Tamanho da partícula
Homogeneização	Natureza intracelular
Moinho de bolas	Natureza intracelular
Ultrafiltração	Tamanho molecular
Extração em duas fases	Coeficiente de partição
Precipitação	Solubilidade
Adsorção	Forças de van der Waals, polaridade
Troca iônica	Carga
Interações hidrofóbicas	Superfície hidrofóbica
Afinidade cromatográfica	Afinidade biológica
Filtração em gel	Tamanho molecular
Cromatografia líquida em fase reversa	Interações hidrofóbicas e hidrofílicas

Fonte: LESER; ASENJO, 1992

O objetivo geral das etapas de purificação é que a pureza ou atividade da proteína alvo por unidade de massa seja aumentada com a eliminação de proteínas indesejáveis ou inativas (PINOTTI, 2003). HARRISON et al. (2003) salientam ainda que as abordagens utilizadas em todas as etapas de purificação devem ser implementadas com o futuro aumento de escala em mente; considerando sempre os padrões de qualidade exigidos, rendimento e custos envolvidos.

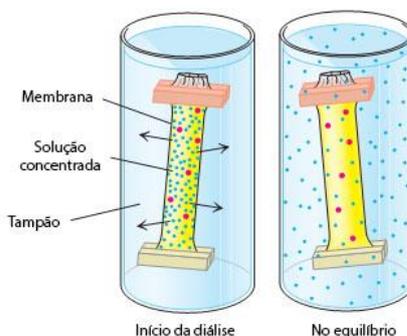
Como no caso da maioria das enzimas de origem vegetal, lipases são encontradas em plantas e sementes em baixas concentrações (VERRALL, 1996). Desta forma, a purificação e concentração destas enzimas torna-se uma etapa essencial tanto do ponto de vista científico como industrial. Neste trabalho foram empregadas as técnicas de diálise, adsorção por troca iônica e adsorção hidrofóbica nas etapas de purificação da lipase de mamona.

2.7.1 Diálise

Trata-se de uma técnica simples e amplamente empregada como etapa de purificação de proteínas. Baseia-se na separação de moléculas em solução pelo tamanho, ocorrendo a difusão seletiva através de uma membrana semipermeável (EVANS; ROMERO; WESTOBY, 2009).

A solução contendo a proteína de interesse é colocada em uma membrana de material poroso como celulose, cujos poros de tamanho específico atuam como barreira, permitindo a passagem de moléculas de diâmetros menores em ambas as direções enquanto retém moléculas grandes tais como proteínas. Conforme ilustrado na Figura 2.12, o sistema contendo o extrato de proteína é colocado em contato com solução tampão ou água ultrapurificada, cujo volume é muito superior ao volume de solução enzimática. O gradiente de concentração do tampão através da membrana promove a difusão do soluto (moléculas pequenas e íons) de regiões mais concentradas para as menos concentradas (BERG et al., 2010; EVANS et al., 2009; NELSON et al., 2008).

Figura 2.12 – Esquema do processo de diálise. As proteínas (vermelho) ficam retidas no interior da membrana, enquanto moléculas pequenas (azul) atravessam a membrana.



Fonte: Adaptado de BERG et al., 2010

A diálise constitui uma técnica útil para a remoção de sais, carboidratos, oligossacarídeos, oligopeptídeos e pequenas proteínas contaminantes. Porém, é ineficaz na distinção das proteínas que compõem o extrato enzimático. Trata-se de uma operação importante para obtenção de melhores resultados em etapas de purificação posteriores.

2.7.2 Adsorção por troca iônica

Proteínas, em determinado valor de pH, possuem cargas elétricas distribuídas em suas superfícies capazes de interagir eletrostaticamente com um material adsorvente. A adsorção por troca iônica é uma técnica de purificação de média-alta resolução, muito versátil e que utiliza a existência das cargas elétricas como ferramenta para separação e purificação de biomoléculas (JUNGBAUER; HAHN, 2009). As interações eletrostáticas entre cargas opostas da superfície da proteína e dos grupos funcionais presentes na superfície do material adsorvente possibilita a concentração e purificação simultânea de uma proteína diluída em um extrato enzimático.

Os suportes utilizados nessa técnica são em geral resinas cuja superfície é modificada pela inserção de um grupo iônico. Os grupos iônicos utilizados são classificados como aniônicos (carregados negativamente) ou catiônicos (carregados positivamente). Os suportes atuam como ácido ou base, ocorrendo a protonação ou desprotonação dos grupos funcionais na superfície do material de acordo com o pH do meio. Trocadores altamente iônicos atuam como ácidos ou bases fortes, permanecendo carregados em uma ampla faixa de pH; enquanto trocadores com grupos fracos são passíveis de sofrer protonação ou desprotonação do grupo funcional em função da variação do pH. Essa propriedade, quando explorada, resulta em maior seletividade quando gradientes de pH são aplicados nos ensaios. A Tabela 2.6 apresenta alguns dos grupos funcionais presentes em resinas de troca iônica comerciais.

Tabela 2.6 - Grupos funcionais de trocadores iônicos.

Nome	Abreviação	Estrutura	Natureza
Dietilaminoetil	DEAE	$-\text{OCH}_2\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Troca aniônica
Trimetilaminoetil	TMAE	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	
Dimetilaminoetil	DMAE	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_3)_2$	
Trimetilhidroxipropil	QA	$-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	
Aminoetil quaternário	QAE	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	
Amino quaternário	Q	$-\text{OCH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	
Carboximetileno	CM	$-\text{OCH}_2\text{COOH}$	Troca catiônica
Ortofosfato	P	$-\text{OPO}_3\text{H}_2$	
Etilsulfonato	SE	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$	
Propilsulfonato	SP	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$	
Metilsulfonato	S	$-\text{OCH}_2\text{SO}_3\text{H}$	

Fonte: Adaptado de JANSON, 2011

A capacidade total de proteínas que podem ser adsorvidas depende da natureza do ligante, densidade, tamanho da proteína e porosidade/área de superfície do suporte. A dessorção da proteína do suporte pode ser feita por eluição competitiva induzida pelo aumento da força iônica do meio, pela variação do pH ou ambos (DENNISON, 2003).

2.7.3 Adsorção hidrofóbica

As interações hidrofóbicas representam fenômenos de grande importância em sistemas biológicos, tais como dobramento de proteínas, interação de proteína-substrato e transporte de proteínas através de membranas (MCCUE, 2009). O grau de hidrofobicidade de uma proteína depende de sua estrutura primária e secundária. Aminoácidos como triptofano, fenilalanina, tirosina, leucina, valina e metionina possuem a cadeia lateral hidrofóbica (estrutura primária). Além de estabilizar a estrutura tridimensional da proteína, a presença de resíduos de

aminoácidos hidrofóbicos expostos na superfície (estrutura secundária) interfere na polaridade da proteína.

Em meio aquoso (meio polar), proteínas hidrofóbicas tendem a se associarem espontaneamente umas às outras ou se agregarem a fim de alcançarem o menor nível de energia possível (KENNEDY, 1990). Da mesma forma, na presença de grupos hidrofóbicos, as proteínas presentes na solução interagem com a superfície hidrofóbica de modo a diminuir seu contato com o solvente. O resultado desta interação é uma condição menos estruturada (maior entropia) - um estado termodinâmico favorável (MCCUE, 2009).

A adsorção hidrofóbica baseia neste princípio, explorando regiões hidrofóbicas presentes na estrutura tridimensional da proteína que sejam capazes de interagir com grupos funcionais hidrofóbicos da superfície dos suportes. Os suportes empregados tipicamente possuem grupos fenil, butil ou octil em sua superfície. A interação ocorre em ambientes favoráveis, tais como soluções aquosas com elevada concentração de sais dissolvidos (AHMED; AHMED, 2004). A presença de ânions como PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , etc. e cátions NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , etc., favorecem a interação hidrofóbica (HARRISON et al., 2003; JUNGBAUER; HAHN, 2009).

A adsorção hidrofóbica é uma técnica com alta seletividade na purificação de moléculas altamente hidrofóbicas. O uso de suportes hidrofóbicos em soluções com baixas forças iônicas favorece a adesão de moléculas altamente apolares, uma vez que essas tendem a se aderir a superfícies hidrofóbicas mais efetivamente que as demais moléculas. Desta forma, mesmo em meios contendo uma elevada concentração de proteínas contaminantes é possível atingir uma maior seletividade em termos de purificação de proteínas com alta densidade de grupos hidrofóbicos em sua superfície (MCCUE, 2009). Por outro lado, o aumento da força iônica do meio reacional favorece a adsorção das demais moléculas presentes no extrato enzimático.

A dessorção das proteínas pode ser realizada pela redução da força iônica, uso de detergentes ou pelo aumento do pH do meio reacional (AHMED; AHMED, 2004).

2.8 Suportes magnéticos

Suportes magnéticos têm atraído a atenção como material alternativo para aplicação em bioprocessos nos últimos anos. Partículas magneticamente funcionalizadas podem ser utilizadas para a imobilização de enzimas, apresentando uma maior eficiência nas etapas de separação do biocatalisador, mesmo em meios complexos contendo outros sólidos em suspensão (FRANSSEN et al., 2013).

Nanopartículas magnéticas têm como característica o superparamagnetismo: as partículas são atraídas quando submetidas a um campo magnético externo; mas não retêm qualquer magnetismo residual quando o campo magnético é removido. Conseqüentemente, partículas superparamagnéticas permanecem em suspensão sem formar aglomerados ao longo do processo, podendo ser removidas da solução aplicando um campo magnético externo.

Partículas magnéticas capazes de formar dispersões superparamagnéticas em um fluido são geralmente compostas de metais ou óxidos de metais, como Ni, Co, Fe, Fe_3O_4 ($\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, dentre outros. Nanopartículas magnéticas podem ser preparadas, por exemplo, pela coprecipitação de soluções contendo Fe^{2+} e Fe^{3+} em solução alcalina, formando óxido de ferro (II, III). Algumas técnicas existentes fazem a imobilização direta nas partículas sintetizadas, ou após algumas modificações serem feitas na superfície da partícula magnética. MENG et al. (2014) imobilizaram lipase de *Mucor javanicus* em nanopartículas de Fe_3O_4 modificadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano (APTES) para a produção de 1,3-diacilglicerol via esterificação. Neste mesmo estudo, os autores observaram um aumento da atividade da enzima imobilizada; obtendo rendimentos superiores a 90% e o reuso da enzima em 10 ciclos.

Alternativamente, pode-se promover o recobrimento das partículas magnéticas sintetizadas com sílica ou materiais poliméricos, aumentando a estabilidade química e térmica, possibilitando introduzir várias funcionalidades na superfície do material modulando sua especificidade de ligação (FRANSSEN et al., 2013; KOPP, 2013; KOPP et al., 2015; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013). XIE; MA (2010) imobilizaram lipase de *Thermomyces lanuginosus* em partículas de Fe_3O_4 recobertas com N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodi-imida (EDAC) para a produção de biodiesel pela rota de transesterificação. Neste estudo, empregando 40% de lipase imobilizada (m/m) em um processo em 3

etapas (3 adições de metanol, proporção óleo:álcool de 1:1), alcançou-se a conversão de 90% do óleo de soja. Resultados como esses demonstram o potencial de enzimas imobilizadas em suportes magnéticos de potencializar os processos biotecnológicos existentes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.2 Material

3.2.1 Sementes e óleos vegetais

Sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) cultivar AL Guarany 2002 foram adquiridas da BR SEEDS LTDA (Araçatuba – SP). O óleo de castanha de macaúba foi gentilmente cedido pela Paradigma Óleos vegetais (Carmo do Paranaíba – MG). O óleo de soja refinado (Liza) e azeite de oliva refinado (Carbonell) foram adquiridos no comércio local.

3.2.2 Reagentes consumíveis

Albumina sérica bovina (BSA), butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB), cloreto de ferro (II) tetrahidratado, cloreto de ferro (III) hexahidratado, ácido butanoico, 1-butanol, heptadecanoato de metila, trimetoxi(octil)silano, (3-aminopropil)triétoxissilano e tributirina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Persulfato de amônio, dodecil sulfato de sódio (SDS), tetra metil etilenodiamona (TEMED), tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto (TRIS-HCl) foram adquiridos da Hexapur (Califórnia, EUA). Acetato de Sódio, acetonitrila, citrato de sódio e as peneiras moleculares adquiridas da J.T. Baker (New Jersey, EUA). Acrilamida e bisacrilamida foram adquiridas da Ludwig Biotec (Rio Grande do Sul, Brasil) e tolueno da Panreac (Barcelona, Espanha). Bicarbonato de sódio e cloreto de sódio adquiridos da Qhemis (Brasil). Biftalato de potássio da Quimibrás (Rio de Janeiro, RJ). *Coomassie Blue Brilliant* G-250, silicato de sódio e o Triton-X 100 foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ). Acetona, ácido acético, ácido cítrico, carbonato de sódio, ciclohexano, etanol hidratado, etanol anidro, fenolftaleína, fosfato de sódio bibásico dodecahidratado, fosfato de sódio monobásico anidro, goma arábica (resina natural composta de polissacarídeos e glicoproteínas), sulfato de sódio anidro, hidróxido de amônio, sulfato de amônio, hidróxido de sódio e o hidróxido de potássio da Synth (São Paulo, Brasil). As membranas de celulose com diâmetro de poro de 14 kDa usadas nas diálises foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). As lipases

de *Thermomyces lanuginosus* (IMMTLL-T2-150) e de *Pseudomonas fluorescens* (IMMAPF-T2-150) comerciais imobilizadas em resina epóxi foram adquiridas da ChiralVision (Holanda). A resina Streamline SP XL e o marcador molecular Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit foram adquiridos da GE Healthcare (Inglaterra)

3.3 Métodos analíticos

3.3.1 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteínas presentes nas soluções preparadas foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976). O método baseia-se na ligação do corante *Coomassie Blue Brilliant G-250* à proteína, que resulta na mudança da coloração da solução de castanho escuro para azul. Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como padrão na construção da curva de calibração na faixa de 0 a 0,8 mg/mL.

3.3.2 Hidrólise do azeite de oliva

A hidrólise de emulsão de azeite de oliva foi realizada conforme metodologia descrita por SOARES et al., (1999) com modificações. A emulsão do substrato foi preparada com 30 g de azeite de oliva e 30 mL solução de goma arábica (7% m/v). Em frascos erlenmeyer, foram adicionados 5 mL de substrato e 4 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5. Foram utilizados 100 mg de enzima (extrato sólido ou derivado) ou 1 mL de enzima solubilizada. O sistema reacional foi incubado sob agitação constante (200 rpm) a 37 °C por 5 minutos, e a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de etanol comercial. Os ácidos graxos liberados foram titulados utilizando uma solução de hidróxido de potássio 40 mM padronizada na presença de indicador fenolftaleína. Paralelamente, foi realizado um controle (branco) nas mesmas condições descritas anteriormente, sem a adição de enzima.

A atividade enzimática foi determinada de acordo com a Equação 3.1, expressa em $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$. Uma unidade de atividade (U_{azeite}) foi definida como quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo livre por minuto de reação nas condições operacionais (200 rpm, 37 °C e tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5).

$$U_{\text{azeite}} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{g} \cdot \text{min}} \right) = \frac{(V_a - V_b) \cdot 10^3}{t \cdot E} \quad (3.1)$$

Na qual V_a é o volume de KOH utilizado na titulação da amostra (mL); V_b é o volume utilizado na titulação do controle (mL); M é a concentração molar da solução de KOH; t é o tempo de incubação (min) e E é a massa de enzima (g de enzima ou derivado; mL para enzima solúvel).

3.3.3 Hidrólise da tributirina

A hidrólise de tributirina foi realizada seguindo a metodologia descrita por BEISSON et al. (2000), com algumas adaptações. A mistura reacional composta de 14 mL de água destilada, 5 mL de tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4.2 e 1 mL de tributirina foi mantida sob agitação mecânica em reator encamisado a 37 °C por 2 minutos. Após a adição da solução enzimática, extrato bruto ou derivado (0,1g de sólido ou 1 mL de solução), o equipamento pHstato (pHstat Tritrino 718, Metrohm - Suíça) foi utilizado para controlar a quantidade de KOH 40 mM adicionada ao meio reacional mantendo o pH do meio reacional em 4,5 durante 7 minutos. A quantidade de ácido butanoico liberado no meio reacional foi quantificada pelo volume de KOH consumido ao longo da reação. Conforme apresentado na Equação 3.2, uma unidade de atividade (U_{TBU}) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido butanoico por minuto nas condições experimentais.

$$\text{Atividade} \left(\frac{U_{\text{TBU}}}{\text{mL ou g}} \right) = \frac{(\text{mL KOH}/\text{min}) \times M \times 1.000}{E} \quad (3.2)$$

Em que: M é a concentração molar da solução de KOH (M) e E é a quantidade de enzima utilizada no ensaio (mL para enzima solúvel e g para extrato bruto ou derivado).

3.3.4 Hidrólise do butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB)

A atividade de hidrólise do butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB) foi determinada conforme descrito por PALOMO et al. (2002), com modificações. O aumento da absorbância do meio reacional causada pela liberação de *p*-nitrofenol durante a reação foi acompanhado espectrofotometricamente a 348 nm. O ensaio foi realizado em um espectrofotômetro com célula termostatizada (25 °C) com agitação magnética constante. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de solução enzimática ao meio reacional contendo 25 µL de solução de *p*-NPB 50 mM em acetonitrila e 1950 µL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,5.

Para a enzima adsorvida em diferentes suportes, as reações foram realizadas em reator encamisado contendo 9,875 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,5 e 125 µL de *p*-NPB sob agitação mecânica constante. Após a adição de 0,1 g de derivado (massa úmida), 750 µL de suspensão foram coletados em intervalos de 1 minuto e a absorbância medida em espectrofotômetro.

Uma unidade de atividade de hidrólise ($U_{p\text{-NPB}}$) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µmol de *p*-NPB por minuto nas condições de ensaio, sendo calculada conforme descrito pela Equação 3.3.

$$\text{Atividade} \left(\frac{U_{p\text{-NPB}}}{\text{g ou mL}} \right) = \frac{\frac{\Delta A}{\Delta t} \times V_R}{\left(\frac{\epsilon}{1.000} \right) \times E \times 1} \quad (3.3)$$

Onde ($\Delta A/\Delta t$) é o coeficiente angular obtido no gráfico “Absorbância vs. Tempo”, V_R é o volume reacional, E é a quantidade de enzima utilizada no ensaio (g para derivado ou mL para solução enzimática), 1 é o comprimento do caminho óptico (1 cm) e ϵ é o coeficiente de extinção molar do *p*-NPB $5,150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.3.5 Atividade de esterificação (síntese do butirato de butila e oleato de butila)

A determinação da atividade de esterificação foi realizada conforme descrito por ABBAS; COMEAU (2003), com modificações. A síntese do butirato de butila foi realizada em frascos fechados contendo uma solução de ácido butanoico ou ácido oleico (0,1 M) e 1-butanol (0,1 M) diluídos em n-heptano. O sistema reacional foi incubado a 37 °C sob agitação constante de 300 rpm. Para determinar a atividade de esterificação das enzimas comerciais utilizadas neste trabalho (livres ou imobilizadas), uma quantidade determinada de enzima foi adicionada ao meio reacional (10 mL) e incubadas nas condições descritas anteriormente por 1h. Em intervalos regulares, alíquotas foram retiradas para a quantificação de 1-butanol consumido e determinação da concentração de butirato de butila ou oleato de butila formado. O consumo de 1-butanol foi analisado por cromatografia gasosa em cromatógrafo a gás Agilent 7890A (Agilent, EUA) equipado com coluna HP-Innowax (30 m, 0,32 mm, 0,25 μ M), conforme descrito no item 3.2.6. Uma unidade de atividade de esterificação (U_{Est}) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1 μ mol de butirato de butila por minuto nas condições reacionais.

3.3.6 Quantificação dos ésteres de etila (biodiesel) formados por cromatografia gasosa

Os ésteres de etila formados nas reações de transesterificação e esterificação foram analisados e quantificados por cromatografia gasosa (Cromatógrafo Agilent 7890A GC), com detector de ionização de chama (FID) e coluna Restek, de acordo com a metodologia estabelecida pela norma europeia EN 14103. As condições empregadas para a quantificação dos ésteres de etila encontram-se alistadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Condições utilizadas na quantificação dos ésteres de etila por cromatografia gasosa.

Padrão interno	Heptadecanoato de metila
Solvente	Heptano (10 mg/mL)
Coluna	Restek 12423: 250 °C, 30m x 250 µm x 0.25 µm
Detector	FID
Temperaturas	Coluna: 150 °C por 2 min, 180 °C por 3 min a uma taxa de 10 °C/min e 230 °C por 7 min a uma taxa de 10 °C/min, totalizando 25 min de análise Ionizador e detector: 250 °C
Gás de arraste	N ₂ (400 mL/min)

O rendimento da reação em relação aos ésteres etílicos formados foi calculado segundo a Equação 3.4:

$$R (\%) = \frac{(\Sigma A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \left(\frac{C_{EI}}{m} \right) \times 100 \quad (3.4)$$

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 metila (C17), C_{EI} é concentração do heptadecanoato de metila (10 mg/mL); V_{EI} é o volume de heptadecanoato de metila (1 mL) e m é a massa de amostra (mg).

3.4 Procedimento experimental

3.4.1 Preparo do extrato sólido de mamona

Sementes de mamona foram processadas seguindo a metodologia adaptada de AVELAR et al. (2013) e PIEROZAN et al. (2009). Sementes de mamona sem casca foram trituradas em acetona gelada (4 °C) por 2 minutos, seguido de adição de acetona a fim de completar uma proporção semente/acetona 1:5 (m/v). O material triturado foi mantido sob agitação a 4 °C por diferentes períodos. Em seguida, a suspensão foi filtrada a vácuo e submetida sucessivas lavagens com acetona gelada (1 mL/g de semente em cada lavagem). Após as

lavagens, o material filtrado foi mantido a temperatura ambiente para evaporação da acetona residual, sendo então peneirado em malha 0,85 mm e armazenado. Este material foi chamado de extrato sólido de mamona (ESM).

3.4.2 Avaliação espectrofotométrica da acetona de lavagem

Foram coletadas amostras da acetona utilizada em cada uma das lavagens aplicadas ao extrato bruto. As amostras foram filtradas em membrana 0,22 μm (Millex, Merck Millipore) e submetidas à varredura espectrofotométrica entre 190 e 600 nm (Genesys 10 UV, Thermo Scientific).

3.4.3 Estabilidade térmica do extrato sólido de mamona

Cem miligramas de extrato sólido de mamona foram incubados em 100 μL de tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,5, em microtubos. Após a homogeneização, os tubos foram incubados a 25, 30, 40 e 50 °C. Amostras foram coletadas após 30 minutos, 1h, 3h, 6h, 12h e 24h e a atividade lipolítica determinada pelo método da hidrólise da tributirina (item 3.2.3).

3.4.4 Estabilidade do extrato sólido de mamona em mistura etanol-óleo

Em microtubos plásticos de 2 mL foram adicionados 0,1 g de extrato bruto de mamona. Em seguida, em cada tubo foram adicionados óleo de soja e etanol anidro na proporção molar óleo:etanol 1:3. O material foi homogeneizado e mantido sob agitação constante a 25 °C. Amostras foram coletadas após 1h, 4h, 8h e 12h de incubação; centrifugadas. O material remanescente foi então ressuspensionado em tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,5 e a atividade lipolítica mensurada pelo método da hidrólise de tributirina (item 3.2.3).

3.4.5 Estudo cinético da hidrólise

A cinética de hidrólise do óleo de soja catalisada pela lipase presente no extrato sólido de mamona foi avaliada pelo método das velocidades iniciais. Foram realizados ensaios variando-se a temperatura, concentração de enzima, solvente utilizado e concentração de substrato. Em todos os experimentos, o avanço da reação foi acompanhado pelo índice de acidez do meio reacional. Todos os experimentos foram realizados ao menos em duplicata.

3.4.5.1 Efeito da temperatura

A hidrólise do óleo de soja foi realizada seguindo a metodologia descrita por AVELAR et al. (2013), com modificações. A hidrólise foi realizada em reator encamisado de 200 mL contendo 10g de óleo de soja, 90g de água destilada ou tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 e 2g de catalisador (2% m/m). As reações foram realizadas a 25, 37 e 50 °C, sendo o meio reacional mantido sob agitação mecânica constante de 1.000 rpm por um período máximo de 12 horas.

O avanço da reação em termos de conversão foi determinado pelo índice de acidez do meio reacional, acompanhado ao longo da reação. Em intervalos regulares, amostras (1g) foram recolhidas do reator, pesadas e transferidas para frascos erlenmeyer, seguido da adição de 10 mL etanol comercial para inativar a enzima e solubilizar os ácidos graxos livres (AGL). O sistema foi então titulado com uma solução padronizada de KOH 20 mM na presença de indicador fenolftaleína. A porcentagem de hidrólise foi definida como porcentagem em massa de ácido graxo presente na amostra coletada dividida pelo valor máximo teórico, seguindo a Equação 3.5 adaptada de ROONEY; WEATHERLEY (2001).

$$\text{Hidrólise (\%)} = \frac{V_{\text{KOH}} \times 10^{-3} \times M_{\text{KOH}}}{m \times f} \times \frac{\text{MM}}{3} \times 100 \quad (3.5)$$

Onde: V é o volume de KOH (mL) gasto na titulação, M é a concentração da solução de KOH (mol/L), MM é a massa molar do óleo vegetal

(g/mol), m é a massa da amostra (g) coletada e f é a fração de óleo no início da reação (m de óleo/massa total do sistema).

3.4.5.2 Efeito da concentração de extrato sólido de mamona

Estudou-se a influência de 2, 4 e 6% m/m de enzima sobre a hidrólise dos óleos de soja e de macaúba. O meio racional foi preparado contendo 90 g tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5, 10 g de óleo vegetal e o extrato sólido de mamona. Os ensaios da influência da concentração de catalisador foram realizados em bateladas a 37 °C, sob agitação mecânica constante de 1.000 rpm ao longo de um período máximo de 12 horas.

3.4.5.3 Efeito do meio reacional

A hidrólise dos óleos de soja e de macaúba catalisada pela lipase de mamona foi realizada em meios reacionais com pH na região de 4,0 a 5,0. Avaliou-se o efeito do meio reacional utilizado, sendo a hidrólise realizada nas condições descritas no item 3.3.5.1 onde água destilada ou tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 ou solução de NaCl 100 mM foram empregadas como solvente. Após a homogeneização do meio reacional, o pH do meio foi ajustado para 4,5 pela adição de algumas gotas de HCl 3M.

3.4.5.4 Efeito da concentração de substrato

O efeito da concentração de substrato foi estudado em ensaios realizados em bateladas a 37 °C, agitação de 1.000 rpm, mantendo-se fixo o volume de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 (50 mL) e de enzima (500 mg), sendo a hidrólise acompanhada pelo índice de acidez do meio reacional sob diferentes concentrações de substrato (10 – 323,5 g/L), com amostras coletadas em intervalos regulares ao longo de 30 minutos de reação.

Na avaliação dos parâmetros cinéticos foi realizado um ajuste não linear do modelo de inibição pelo substrato (Equação 3.6). O ajuste da equação e estimativa dos parâmetros cinéticos $V_{Máx}$, K_M e K_I foram realizados utilizando o software OriginPro 9[®] (Northampton, EUA), empregando um algoritmo de interação não linear pelo modelo de Levenberg Marquadt.

$$V = \frac{V_{Máx} \times [S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}} \quad (3.6)$$

Onde V é a velocidade ($\mu\text{M}/\text{min}$), $V_{Máx}$ a velocidade máxima ($\mu\text{M}/\text{min}$), $[S]$ a concentração de substrato (mM); K_M é a constante de Michaelis-Menten (mM) e K_I a constante de inibição pelo substrato (mM).

3.4.6 Síntese de ésteres etílicos (biodiesel) via transesterificação

Ésteres etílicos foram produzidos por reação de transesterificação de óleo vegetal e etanol catalisada pelo extrato sólido de mamona, em meio isento de solvente. As reações empregaram as relações molares óleo:etanol 1:3, 1:5, 1:7 e 1:9 nas temperaturas de 37 e 50 °C. A relação mássica de enzima/substrato foi fixada em 10% (m/v). O meio reacional foi incubado sob agitação (300 rpm) e temperatura constante por um período de 24h.

As amostras coletadas foram centrifugadas por 5 min a 10.000 rpm a 4 °C, os sobrenadantes foram transferidos para microtubos e os *pellets* descartados. Os sobrenadantes foram purificados com lavagens consecutivas de água quente (98 °C), sendo então mantidos a 70 °C para evaporação da água residual. As amostras purificadas (50 mg) foram diluídas em 1 mL de solução de heptadecanoato de metila (10 mg/mL). Os ésteres etílicos formados na reação foram analisados por cromatografia gasosa conforme metodologia descrita no item 3.2.6.

3.4.7 Síntese de biodiesel via hidroesterificação

3.4.7.1 Reação de hidrólise

A hidrólise dos óleos vegetais foi realizada seguindo a metodologia descrita por AVELAR et al. (2013), com modificações. A hidrólise foi realizada em reatores encamisados de 200 mL contendo 15 g de óleo vegetal, 100 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 e 4 g de ESM. A mistura foi mantida sob agitação mecânica constante de 1.000 rpm, por um período máximo de 12 horas. O avanço da reação foi acompanhado seguindo o procedimento descrito no item 3.3.5.1

Os ácidos graxos liberados (AGL) na hidrólise foram extraídos segundo a metodologia descrita por AGUIEIRAS et al. (2014). Ao meio reacional foi adicionado hexano em uma proporção 1:1 v/v e, após agitação vigorosa, centrifugado a 6.000 rpm por 20 minutos a 25 °C. Os ácidos graxos foram concentrados em rotaevaporador e, após a adição de sulfato de sódio anidro para a remoção de resíduos de água (1 g por amostra), filtrados e mantidos em estufa (70 °C) para evaporação de água residual.

3.4.7.2 Reação de esterificação

Inicialmente, foi realizado um experimento preliminar com as lipases de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) e lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF), ambas comerciais e já imobilizadas em resina epóxi. O meio reacional contendo 8 de AGL de soja e 1,69 mL de etanol anidro (relação equimolar AGL de soja:etanol anidro) foi mantido sob agitação (300 rpm), e após atingir a temperatura de 37 °C, 0,16g de catalisador foi adicionado ao sistema. Foram realizados ensaios de esterificação em batelada em meio isento de solvente ao longo de 8 horas.

Ao término deste período, 500 µL do meio reacional foi transferido para um microtubo e centrifugado a 10.000 rpm a 4°C por 5 minutos. Em seguida, 200 µL do sobrenadante centrifugado foram adicionados a 600 µL de água destilada quente (98 °C) e 600 µL de n-hexano para a extração dos ésteres produzidos. Após agitação vigorosa, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 10.000 rpm a 25 °C e os sobrenadantes transferidos para microtubos e a fase aquosa descartada. Os

sobrenadantes purificados foram mantidos a 70 °C em estufa para a evaporação do hexano de extração. O teor de ésteres foi avaliado por cromatografia gasosa, conforme descrito no item 3.2.6.

As reações posteriores de esterificação dos AGL foram realizadas em bateladas catalisadas pela lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL). As condições reacionais foram avaliadas em bateladas separadas, tendo a conversão como variável determinante. Inicialmente, verificou-se a influência da relação molar AGL:etanol (1:1, 1:2 e 1:3) a 37 °C, 300 rpm e 0,16 g de catalisador (258 U_{TBU}/g de AGL). Em seguida, avaliou-se o efeito da temperatura (25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C) sobre a conversão em ésteres. O tempo de reação máximo foi de 8 horas, sendo amostras coletadas ao longo da reação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Uma vez determinadas as melhores condições, a esterificação foi realizada em reator encamisado nas condições de 30 °C, 500 rpm de agitação, razão molar 1:1 (AGL:etanol) e 0,04g de enzima/g de substrato (517 U_{TBU}/g de substrato). A reação foi conduzida por um período máximo de 12 horas, sendo amostras coletadas ao longo do período reacional. O teor de ésteres nas amostras foi determinado por cromatografia gasosa conforme metodologia descrita no item 3.2.6, sendo as amostras submetidas ao tratamento prévio descrito anteriormente.

3.4.8 Síntese de suportes magnéticos (SMMp)

A síntese dos suportes magnéticos foi realizada conforme descrito por KOPP (2013). Em um reator encamisado, foram adicionados 200 mL de uma solução de FeCl₃.6H₂O 350 mM e 200 mL de solução de FeCl₂.4H₂O 200 mM. Uma vez homogeneizado o meio reacional, foram adicionados 50 mL de NH₄OH. O sistema reacional foi agitado a 60 °C e 1.000 rpm por 1 hora. As nanopartículas formadas foram recuperadas magneticamente e lavadas com água destilada em abundância, e armazenadas ainda úmidas para a etapa de recobrimento.

As nanopartículas sintetizadas foram recobertas com sílica a fim de formarem micropartículas magnéticas (SMMp), seguindo o protocolo também descrito por KOPP (2013). Para a síntese, foram preparadas duas soluções distintas A e B. A solução A foi preparada pela adição de 40 mL de solução de Na₂SiO₃ 0,5 M

e 10 mL de Triton-X 100 em 140 mL de ciclohexano. A solução B foi preparada contendo 40 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 M e 10 mL de Triton-X 100 misturados a 140 mL de ciclohexano. Uma massa de 15 g de nanopartículas úmidas foram adicionadas ao reator contendo a solução A, e após homogeneização, a solução B foi cuidadosamente adicionada ao reator. O sistema foi mantido sob agitação vigorosa (1.000 rpm) a 25 °C por 1 hora. As micropartículas magnéticas recobertas foram então separadas magneticamente e lavadas repetidas vezes com solução acetona/etanol (1:1 v/v), sendo então lavada exaustivamente com água destilada. Após as etapas de lavagem, as SMMp foram incubadas em solução HCl 0,5 M a 25 °C por 12 horas e, após a separação magnética, lavadas com água destilada e armazenadas para uso futuro.

3.4.9 Ativação das SMMps com grupos octil

As SMMps preparadas anteriormente foram submetidas a um processo de recobrimento da superfície com grupos octil. Neste processo, 1 g de SMMp seco foi transferido para um balão de fundo redondo contendo 25 mL de trimetoxi(octil)silano 1,0 mM dissolvido em tolueno. A suspensão foi mantida a 110 °C sob refluxo por um período de 5 horas. Ao término da reação, as SMMps ativadas com grupos octil foram separadas magneticamente, lavadas primeiramente com acetona, seguido por repetidas lavagens com água destilada e então secas a 60 °C em estufa.

3.4.10 Ativação das SMMps com grupos amino

A ativação das SMMps com grupos amino foi realizada seguindo o mesmo protocolo aplicado para a ativação com grupos octil. Um grama de SMMp seco foi transferido para um balão de fundo redondo contendo 25 mL de (3-aminopropil)triétoxissilano 0,1, 0,25, 0,5 e 1,0 mM dissolvido em tolueno. A suspensão foi mantida a 110 °C sob refluxo por um período de 5 horas. Ao término da reação, as SMMps ativadas com grupos amino foram separadas magneticamente, lavadas com acetona e água destilada. Após as etapas de

lavagem, as SMMp amino foram incubadas em solução HCl 0,2 M a 25 °C por 12 horas e, após a separação magnética, lavadas com água destilada e secas a 70 °C em estufa.

3.4.11 Extração de lipase de mamona em fase aquosa

Em tubos cônicos de 50 mL foram adicionados 2,5 g de ESM e 25 mL de tampão (Tabela 3.2). Uma vez homogeneizada, a suspensão foi mantida sob agitação constante a temperatura ambiente por 12 horas. O material foi então centrifugado a 10.000 rpm a 4 °C por 10 minutos; o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o *pellet* ressuspendido em 10 mL de acetona e filtrado a vácuo. As atividades lipolíticas da suspensão e do sobrenadante após centrifugação foram medidas em pela hidrólise da tributirina (item 3.2.3); e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (item 3.2.1).

Tabela 3.2 – Tampões empregados para extração de lipase de mamona. Extração realizada sob agitação constante a 25 °C.

Tampão	Força iônica	pH
Citrato de sódio	50 mM	4,0
Citrato de sódio	50 mM	5,0
Citrato-fosfato de sódio	50 mM	4,0
Citrato-fosfato de sódio	50 mM	5,0
Fosfato de sódio	50 mM	6,0
Fosfato de sódio	50 mM	7,0
Fosfato de sódio	50 mM	8,0
Carbonato-bicarbonato de sódio	50 mM	9,0
Carbonato-bicarbonato de sódio	50 mM	10,0

3.4.12 Diálise

A solução contendo a lipase de mamona extraída do ESM foi dialisada em membrana de acetato de celulose (Sigma-Aldrich, St. Louis-EUA) em água ultrapura gelada (4 °C) com trocas de água a cada 6 horas, por um período de 24 horas.

3.4.13 Adsorção em suportes porosos

A lipase extraída em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 50 mM, pH 9,0 foi adsorvida nos suportes Streamline SP XL, SMMp octil e SMMp amino na relação suporte:solução enzimática 1:10 (m:v), conforme metodologia descrita por BASTIDA et al. (1998). As atividades lipolíticas do derivado e do sobrenadante e a concentração de proteínas do sobrenadante foram determinadas segundo as metodologias descritas nos itens 3.2.4 e 3.2.1, respectivamente.

Inicialmente, os suportes foram submetidos a um pré-tratamento, de acordo com o suporte e as condições reacionais empregadas na adsorção. O suporte SMMp amino foi mantido sob agitação constante a 4 °C em solução de HCl 0,1 M numa proporção suporte:HCl 1:10 (m/v) por 1 hora. Após essa etapa, as partículas do suporte foram lavadas com água destilada em excesso, filtradas a vácuo e reservadas. O suporte magnético SMMp octil foi hidratado em tampão de adsorção e mantido sob agitação constante a temperatura ambiente por 30 minutos; sendo as partículas separadas magneticamente ao término da hidratação.

A solução enzimática foi preparada pela diluição do tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,5 na solução enzimática dialisada, resultando em solução de lipase 10 mM, pH 4,5. A adsorção da lipase nos suportes foi realizada em frascos fechados contendo 10 mL de solução enzimática e 1g de partículas úmidas. Os sistemas foram incubados em temperatura ambiente, sob agitação constante em agitador orbital de movimento tridimensional (60 rpm) por 14 horas. Ao término, as partículas foram separadas (filtradas a vácuo ou separadas magneticamente) e transferidas para microtubos plásticos; os sobrenadantes foram armazenados em tubos de fundo cônico. Tanto no início como no término dos ensaios de adsorção mediu-se a concentração de proteínas no sobrenadante (item 3.2.1), assim como a atividade hidrolítica nos derivados obtidos pela hidrólise da tributirina e do *p*-NPB (itens 3.2.3 e 3.2.4, respectivamente).

3.4.14 Dessorção do suporte

As proteínas adsorvidas nos suportes foram dessorvidas a fim de avaliar a purificação da lipase de mamona. As condições e soluções utilizadas

variaram de acordo com o suporte utilizado, conforme alistado Tabela 3.3. Os ensaios foram realizados em tubo de fundo cônico de 15 ml contendo 300 mg de suporte com enzima adsorvida e solução eluente (10 mL de eluente/g de suporte). As atividades lipolíticas do derivado e do sobrenadante e a concentração de proteínas do sobrenadante foram determinadas segundo as metodologias descritas nos itens 3.2.4 e 3.2.1, respectivamente.

Tabela 3.3 - Condições empregadas na dessorção da lipase de mamona dos suportes.

Suporte	Solução de dessorção	Temperatura (°C)	Tempo (h)
SMMp Octil	SDS 20 mM	25	1,5
Streamline SP XL	NaCl 5M	25	1,5
SMMp-Amino	NaCl 5M	25	1,5

Os suportes imersos na solução de dessorção foram mantidos sob agitação constante em *shaker* (60 rpm) em temperatura ambiente. Ao término desse período, as partículas foram separadas do sobrenadante (filtradas a vácuo ou separadas magneticamente) e transferidas para microtubos plásticos e os sobrenadantes transferidos para tubos de fundo cônico. Os sobrenadantes cuja solução de dessorção continha SDS foram submetidos a uma etapa de diálise a fim de remover o surfactante da solução.

3.4.15 Eletroforese SDS-PAGE

As proteínas extraídas em solução, assim como os sobrenadantes dos ensaios de adsorção foram avaliados por eletroforese SDS-PAGE (gel poliacrilamida 10%) seguindo as condições desnaturantes descritas por LAEMMLI (1970) em sistema MiniProtean (Bio-Rad).

O gel de poliacrilamida 12% (m/v) (gel de separação) foi preparado utilizando 3,3 mL de solução de acrilamida-bisacrilamida 10% (m/v), 2,5 mL de tampão de separação (1,5 M Tris-HCL, pH 8,8), 50 µL de solução SDS 10% (m/v), 4,1 mL de água Milli-Q, 10 µL de TEMED (tetrametiletilenodiamina) e 100 µL de PSA (persulfato de amônia) 10% (m/v). A solução foi então cuidadosamente inserida entre as placas de eletroforese, restando aproximadamente 1 cm livre na

extremidade superior, onde foi gotejado 100 μ L de isopropanol a fim de nivelar o gel e evitar contato deste com o ar. Enquanto ocorria a polimerização do gel, preparou-se o gel de poliacrilamida 4% (m/v) (gel de empilhamento) contendo 0,65 mL de solução de acrilamida-bisacrilamida 10%, 1,25 mL de tampão de empilhamento (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8), 50 μ L de solução SDS 10% (m/v), 3,05 mL de água ultrapura, 10 μ L de TEMED (tetrametiletilenodiamina) e 50 μ L de PSA (persulfato de amônio) 10% (m/v). Após a remoção do isopropanol do gel de separação, completou-se o espaço entre as placas de eletroforese com a solução de empilhamento, deixando o sistema em repouso para a polimerização do gel de empilhamento. Amostras das soluções enzimáticas (15 μ L) foram aquecidas (98 °C) por 5 min em tampão de ruptura (Tris-HCl 75 mM, β -mercaptoetanol 5% (v/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,01% (v/v), pH 6,8) e aplicadas em canaletas pré-formadas no gel de empilhamento. Para os derivados, 50 mg foram suspensos em 50 μ L de tampão de ruptura e aquecidos (98 °C) por 5 min, sendo 20 μ L do sobrenadante aplicado ao gel.

A corrida do gel foi realizada por 90 minutos a uma tensão de 160 V em cuba de eletroforese vertical, conectada a uma fonte de alimentação (Power PAC 1.000, BIORAD-USA) contendo tampão de corrida (Tris base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% m/v, pH 8,3). As massas moleculares das enzimas presentes nas amostras foram determinadas utilizando marcador molecular Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit (GE Healthcare, Inglaterra), na faixa 97 a 14.4 kDa. Após as corridas das amostras, o gel foi corado por 30 minutos em uma solução contendo 0,25% de *Coomassie Blue Brilliant G-250* (m/v), 5% etanol e 1% de ácido acético (v/v); e descorado com uma solução de 30% etanol e 10% ácido acético (v/v) por 1 hora.

3.4.16 Cálculo do rendimento de adsorção em termos de proteína extraída em solução

A porcentagem de proteína adsorvida (P_{Ads}) foi calculada de acordo com a Equação 3.7, em que P_0 é a quantidade de proteínas (mg) no início da adsorção, P_f é a quantidade de proteínas presentes no sobrenadante ao término da adsorção.

$$P_{\text{Ads}} (\%) = \frac{P_0 - P_f}{P_0} \times 100 \quad (3.7)$$

3.4.17 Cálculo do rendimento de adsorção em termos de atividade da lipase de mamona

O rendimento de adsorção (R_{Ads}) foi determinado considerando a diferença entre a atividade no início determinada pela hidrólise do *p*-NPB (U_0) e a atividade no final do ensaio (U_f), de acordo com a Equação 3.8.

$$R_{\text{Ads}} (\%) = \frac{U_0 - U_f}{U_0} \times 100 \quad (3.8)$$

3.4.18 Cálculo da atividade recuperada da lipase de mamona

A atividade recuperada (A_{Rec}) foi calculada após a determinação da atividade da enzima adsorvida no suporte (U_{Der}) pela hidrólise do *p*-NPB, comparando-a com a atividade da enzima teoricamente adsorvida (U_t), conforme apresentado na Equação 3.9.

$$A_{\text{Rec}} (\%) = \frac{U_{\text{Der}}}{U_t} \times 100 \quad (3.9)$$

Em que U_t é a atividade teoricamente adsorvida, que representa a atividade esperada para a enzima adsorvida no suporte, calculada considerando a fração imobilizada do total de atividade presente no ensaio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo comparar a produção de ésteres etílicos (biodiesel) pelas rotas de transesterificação e hidroesterificação, empregando óleo de soja e de castanha de macaúba como fonte lipídica, utilizando como catalisador lipase de mamona. A fim de alcançar este objetivo, foram executadas as seguintes etapas experimentais:

- i. Obtenção do extrato sólido de mamona: definição do melhor protocolo para extração da lipase, a partir de sementes dormentes.
- ii. Caracterização cinética da enzima visando seleção da rota reacional e escolha das condições de reação:
 - Atividade hidrolítica frente a diferentes substratos, atividade de esterificação e de transesterificação,
 - Estabilidade térmica,
 - Estabilidade na presença de solvente orgânico (etanol).
- iii. Estudo cinético das hidrólises do óleo de soja e de macaúba, catalisadas pela lipase de mamona:
 - Influência da concentração de enzima,
 - Influência da temperatura,
 - Influência da presença de sais no meio,
 - Influência da concentração de substrato,
 - Estimativa dos parâmetros cinéticos $V_{Máx}$ e K_M .
- iv. Estudo das condições adequadas de temperatura e razão molar álcool:óleo/ácidos graxos para a produção de biodiesel empregando rotas de transesterificação e hidroesterificação.
- v. Avaliou-se comparativamente a produção de biodiesel obtido pelas rotas de transesterificação e hidroesterificação.
- vi. Estudo preliminar de purificação de lipase de ESM
 - Influência do pH no rendimento e na seletividade da extração de lipase
 - Adsorção da enzima em suportes hidrofóbicos e iônicos

4.2 Produção de extrato sólido de mamona

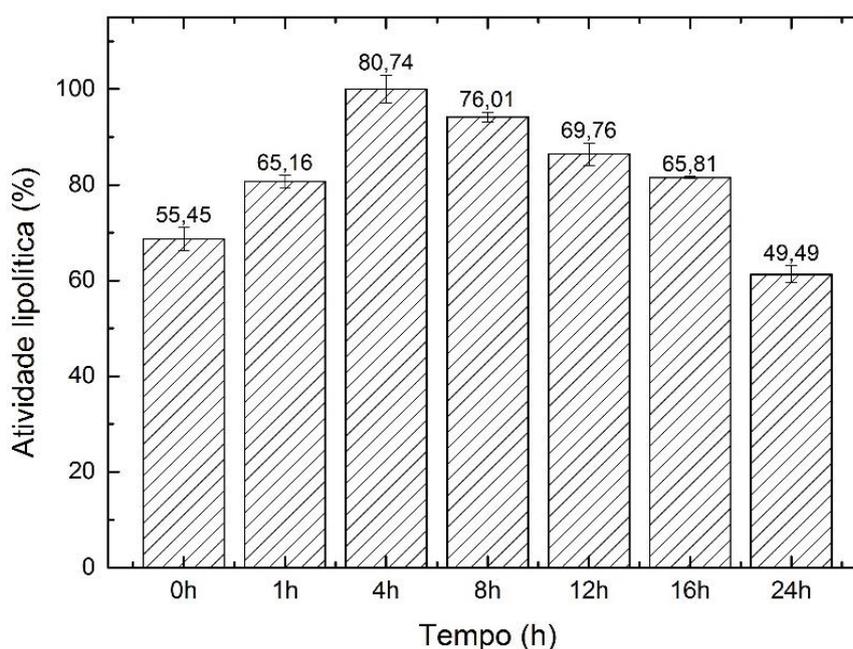
Por se tratar de uma oleaginosa, a mamona possui um elevado teor de óleo em sua constituição: 40 – 50% em massa do grão (SANTOS, 2010). Uma etapa essencial para a aplicação da lipase de mamona como biocatalisador em processos químicos é a extração do material graxo (triacilgliceróis e ácidos graxos livres), especialmente visando algumas reações de síntese, tais como na área de química fina e de produtos farmacêuticos (SETH et al., 2014). Desta forma, a remoção dos lipídeos presentes no interior das sementes sem perda de atividade catalítica representa uma etapa crucial no preparo do extrato de sementes de mamona.

Diversos fatores podem afetar direta ou indiretamente a atividade da lipase presente no interior das sementes, tais como natureza do solvente utilizado na etapa de extração do óleo, tempo de exposição a este e temperatura de incubação. Devido à natureza hidrofóbica do material graxo no interior das sementes, o uso de solventes apolares ou de polaridade moderada, tais como éter de petróleo, acetona, etanol, butanol e n-hexano mostram-se mais eficazes que soluções aquosas. SAGIROGLU; ARABACI (2005) e PIEROZAN et al. (2009) avaliaram a aplicação de tais solventes no preparo de extratos de sementes de girassol e trigo, respectivamente, e ambos concluíram que acetona mostrou ser o melhor solvente por não ocasionar perda significativa de atividade, remover efetivamente o material graxo e evaporar rapidamente à temperatura ambiente. Assim, neste trabalho, acetona foi escolhida como solvente para a remoção de óleo das sementes de mamona.

Endospermas de sementes de mamona isentos de casca foram processados seguindo metodologia descrita por (AVELAR et al., 2013), e incubadas em acetona. Primeiramente foi investigada a influência do tempo de incubação sobre a atividade lipolítica final do extrato sólido. Conforme observado na Figura 4.1 há um aumento da atividade lipolítica com o passar das primeiras horas de incubação, alcançando máxima atividade hidrolítica em 4 horas (80,74 U_{TBU}), passando a diminuir gradativamente com o passar do tempo. O principal objetivo desta etapa de incubação de sementes de mamona trituradas é a remoção de lipídios, que passam para a fase orgânica. Desta forma, a incubação em acetona diminui a concentração de lipídeos no extrato bruto aumentando a concentração relativa de carboidratos e proteínas, dentre as quais estão as lipases, conseqüentemente, aumentando a

atividade lipolítica por grama de extrato sólido. Todavia, observa-se uma redução gradativa da atividade lipolítica conforme o tempo de incubação aumenta, indicando a inativação da enzima pela ação da acetona que remove a camada de hidratação da enzima, ocasionando a perda de sua estrutura terciária e conseqüentemente sua atividade catalítica. Com base nesse experimento, adotou-se 4 horas como tempo ideal de incubação em acetona.

Figura 4.1 – Influência do tempo de incubação em acetona sobre a atividade lipolítica de extrato bruto de mamona. Atividade determinada por hidrólise de tributirina em tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,5 a 37 °C. Os valores no topo das colunas correspondem ao valor absoluto de atividade, em U_{TBU}/g . Os ensaios foram realizados em triplicata.



O extrato sólido preparado pela metodologia deste trabalho apresenta uma sistematização no preparo do ESM em relação aos estudos realizados pelos demais autores (AGUIEIRAS et al., 2014; AVELAR et al., 2013; BRESSANI et al., 2014; PIEROZAN et al., 2009; SANTOS et al., 2013). A Tabela 4.1 apresenta os resultados obtidos neste trabalho e demais trabalhos reportados pela literatura. Nota-se que a atividade de hidrólise de tributirina foi inferior àquelas obtidas por AGUIEIRAS et al. (2014) e CAVALCANTI-OLIVEIRA et al. (2010). Porém, embora o substrato utilizado seja o mesmo, o meio reacional testado por estes autores contém o tensoativo Triton X-100 que influencia positivamente o desempenho da enzima. No presente estudo, foi empregado goma arábica como agente de emulsificação para a preparação do substrato (exceto na hidrólise da tributirina), conforme metodologia

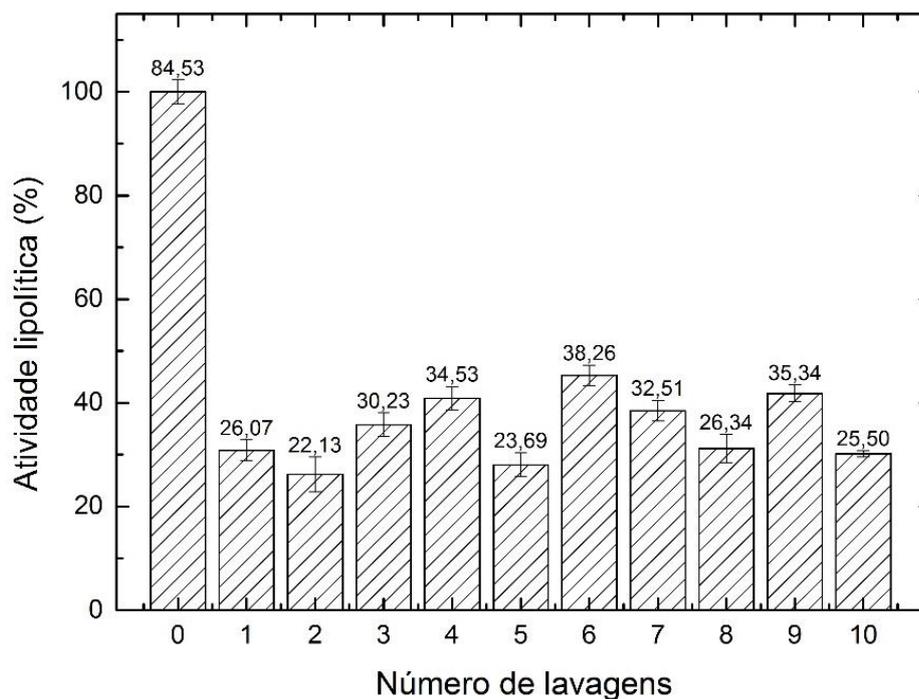
previamente estabelecida em trabalhos anteriores (LIMA et al., 2015; MENDES et al., 2012). Por se tratar de um biocatalisador obtido a partir de um produto natural, a atividade da lipase presente no microambiente do catalisador é passível de variações, devido a inúmeros fatores que vão desde a variedade de semente utilizada, às condições de cultivo da mamoneira, armazenamento de grãos e do próprio preparo do ESM.

Tabela 4.1 – Comparativo da atividade de extrato sólido de lipase de mamona frente a diferentes substratos.

Atividade de hidrólise		
Autor	U_{TBU}/g	U_{azeite}/g
AGUIEIRAS et al. (2014)	312	---
AVELAR et al. (2013)	---	$61,1 \pm 4,5$
CAVALCANTI-OLIVEIRA et al. (2010)	811 ± 54	28 ± 3
Presente estudo	$84,71 \pm 7,79$	$214,09 \pm 6,28$

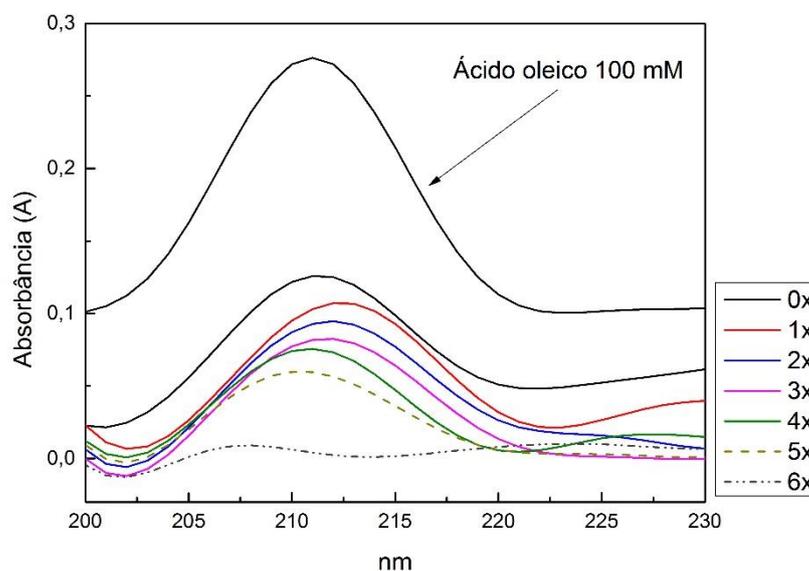
Em um experimento posterior, foi verificado o efeito do número de lavagens com acetona sobre a atividade hidrolítica da lipase. Embora o período de incubação seja eficiente para a remoção da maior parte do material graxo, lavagens subsequentes com acetona podem ser necessárias para a remoção total dos lipídeos residuais. A Figura 4.2 apresenta o comportamento da atividade da lipase em função do número de lavagens efetuado. A primeira lavagem após a incubação por 4 horas resulta em uma redução significativa da atividade do extrato bruto de mamona. É provável que além de ácidos graxos, a acetona remova a camada de hidratação da enzima. Lipases atuam na interface água-óleo, de modo que uma quantidade mínima de água é necessária para manter a atividade catalítica e a integridade estrutural da enzima (YAN et al., 2014).

Figura 4.2 – Influência do número de lavagens a atividade hidrolítica de extrato sólido de mamona. Atividade determinada pela hidrólise de tributirina em tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,5 a 37 °C. Os valores no topo das colunas correspondem ao valor absoluto de atividade, em U_{TBU}/g . Os ensaios foram realizados em triplicata.



Embora lipídeos apresentem fraca absorção quando expostos à radiação UV, é possível analisá-los em comprimentos de onda de 200 – 210 nm, em virtude da presença de ligações duplas e grupos funcionais como carbonila e carboxila (GUNSTONE; HARWOOD; DIJKSTRA, 2007). Qualitativamente, amostras de acetona de cada lavagem aplicada ao extrato bruto passaram por uma varredura em espectrofotômetro a fim de verificar a possível remoção de material graxo residual. A título de comparação, foi avaliado também uma solução de ácido oleico 100 mM nas mesmas condições das amostras de lavagem. A Figura 4.3 apresenta os espectros obtidos.

Figura 4.3 – Espectros de varredura das acetonas de lavagem do extrato sólido de mamona e solução de ácido oleico 100 mM.



A partir dos espectros, observa-se que após o período de incubação inicial por 4 horas, a concentração de ácidos graxos remanescentes é baixa. Esta concentração reduz conforme mais lavagens são aplicadas ao extrato bruto, chegando a ser desprezível na décima lavagem. Embora as lavagens posteriores à incubação sejam eficazes na remoção de ácidos graxos residuais, estas ocasionam uma perda de atividade lipolítica considerável. Conseqüentemente, a utilização desta etapa só é justificada quando a presença de ácidos graxos, mesmo que em baixas concentrações, interfira nas condições do processo (ex. geração de produtos indesejáveis durante algum processo de síntese).

4.3 Determinação da atividade lipolítica do extrato sólido de mamona

A aplicação de extrato enzimático sólido de sementes dormentes de mamona como biocatalisador em processos biotecnológicos é bastante interessante devido ao fato de apresentar atividade máxima em valores ácidos de pH (BARROS et al., 2010; VILLENEUVE, PIERRE, 2003), especialmente no que diz respeito à síntese de biodiesel a partir de óleos não refinados e residuais que apresentam elevada acidez.

Considerando as características da lipase de mamona como pH e temperatura de máxima atividade catalítica repostadas na literatura, verificou-se o

desempenho da atividade hidrolítica do extrato sólido de mamona frente a substratos com diferentes comprimentos de cadeia carbônica. Avaliou-se a capacidade da lipase em hidrolisar compostos de cadeia curta (tributirina) e de cadeia longa (azeite de oliva e óleo de castanha de macaúba). A Tabela 4.2 contém os valores de atividade de hidrólise (velocidades iniciais) determinados pela hidrólise da tributirina, azeite de oliva e óleo de macaúba. Todos os ensaios utilizaram a mesma massa de catalisador (0,1 g).

Tabela 4.2 – Atividades hidrolíticas do extrato sólido de mamona determinadas na hidrólise de tributirina, e do azeite de oliva e óleo de macaúba emulsificados com goma arábica. As reações foram realizadas em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5, 37 °C e 5 minutos de reação.

Atividade de hidrólise		
U_{TBU}/g	U_{azeite}/g	$U_{\text{macaúba}}/g$
84,71 ± 7,79	214,09 ± 6,28	226,99 ± 6,67

Dentre os substratos avaliados, pode-se observar atividades similares quando empregados óleo de macaúba e de oliva são empregados, quase 3 vezes maior do que a atividade hidrolítica expressa para tributirina. Esses resultados demonstram maior afinidade da enzima por substratos contendo ácidos graxos de cadeia longa, semelhantes ao óleo de mamona (substrato natural da lipase de mamona) que possui um elevado teor (aproximadamente 90%) de ácido ricinoleico, cuja cadeia carbônica possui 18 carbonos (BARROS et al., 2010; BERGMANN et al., 2013).

4.4 Atividade sintética do extrato sólido de mamona

Lipases naturalmente catalisam a reação de hidrólise em meio aquoso. Em meio orgânico, algumas lipases são capazes de realizar reações de transesterificação (alcóólise), esterificação e interesterificação (CASTRO et al., 2004; RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). A atividade catalítica de lipases na síntese de ésteres é interessante do ponto de vista industrial, uma vez que estes podem ser utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica (SOETAERT; VANDAMME, 2010).

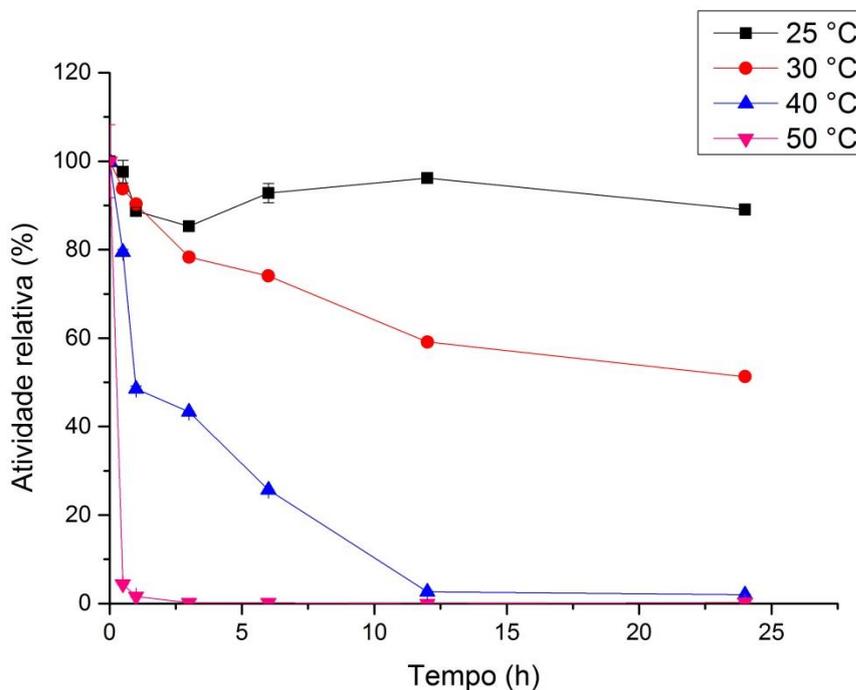
A lipase de mamona já por algum tempo tem sido alvo de estudo, sendo considerada como um catalisador em potencial nas reações de hidrólise e síntese (VILLENEUVE, PIERRE, 2003). TÜTER (1998) estudou a aplicação da lipase de mamona na esterificação de ácidos graxos e glicerol para a síntese de triacilgliceróis. VILLENEUVE et al. (2005) utilizaram uma variação do extrato sólido de mamona na esterificação de ácido oleico e fitoesteróis de canola. No entanto, trabalhos aplicando a lipase de mamona em reações de esterificação são escassos na literatura. Neste contexto, o desempenho da lipase de mamona em reação de esterificação em meio orgânico foi investigado na síntese de butirato de butila, um aroma com grande potencial industrial (aroma de fruta).

A síntese do éster foi realizada por esterificação de ácido butanoico e butanol (razão molar 1:1) a 37 °C em n-heptano ao longo de 1 hora de reação. A atividade de esterificação foi determinada pela relação de consumo de 1-butanol e de butirato de butila formado, quantificado via cromatografia gasosa. A fim de avaliar a atividade de esterificação empregando um ácido de cadeia longa, realizou-se um ensaio de esterificação de ácido oleico e butanol (razão molar 1:1) em heptano nas mesmas condições descritas anteriormente. Não foi detectada atividade de esterificação, independente do comprimento da cadeia do substrato, sendo nula em ambos os casos. Uma das prováveis explicações para esses resultados pode ser a baixa estabilidade da lipase na presença solventes orgânicos no meio reacional, que pode atuar como agente desnaturante da enzima ocasionando sua permanente inativação. Este fato também explica a baixa tolerância da enzima durante o processo de incubação e lavagem com acetona.

4.5 Estabilidade térmica do extrato sólido de mamona

Verificou-se a estabilidade do extrato sólido de mamona em diferentes temperaturas ao longo de 24 horas. Neste estudo, a lipase foi incubada em meio aquoso nas temperaturas de 25, 30, 40 e 50 °C, como mostrado na Figura 4.4.

Figura 4.4 – Estabilidade térmica do extrato sólido de mamona incubado em tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,5 a 25, 30, 40 e 50 °C. A atividade catalítica foi determinada pela hidrólise da tributirina em tampão acetato 200 mM, pH 4,5 a 37°C. Os valores de atividade foram normalizados considerando a atividade em tempo 0h como 100%. Os ensaios foram realizados em triplicata.



Quando incubado a 50 °C, houve uma redução drástica da atividade do catalisador, resultando na inativação deste logo nos primeiros minutos de incubação. Nota-se também que quando mantido a 40 °C, a atividade do extrato reduz gradativamente, chegando a completa inativação em 24 horas. A 30 °C, a perda de atividade foi menos expressiva, uma vez que após 24 horas esta manteve pouco mais de 50% de sua atividade inicial. Observa-se que a 25 °C a enzima manteve sua atividade ao longo do ensaio, sendo a perda de atividade catalítica pouco significativa.

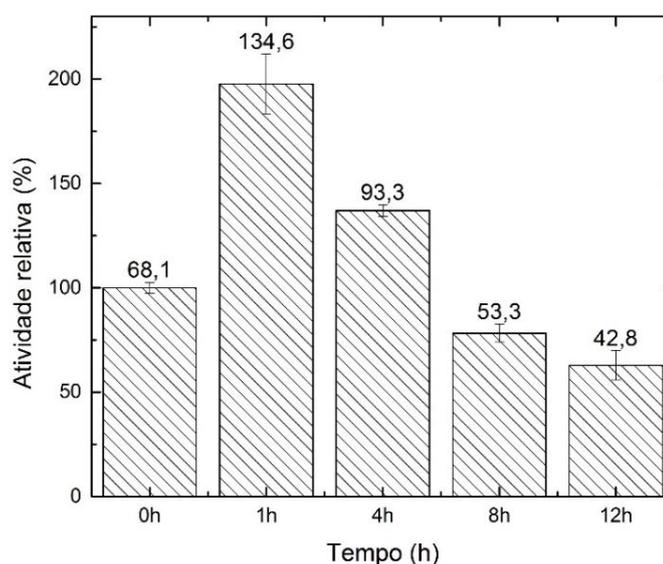
Esses resultados indicam que, embora se trate de um biocatalisador de baixo custo e elevada atividade hidrolítica, o extrato sólido de mamona possui baixa estabilidade em temperaturas muito superiores à temperatura ambiente, o que pode comprometer sua aplicação em processos longos e que exigem temperaturas mais elevadas. Uma possível estratégia para melhorar a estabilidade da lipase de mamona e permitir seu reuso seria a imobilização em suportes insolúveis (GUISAN, 2013).

4.6 Estabilidade do extrato sólido de mamona em mistura etanol-óleo

Um fenômeno muito comum verificado na síntese de biocombustíveis é a inativação do biocatalisador em virtude do extenso período de exposição a solventes orgânicos, como o etanol (BAADHE; POTUMARTHI; GUPTA, 2014; LAM et al., 2010). A aplicação da lipase de mamona em reações de síntese de biodiesel requer que a enzima seja estável na presença de álcool ao longo de todo o processo de síntese. Sendo assim, avaliou-se a estabilidade do extrato sólido de mamona incubado em condições semelhantes às empregadas nas reações de síntese de biodiesel.

A Figura 4.5 apresenta a estabilidade do extrato bruto de mamona em um meio reacional contendo uma mistura de óleo de soja e etanol em uma proporção molar de 1:3 a 25 °C, condição essa muito semelhante à empregada em experimentos de síntese de biodiesel. Nota-se inicialmente um aumento da atividade lipolítica presente no extrato bruto, especialmente na primeira hora de reação. Este aumento pode-se ser atribuído ao mecanismo característico de lipases, que na presença de moléculas hidrofóbicas sofrem uma modificação conformacional que resulta em uma maior exposição do sítio ativo da enzima (KAPOOR; GUPTA, 2012). Com o aumento do tempo de incubação, foi observada uma redução da atividade do biocatalisador.

Figura 4.5 – Estabilidade do ESM incubado em etanol-óleo de soja (relação molar de 1:3) a 25 °C. A atividade catalítica foi determinada pela hidrólise da tributirina em tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,5 a 37°C. Os valores de atividade foram normalizados considerando a atividade em tempo 0h como 100%, sendo os valores em U_{TBU}/g apresentado no topo de cada barra. Ensaio em triplicata.



Estes resultados poderiam ser atribuídos à presença de etanol no meio reacional, que embora seja um reagente essencial para a transesterificação, pode causar inativação enzimática, promovendo a remoção da camada de hidratação presente na enzima (BAJAJ et al., 2010). Estes resultados estão de acordo com aqueles previamente reportados para a síntese de ésteres por reação de esterificação empregando álcool de cadeia curta (VILLENEUVE, P. et al., 2005).

A inativação da lipase de mamona nas primeiras horas de reação devido a presença de etanol se apresenta como uma limitação da aplicação deste biocatalisador em diversas reações, especialmente as que visam a produção de biocombustíveis. A lipase de mamona realiza a hidrólise de triacilgliceróis em meio aquoso; diferentemente de outras lipases que são descritas como sendo capazes de catalisar reações de esterificação e transesterificação em meio orgânico. Assim sendo, seria necessário primeiramente estabilizar a lipase de mamona de forma que esta passe a tolerar altas concentrações de etanol requeridas no processo de síntese de biodiesel.

4.7 Produção de concentrados de ácidos graxos livres a partir de óleos vegetais catalisada por lipase de mamona: Otimização e estudos cinéticos

As reações de hidrólise do óleo de castanha de macaúba e de soja realizadas neste trabalho foram catalisadas pelo ESM. Neste estudo, foi avaliada a influência da concentração de catalisador, temperatura de reação, tempo de reação e sais na hidrólise do óleo de macaúba e de soja. A escolha destas variáveis foi baseada em estudos prévios reportados pela literatura na hidrólise de triacilgliceróis para a síntese de ácidos graxos concentrados (AVELAR et al., 2013; BRESSANI et al., 2014; SANTOS et al., 2013).

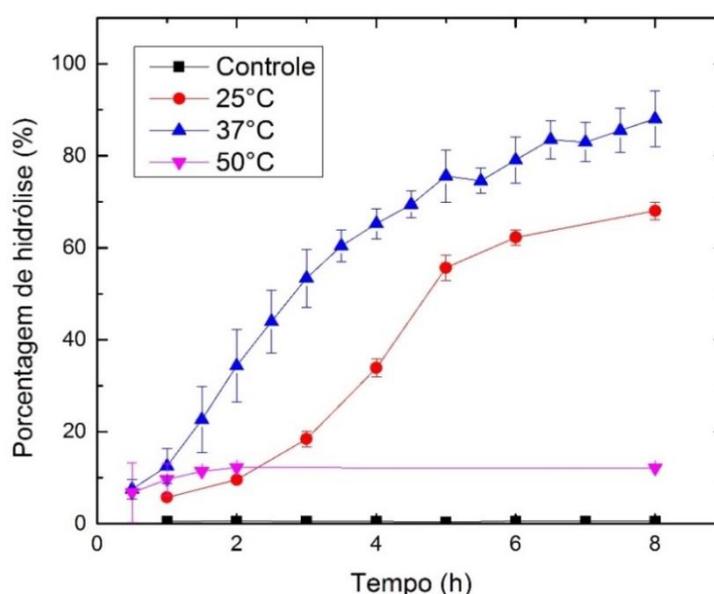
As reações de hidrólise realizadas no presente estudo foram conduzidas em reator tanque agitado (1.000 rpm). BRESSANI et al. (2014) verificaram que agitações superiores a 1.000 rpm não resultaram em um aumento da porcentagem de hidrólise do óleo de macaúba catalisada pelo ESM. A aplicação de agitações vigorosas para sistemas reacionais heterogêneos (fase líquida – meio de reação; e sólida – biocatalisador) reduz a resistência de transferência de massa externa e o efeito de coalescência (agregação por interações hidrofóbicas) das gotas

de óleo no meio reacional, o que aumenta a área superficial na interface óleo/água (maior formação de complexo enzima/substrato) e permite boa acessibilidade do substrato ao microambiente interno do biocatalisador (difusão interna). Conseqüentemente, todas as reações de hidrólise foram realizadas sob vigorosa agitação (1.000 rpm).

4.7.1 Efeito da temperatura

Primeiramente, verificou-se o efeito da temperatura sobre a hidrólise do óleo de soja. As reações foram realizadas a 25, 37 e 50 °C, sendo a porcentagem de hidrólise foi monitorada ao longo de 8 horas de reação em regime batelada. A quantidade de catalisador foi mantida fixa em 2% m/v, sendo oferecida uma carga de 74 U_{TBU}/g de ESM. As hidrólises foram realizadas em água destilada, com a correção do pH do meio para 4,5 pela adição de solução de HCl 3M. O efeito da temperatura de reação na hidrólise do óleo de soja é mostrado na Figura 4.6. Neste estudo, foi realizado um ensaio controle pela incubação do óleo de soja em água, sem a adição do catalisador. Nestas condições, não foi verificada a hidrólise do óleo.

Figura 4.6 – Hidrólise do óleo de soja catalisado pelo extrato sólido de lipase de mamona em água. Ensaios realizados a 25, 37 e 50 °C, sob agitação constante de 1.000 rpm; relação mássica óleo: água 1:9 (m/v). Os ensaios foram realizados em triplicata.



Como pode ser observado, o aumento da temperatura de reação de 25 para 37 °C aumentou consideravelmente a porcentagem de hidrólise do óleo de soja. Após 2 h de reação, a porcentagem de hidrólise a 37 °C foi aproximadamente 4 vezes maior ($53,4 \pm 6,3\%$) que a reação realizada a 25 °C (porcentagem de hidrólise = $18,4 \pm 1,7\%$). Após 8 h de reação, máxima porcentagem de hidrólise de 90 e 70% foi alcançada a 37 e 25 °C, respectivamente. Estes resultados podem ser creditados à maior atividade catalítica expressada pela enzima incubada a 37°C (maior número de colisões entre o biocatalisador e o substrato) ou às propriedades reológicas do meio reacional como a redução do tamanho das gotas de óleo pelo aumento da temperatura que aumenta a área de contato entre substrato e enzima. A redução do efeito de coalescência (agregação) de gotas de óleo na interface óleo/água pelo aumento da temperatura tem sido reportada por FLOURY; DESRUMAUX; LARDIÈRES (2000) e MCCLEMENTS; WEISS (2005). Além disso, a redução do tamanho das gotas de óleo na interface óleo/água pelo aumento da temperatura de reação reduz a viscosidade do meio de reação (FLOURY et al., 2000; PHUAH et al., 2012). Consequentemente, uma menor resistência à difusão (externa e interna) de moléculas de substrato do meio de reação ao microambiente do biocatalisador é esperada (PHUAH et al., 2012). O aumento da temperatura de reação de 37 a 50 °C reduziu drasticamente a porcentagem de hidrólise do óleo de soja devido à inativação do biocatalisador nas condições reacionais.

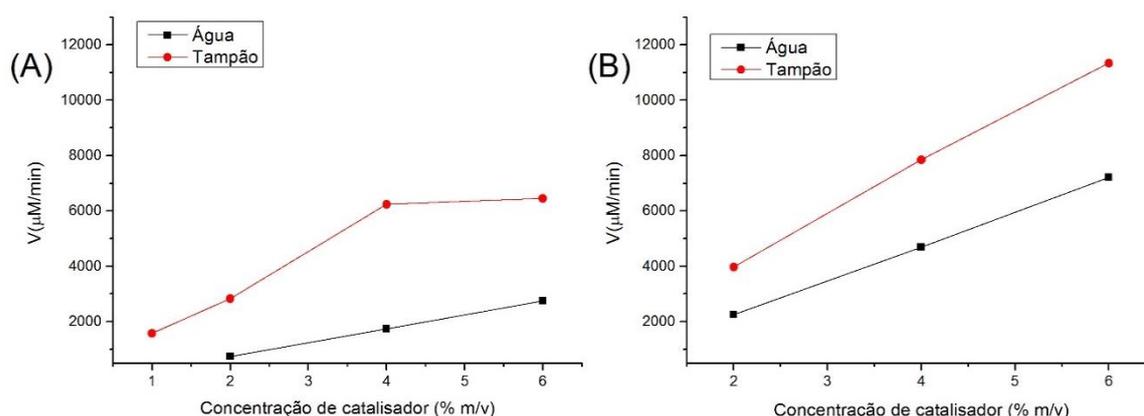
De acordo com estes resultados, foi selecionada a temperatura de 37 °C para subseqüentes estudos. CHOWDHURY; MITRA; BISWAS (2013) reportaram também similar porcentagem de hidrólise empregando óleo de soja residual (óleo de fritura) após 30 horas de reação a 30 °C, catalisada por lipase de *Candida rugosa*, uma preparação enzimática disponível comercialmente amplamente empregada na hidrólise de triacilgliceróis. Os resultados obtidos no presente estudo são promissores, uma vez que a mesma conversão foi atingida em um período quase 4 vezes inferior; empregando um catalisador de baixo custo e altamente ativo.

4.7.2 Efeito da concentração de catalisador

O efeito da concentração de catalisador (2–6% m/v) na velocidade inicial de reação (μM de AGL/min de reação) foi avaliado na hidrólise dos óleos de

macaúba e soja. As reações foram realizadas em reator tanque agitado (1.000 rpm) a 37 °C e pH 4,5 (tampão acetato de sódio 100 mM e ajustado com solução de HCl 3M). De acordo com a Figura 4.7 (A,B), o aumento da concentração de biocatalisador de 2 para 4% (m/v) aumentou consideravelmente os valores de velocidades iniciais de hidrólise, como esperado. Entretanto, o aumento da concentração de biocatalisador de 4 para 6% (m/v) não promoveu um aumento significativo da velocidade de reação, com exceção da reação de hidrólise do óleo de macaúba, que mostrou uma tendência linear com o aumento da concentração de enzima. Estes resultados mostram que nestas condições (concentração de biocatalisador de 4% m/v) houve a saturação do biocatalisador na interface óleo/água. Estes resultados são similares aqueles previamente reportados para a hidrólise do óleo de palma catalisada por lipase de *Candida rugosa* (LCR) em reator tanque agitado (AL-ZUHAIR; HASAN; RAMACHANDRAN, 2003). Estes autores mostraram que o aumento da concentração de LCR no meio de 100 a 250 g/m³ também não aumentou a velocidade da reação de hidrólise realizada a 800 e 1.000 rpm.

Figura 4.7 – Influência da concentração de catalisador sobre as velocidades iniciais da hidrólise do (A) óleo de soja (B) óleo de macaúba a 37 °C; realizadas em água destilada (preto) ajustada com HCL 3M e tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 (vermelho).



Além disso, é possível notar que os valores de velocidades iniciais exibidos pelo óleo de macaúba (triacilglicerol com alta concentração de ácidos graxos saturados e monoinsaturado) foram superiores aos do óleo de soja (triacilglicerol com alta concentração de ácidos graxos mono- e poli-insaturados). Estes resultados podem ser creditados pela alta especificidade da enzima na

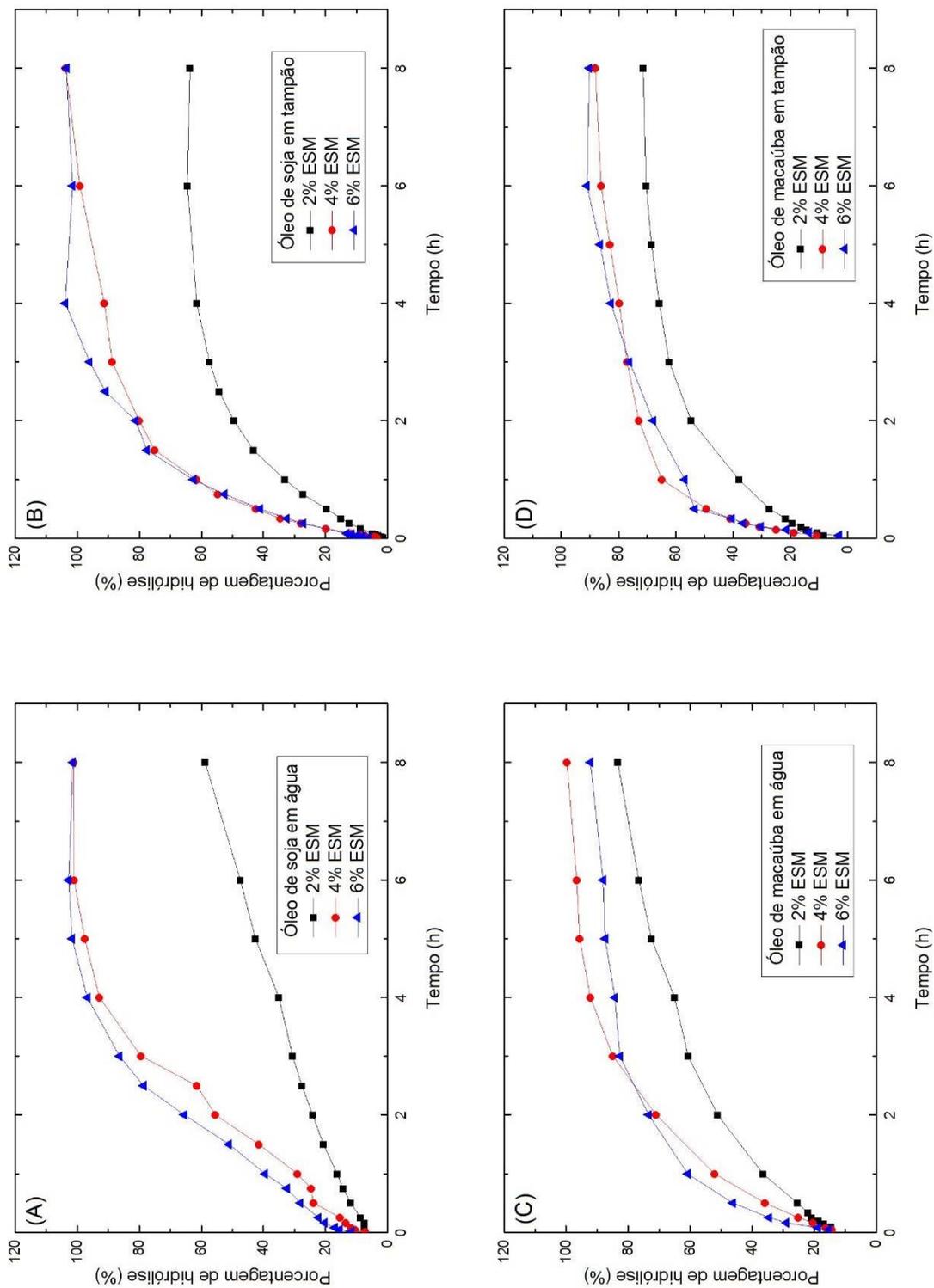
hidrólise de ligações éster de ácidos graxos saturados (ALTAF et al., 1997; EASTMOND, 2004). EASTMOND (2004) avaliou a especificidade da lipase de mamona na hidrólise de diferentes triacilgliceróis e máxima atividade hidrolítica foi observada na hidrólise de tricaprina (grupo acila C_{10:0}) e trilaurina (grupo acila C_{12:0}), seguido da hidrólise de tricinoleína (grupo acila C_{18:1-OH}), trilinoleína (grupo acila C_{18:2}) e trioleína (grupo acila C_{18:1}), o que confirma os resultados obtidos no presente estudo.

Neste estudo, foi também observada a influência de sais (meio de reação ajustado com solução de HCl e tampão acetato de sódio 100 mM) nas velocidades iniciais de reação, conforme também mostrado na Figura 4.7. Como pode ser observado, as reações realizadas em solução-tampão exibiram maior velocidade de reação, principalmente para as reações de hidrólise conduzidas a 4% m/v de biocatalisador. Nestas condições, a velocidade inicial da reação em meio tamponado foi aproximadamente 4 e 2 vezes maior do que aquelas realizadas em meio com pH ajustado (sem a adição de tampão) para o óleo de soja e macaúba, respectivamente. Uma possível justificativa deste comportamento está na presença de íons Na⁺ da solução tampão que atuam de forma positiva na atividade catalítica da enzima. SETH et al. (2014) reportaram que os íons Na⁺ e K⁺ atuam como cofator da lipase de mamona.

O efeito do tempo de reação na porcentagem de hidrólise dos óleos vegetais em pH 4,5 na ausência (pH do meio de reação ajustado inicialmente com solução de HCl 3M) e na presença de tampão acetato de sódio 100 mM empregando as três diferentes concentrações de biocatalisador (2, 4 e 6% m/v) é mostrado na Figura 4.8 (A–D). O aumento da concentração de biocatalisador de 2 para 4% (m/v) também aumentou a porcentagem de hidrólise dos óleos testados. É possível ainda observar que este aumento da concentração de biocatalisador na porcentagem de hidrólise foi mais significativo para o óleo de soja do que para o óleo de macaúba. A porcentagem de hidrólise dos óleos realizados a 2% (m/v) foi da ordem de 70-80% para o óleo de macaúba e da ordem de 60% para óleo de soja após 8 h de reação. Estes resultados confirmam a maior especificidade do biocatalisador na hidrólise de ligações éster do óleo de macaúba devido à maior concentração de ácidos graxos saturados e monoinsaturados em sua composição, como descrito anteriormente para a determinação das velocidades iniciais para cada substrato. As reações conduzidas na presença de 6% (m/v) não aumentaram a

porcentagem de hidrólise e apresentaram um perfil bastante similar aos obtidos para 4% (m/v) de biocatalisador, o que confirma os resultados obtidos de determinação dos valores de velocidades iniciais (ver Figura 4.7). A hidrólise total do óleo de soja foi alcançada após 6 h de reação empregando 4% (m/v) de biocatalisador. Para o óleo de macaúba, a máxima porcentagem de hidrólise foi ao redor de 90% nestas mesmas condições.

Figura 4.8 – Efeito da concentração de catalisador sobre a cinética de hidrólise do óleo de soja em (A) água destilada, (B) tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5; óleo de macaúba em (C) água destilada e (D) tampão acetato 100 mM, pH 4,5. As hidrólises realizadas em água destilada tiveram o pH corrigido para 4,5 pela adição de HCL 3M no início da reação. Experimentos realizados a 37 °C sob agitação constante de 1.000 rpm.



Baseado nesses resultados, a concentração de biocatalisador de 4% m/v foi selecionada para dar prosseguimento nos testes de produção de concentrados de AGL.

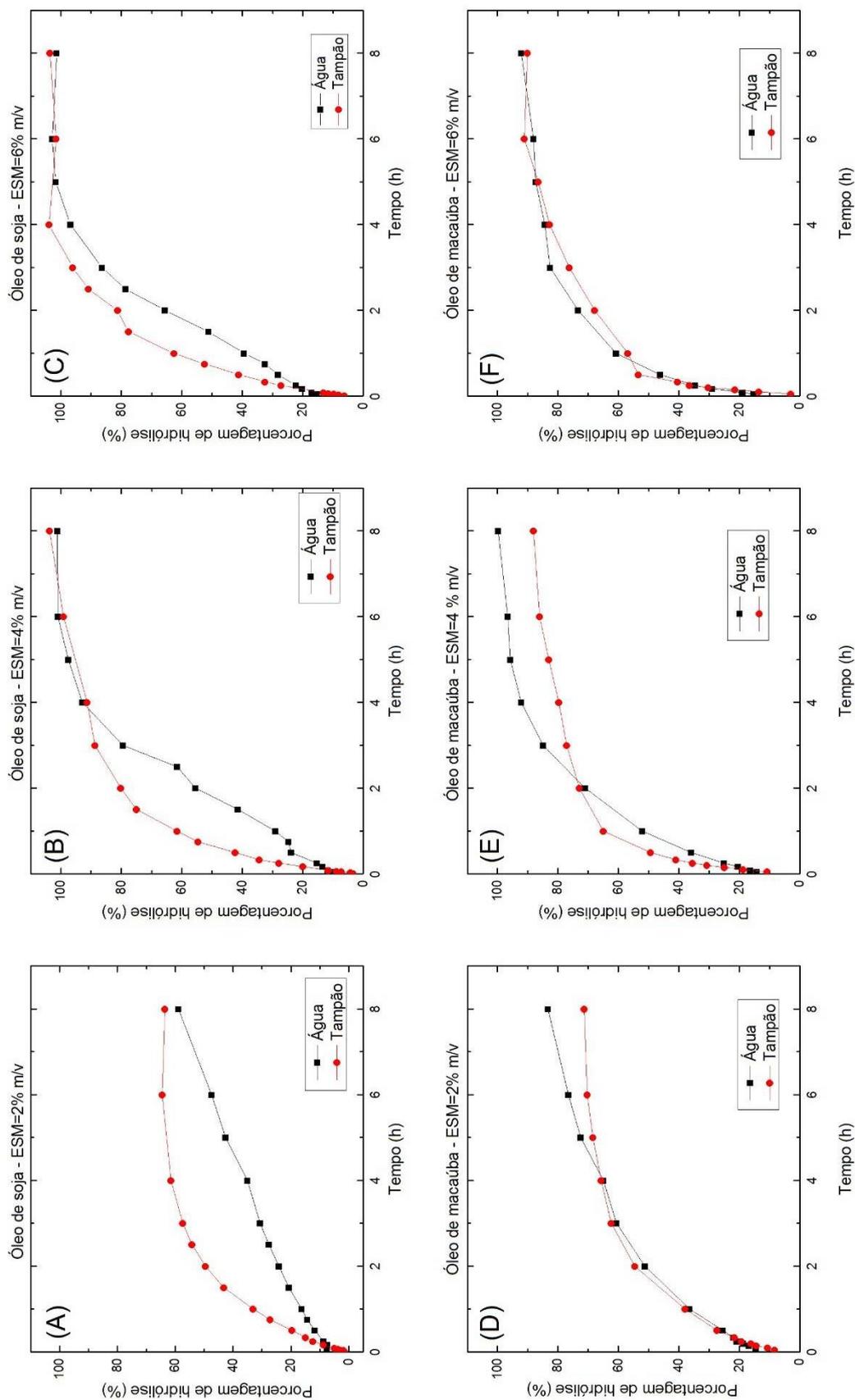
A escolha do meio reacional adequado é fundamental, uma vez que o pH e força iônica estão intimamente relacionados ao desempenho do catalisador utilizado (BERG et al., 2010). Enzimas possuem uma faixa de pH de máxima atividade catalítica, sendo então a manutenção do pH um aspecto vital para a viabilidade do processo (KATOCH, 2011). Foram realizadas hidrólises em água destilada (com o pH corrigido com HCl 3M) e em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5.

Conforme observado na Figura 4.9 (A–C), quando o óleo de soja foi utilizado como substrato uma conversão máxima de cerca de 65% foi atingida para 2% m/v de ESM; e 100 % de conversão quando 4 e 6 % m/v de ESM foi utilizado, tanto em água como em solução tampão, como descrito acima. Observa-se que a hidrólise em tampão catalisada por 2% de ESM atingiu uma conversão máxima após 8h de reação; enquanto que a reação realizada em água destilada continuou a ocorrer e estabilizando após 20h de reação (dados não apresentados).

Para o óleo de macaúba, o efeito da concentração de biocatalisador foi mais significativo do que o efeito do meio reacional, conforme observado na Figura 4.9 (D–F). O perfil de hidrólise do óleo de macaúba em tampão e em água destilada apresentou um comportamento semelhante, sendo o efeito da concentração de catalisador o fator de maior influência na produção de concentrados de ácidos graxos livres.

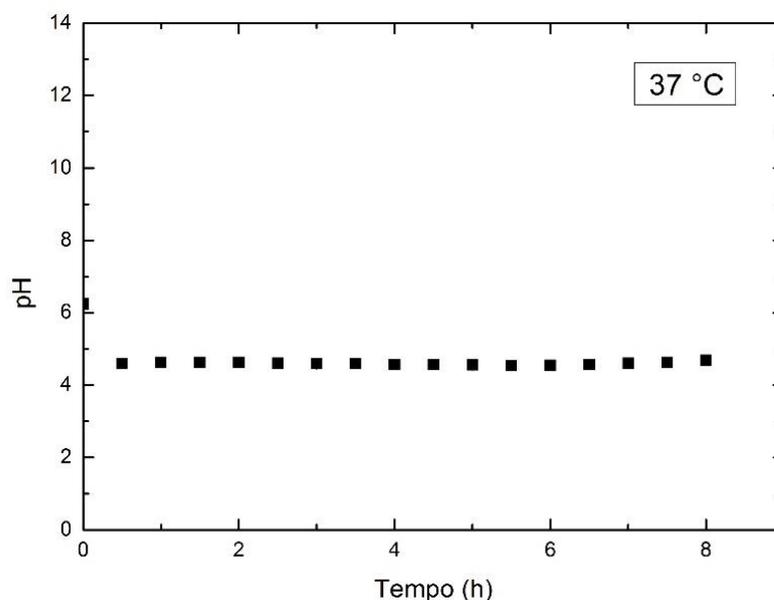
De acordo com estes resultados, a hidrólise dos óleos vegetais para a produção de concentrados de ácidos graxos livres para posterior síntese de ésteres etílicos pode ser realizada na ausência de adição de tamponantes, o que é atrativo para processos em escala industrial devido ao elevado custo destes compostos.

Figura 4.9 – Efeito do meio reacional sobre a cinética de hidrólise a 37 °C do óleo de soja água destilada e tampão acetato 100 mM, pH 4,5 de soja utilizando (A) 2% m/v ESM, (B) 4% m/v ESM, (C) 6% m/v ESM; óleo de macaúba em água destilada e tampão acetato 100 mM, pH 4,5 utilizando (C) 2% m/v ESM, (D) 4% m/v ESM, (E) 6% m/v ESM. As reações realizadas em água destilada tiveram o pH corrigido para 4.5 pela adição de HCl 3M no início da reação.



Uma das possíveis justificativas para esse comportamento seria o pH do meio reacional ser mais controlado quando a reação foi realizada em tampão. Ao longo dos experimentos de hidrólise em meio aquoso na ausência de tampão, foi possível observar que o próprio catalisador foi responsável pela manutenção do pH do meio reacional, apresentando capacidade tamponante. A Figura 4.10 apresenta o comportamento do pH reacional na hidrólise do óleo de soja catalisado pela lipase presente no ESM (4% m/v). Esse mesmo comportamento foi observado para as demais concentrações de catalisador, tanto quando o óleo de soja como o óleo de macaúba foram utilizados como substrato da reação (dados não apresentados). O pH inicial estabilizou-se entre 6,0 e 6,5 após a adição do catalisador ao meio reacional; sendo então necessária o ajuste deste com HCl 3M.

Figura 4.10 – Comportamento do pH do meio reacional ao longo da reação de hidrólise do óleo de soja a 37 °C, 2% m/v de ESM. Experimentos realizados em reator encamisado, 1.000 rpm, em triplicata.



Considerando que o método de preparo do ESM remove essencialmente material graxo (triacilgliceróis e AGL) presentes no interior do grão, o catalisador possui em sua composição não apenas as lipases, mas também outras proteínas, carboidratos, sais, fragmentos de células, etc. A capacidade tamponante pode ser atribuída ao equilíbrio químico dos compostos presentes no microambiente

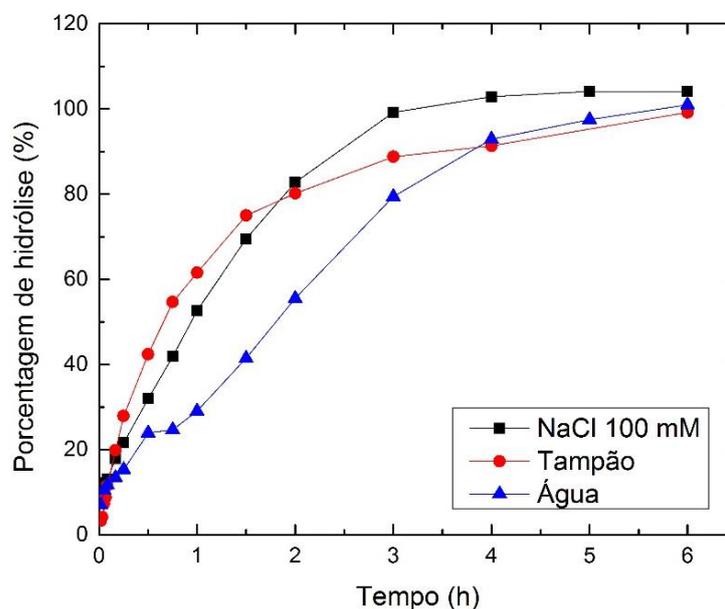
do biocatalisador solubilizados no meio reacional, possibilitando a estabilização do pH ao longo da reação de hidrólise.

Desta forma, o comportamento atípico e interessante observado na hidrólise do óleo de soja e de macaúba não pode ser atribuído à variação do pH, uma vez que esta não foi significativa ao ponto de prejudicar o desempenho da lipase de mamona. Assim, outra possível justificativa seria a presença de íons Na^+ em solução que teriam um efeito ativador sobre a atividade catalítica da enzima. Essa hipótese foi então investigada em um ensaio de hidrólise do óleo de soja realizada em solução NaCl 100 mM catalisada com 4% m/v de ESM, a 37 °C com ajuste do pH inicial para 4,5 com HCl 3M.

O efeito da adição de NaCl sobre a hidrólise de triacilgliceróis tem sido amplamente reportado pela literatura especializada. Nos estudos realizados por ENTRESSANGLES; DESNUELLE (1968), foi verificada que a hidrólise de triacetina (TC2) por lipase de pâncreas de porco realizada na presença de NaCl na concentração de 100 mM promoveu uma redução da solubilidade de gotas de óleo e aumentou a concentração de micelas, resultando no aumento da interface óleo/água e, conseqüentemente, a atividade hidrolítica da enzima. Na hidrólise dos lipídeos, o pH na interface orgânica-aquosa pode reduzir sensivelmente, devido ao acúmulo de ácidos graxos livres liberados pela ação da enzima. Essa redução de pH na interface ($\text{pH} < 4,0$), onde o complexo enzima-substrato é formado, pode inibir a atividade da enzima e a adição de NaCl é geralmente recomendada para neutralizar as cargas negativas geradas pelos ácidos graxos formados na interface (BROCKERHOFF; JENSEN, 1974).

Conforme observado na Figura 4.11, os perfis de hidrólise realizadas em tampão e em solução de NaCl 100 mM apresentaram um comportamento semelhante, com hidrólise total do óleo de soja após 6 horas de reação em ambos os sistemas reacionais. Desta forma, é possível afirmar que o caminho percorrido ao longo da hidrólise do óleo de soja é fortemente influenciado pelo tipo de meio reacional empregado; embora a conversão máxima alcançada e o tempo total de reação sejam os mesmos.

Figura 4.11 – Comparativo do perfil hidrólise do óleo de soja realizada em solução de NaCl 100 mM, pH 4,5 (ajustado com HCl 3M), tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 e água destilada pH 4,5 (ajustado com HCl), a 37 °C catalisado pelo ESM 4% m/v.



Esses resultados apontam que a hidrólise do óleo de soja e de macaúba podem ser realizadas em solução aquosa, desde que haja a correção do pH reacional para o de máxima atividade catalítica da lipase de mamona presente no ESM. A hidrólise em água destilada possibilita alcançar a máxima conversão no mesmo tempo de reação das hidrólises realizadas em tampão, sem que ocorra a perda da atividade catalítica em virtude da capacidade tamponante do próprio extrato enzimático. Embora existam trabalhos na literatura que utilizem o ESM na hidrólise de óleos vegetais, não foram encontrados trabalhos reportando reações realizadas em água destilada, sendo este trabalho um dos pioneiros a aplicar esta estratégia.

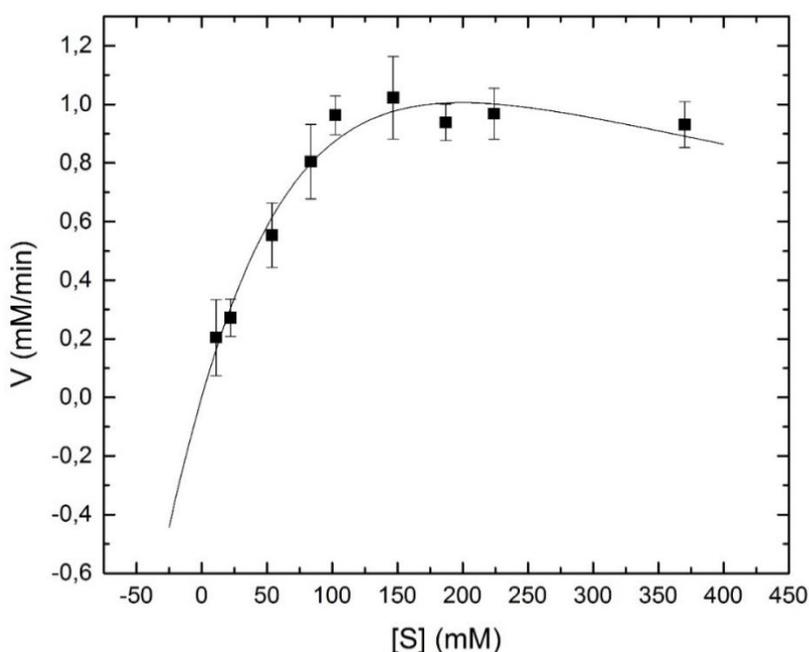
4.7.3 Efeito da concentração de substrato

O efeito da concentração de substrato foi determinado pelo método das velocidades iniciais a 37 °C. Visando minimizar os efeitos de flutuação de pH, os ensaios foram realizados em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5. O volume de tampão utilizado foi fixado em todos os ensaios, assim como a massa de catalisador 1,0 g em todos os ensaios garantindo assim a mesma diluição em todos os testes,

uma vez que parte da lipase presente no ESM é solubilizada na fase aquosa durante a reação. O substrato utilizado foi o óleo de soja, sendo a concentração de substrato utilizada entre 11 e 370 mM, que corresponde a 10 e 323 g/L de óleo.

A Figura 4.12 apresenta o comportamento dos dados experimentais de velocidade inicial *versus* concentração de substrato na hidrólise do óleo de soja. Observa-se que a velocidade da reação teve um aumento acompanhando a elevação da concentração de substrato, tendo um máximo quando a concentração de 147 mM de óleo foi oferecida (128,2 g/L de óleo). Entretanto, para os ensaios realizados com concentração de substrato acima de 147 mM foi observada uma ligeira redução da velocidade inicial de hidrólise. Estes resultados podem ser atribuídos ao aumento do diâmetro das gotículas de óleo por coalescência, favorecida em altas concentrações de substrato, que reduzem a área de interação enzima-substrato na interface óleo/água e também aumentam a viscosidade do meio de reação, o que pode reduzir a acessibilidade do substrato ao microambiente da enzima, como descrito anteriormente.

Figura 4.12 – Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato aos dados experimentais de atividade da lipase de mamona presente no extrato sólido de mamona em função da concentração do óleo de soja. Reações em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 a 37 °C, sob agitação constante de 1.000 rpm. Os ensaios foram realizados em triplicata.



Os dados experimentais obtidos foram ajustados ao modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato utilizando o *software* OriginPro 9.0[®], empregando um algoritmo de interação não-linear pelo modelo de Levenberg Marquadt. Os parâmetros velocidade máxima de reação ($V_{M\acute{a}x}$) e constantes de afinidade (K_M) e inibição (K_I) estimados estão elencados na Tabela 4.3. Estes resultados mostram que o modelo de inibição enzimática incompetitiva apresentou um bom coeficiente de correlação ($R^2 = 0,96$) com os dados experimentais obtidos. Este modelo descreve que o inibidor incompetitivo, neste caso o próprio substrato, se liga somente ao complexo enzima/substrato formado. A ligação entre o inibidor e o complexo é efetuada por um sítio de ligação diferente do sítio em que o substrato se encontra ligado à enzima. Em outras palavras, o inibidor tem afinidade apenas pelo complexo formado em altas concentrações de substrato. Esta elevada afinidade de moléculas de inibidor (neste caso o substrato) ao complexo enzima/substrato é favorecida para as reações realizadas em elevadas concentrações de substrato e com baixa concentração de enzima disponível no meio de reação.

Tabela 4.3 – Parâmetros cinéticos do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato estimados para a lipase do ESM a 37 °C e pH 4,5.

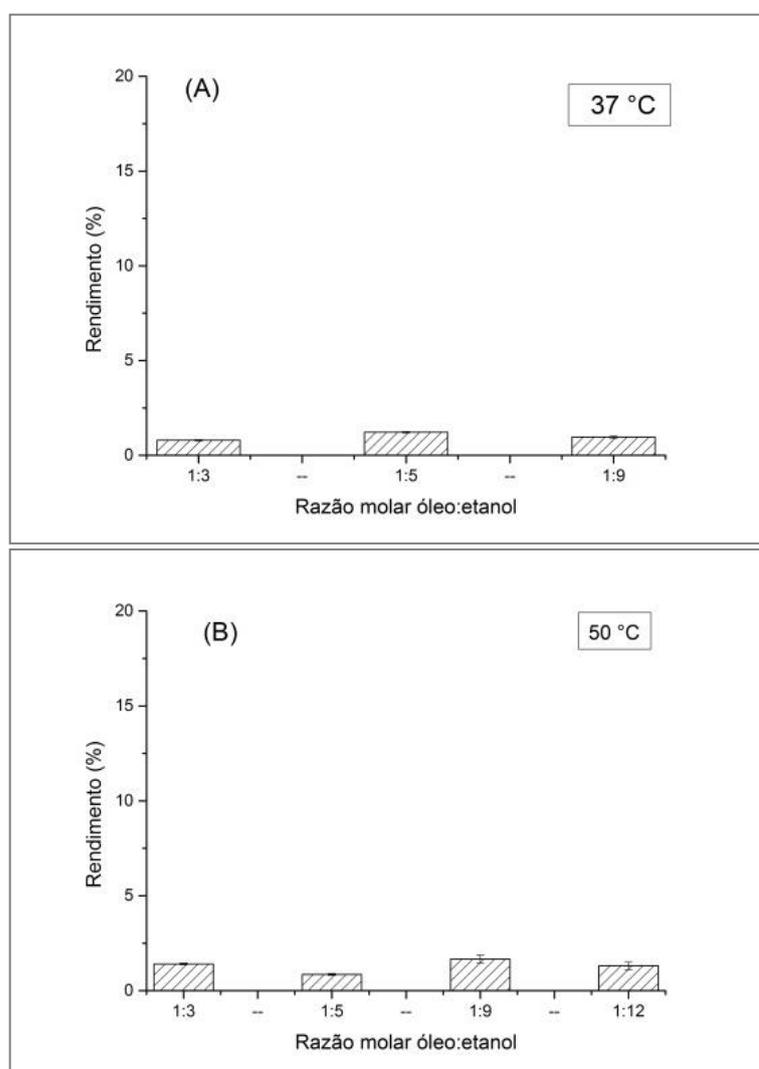
Parâmetros	
K_M (mM)	$182,95 \pm 65,80$
$V_{M\acute{a}x}$ (mM/min)	$2,85 \pm 0,75$
K_I (mM)	$217,23 \pm 95,34$
Coeficiente de correlação (r^2)	0,96
Modelo ajustado	$v = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}}$

4.8 Síntese de biodiesel via transesterificação

Os ensaios de síntese de biodiesel foram realizados conforme descrito no item 2.3.8, empregando óleo de soja por se tratar de um substrato muito utilizado na síntese de biodiesel por reação de transesterificação, permitindo assim comparar o desempenho da lipase de mamona com outras enzimas na síntese de biodiesel

previamente reportados na literatura (AZOCAR et al., 2014; LIMA et al., 2015; SANGALETTI et al., 2013). Em todas as reações, empregou-se o extrato sólido de mamona como catalisador, com uma atividade de 68 U_{TBU}/g de catalisador. As reações foram realizadas a 37 e 50 °C utilizando diferentes razões molares óleo:etanol, com massa de catalisador fixada em 1 g (10% da massa de óleo). A Figura 4.13 apresenta os rendimentos obtidos nas reações de transesterificação catalisadas pelo extrato sólido de mamona.

Figura 4.13 – Rendimento de transesterificação de óleo de soja a (A) 37 °C e (B) 50 °C catalisada pelo extrato sólido de mamona. As reações foram realizadas sob agitação (300 rpm).



Observa-se que em ambas as temperaturas não houve a formação de ésteres etílicos, sendo alcançada uma conversão irrisória (máxima de 1,7%). Esse

comportamento pode ser decorrente da instabilidade do catalisador nas condições de síntese utilizadas nos ensaios ou até mesmo da baixa afinidade da lipase de mamona por este tipo de reação.

Conforme discutido no item 4.5, o extrato sólido de mamona possui baixa estabilidade na presença de etanol, mesmo que em relações molares óleo:álcool baixas como 1:3. Em geral, para a síntese de biodiesel empregam-se razões molares mais elevadas, visando o deslocamento do equilíbrio químico na direção dos produtos (CHRISTOPHER; HEMANATHAN; ZAMBARE, 2014; KNOTHE et al., 2006). Somado à instabilidade ao etanol, está o efeito da temperatura. Sabe-se que a 50 °C não haveria possibilidade de ocorrer a reação, uma vez que tanto a temperatura como a presença de etanol prejudicam o desempenho da enzima, resultando na inativação desta. Esse mesmo comportamento pode ter ocorrido para as reações a 37 °C, cujas conversões também foram extremamente baixas. Portanto, as baixas conversões obtidas podem ser consequência do efeito combinado da temperatura e da presença de etanol no meio reacional.

Esses resultados demonstram a incapacidade da lipase de mamona de catalisar a reação de transesterificação. Quando comparado com lipases comerciais, cujos rendimentos de transesterificação podem alcançar 100%, o uso deste biocatalisador torna-se inviável para esta reação.

4.9 Síntese de biodiesel via hidroesterificação

4.9.1 Reação de hidrólise utilizando o extrato sólido de mamona

Dentre as rotas de produção de biodiesel existentes, a hidroesterificação vem ganhando destaque devido à sua flexibilidade, principalmente pela possibilidade de utilizar as mais variadas fontes de triacilgliceróis, independentemente de seu teor de acidez. Diversos trabalhos na literatura constataam a simplicidade e bons resultados obtidos com a aplicação desta via (AGUIEIRAS et al., 2014; ALMARALES et al., 2012; AVELAR et al., 2013; BRESSANI et al., 2014; CHOWDHURY et al., 2013).

O extrato sólido de mamona foi empregado como biocatalisador para a hidrólise de óleo de soja e óleo da castanha da macaúba como fonte lipídica. Foram levadas em conta as condições otimizadas obtidas no estudo da cinética de hidrólise, empregando a relação óleo:tampão de 1:2 m/v, uma vez que nesta proporção pode-se observar a máxima atividade catalítica sem efeitos inibitórios causados pelo substrato. As reações foram realizadas em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5, a 37 °C sob agitação mecânica de 1.000 rpm por um período máximo de 12 horas.

4.9.2 Reação de esterificação utilizando lipase imobilizadas

Como mostrado anteriormente, a lipase de sementes dormentes de mamona não exibiu atividade catalítica para as reações de transesterificação e esterificação. Deste modo, foi necessária a aplicação de uma enzima complementar a fim de realizar esta etapa do processo. Primeiramente, foram realizados ensaios preliminares com duas lipases comerciais imobilizadas covalentemente em resina epóxi: lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF, conhecida como Amano AK) e lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL, conhecida como Lipolase). Os AGL purificados de soja foram esterificados com etanol em proporção equimolar em bateladas de 8 horas, 37 °C, 300 rpm em meio isento de solvente. Nesses ensaios, verificou-se uma conversão de 59% para a LTL, enquanto não houve conversão quando a reação foi catalisada pela PFL.

Em vista destes resultados e dos relatados na literatura (KOPP et al., 2015; LIMA et al., 2015; SUN et al., 2013), a lipase de *T. lanuginosus* foi escolhida para os ensaios de esterificação desempenho. Para a esterificação de AGL de soja e macaúba purificados, foram estudados o efeito de alguns parâmetros como temperatura de reação e razão molar AGL:etanol visando obter a maior conversão em ésteres etílicos possível, sendo todas as reações de esterificação realizadas em meio isento de solvente.

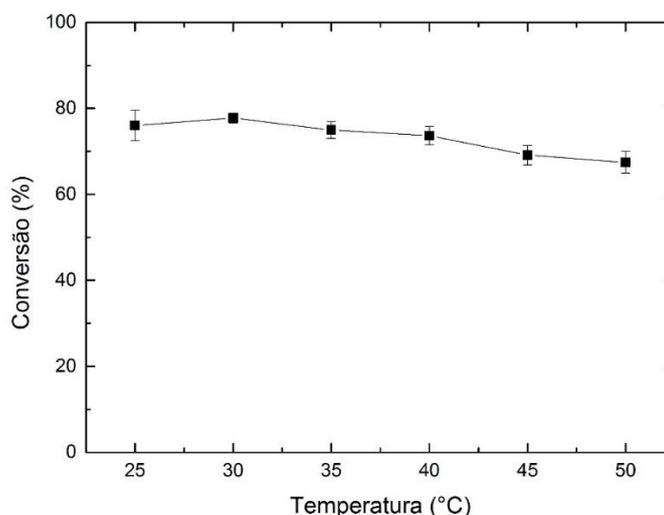
Primeiramente, foi avaliado o efeito da relação molar AGL de soja:etanol. Foram avaliadas as proporções molares 1:1, 1:2 e 1:3, sendo obtidas conversões de 59,9±1,6 %, 6,6±2,0% e 3,1±1,4%, respectivamente. Observa-se que

o aumento do etanol adicionado ao meio reacional foi inversamente proporcional à conversão, sendo a melhor condição a que emprega a razão equimolar AGL:etanol.

O aumento da concentração de etanol visa deslocar o equilíbrio químico da reação no sentido do produto, como descrito anteriormente. Como pode ser observado, o aumento da concentração de etanol reduziu drasticamente a atividade catalítica do biocatalisador devido à possível inativação da enzima pelo etanol. HERNANDEZ-MARTIN; OTERO (2008) reportam estudaram a LTL na reação de transesterificação do óleo de soja com etanol e verificaram que o aumento da relação álcool:óleo resultou na inativação do biocatalisador. Nesse mesmo estudo, uma conversão de 84% foi alcançada reação de transesterificação realizada com adição do etanol em etapas haja visto a significativa inativação da enzima na presença de álcoois de cadeia curta. Desta forma, para os experimentos seguintes foi selecionada a razão molar AGL:etanol de 1:1.

Uma vez determinada a relação AGL de soja:etanol, foi avaliado o efeito da temperatura sobre a conversão em ésteres etílicos, como mostrado na Figura 4.14. De acordo com estes resultados, nota-se pouca variação nas conversões obtidas na faixa de temperatura estudada (25 a 50 °C), evidenciando a termoestabilidade da enzima nesta faixa de temperatura.

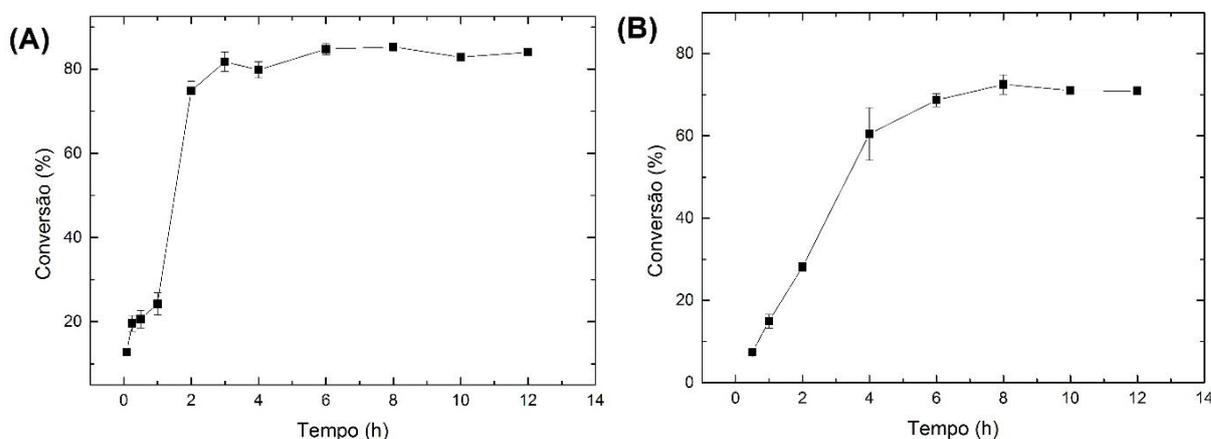
Figura 4.14 - Conversões obtidas na esterificação de AGL e etanol catalisada pela LTL imobilizada após 8h de reação. Meio reacional contendo AGL de soja e etanol na proporção molar 1:1; 300 rpm. Experimentos realizados em triplicata.



Enzimas imobilizadas geralmente possuem uma maior estabilidade frente a solventes orgânicos e temperaturas elevadas, características importantes quando aplicadas em processos industriais como a síntese de biodiesel (DICOSIMO et al., 2013). Considerando os resultados obtidos e os demais reportados na literatura (BRESSANI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2010), a temperatura de 30 °C foi selecionada para dar continuidade aos ensaios de síntese em reator tanque agitado.

As condições utilizadas na esterificação dos AGL de soja foram empregadas para os AGL obtidos a partir do óleo de macaúba na esterificação em reator de tanque agitado. Embora o perfil de ácidos graxos difira entre os substratos utilizados, as condições operacionais avaliadas (temperatura e relação AGL:etanol) atuam de forma similar sobre o desempenho do biocatalisador utilizado e, uma vez determinados, podem ser aplicados quando utilizados diferentes substratos. As esterificações em reator de tanque agitado foram realizadas a 30 °C, porém sob agitação mecânica constante de 500 rpm. Visando a máxima conversão no menor tempo de reação possível, a carga enzimática oferecida foi dobrada, aplicando-se 517 U_{TBU}/g de substrato. Esta carga foi escolhida levando-se em conta o volume ocupado pela enzima imobilizada no reator, que neste caso representa 8% do volume total (m/v). A Figura 4.15 apresenta a conversão dos AGL de soja em ésteres alquílicos ao longo de 12 horas de reação.

Figura 4.15 – Perfil cinético da esterificação de (A) AGL de soja (B) AGL de macaúba com etanol catalisada pela LTL imobilizada em reator. Reações realizadas com proporção equimolar AGL:etanol, 4% m/ m_{AGL} de LTL imobilizada a 30 °C, 500 rpm em meio isento de solvente. Experimentos realizados em duplicata.



Observa-se que os perfis cinéticos das reações de esterificação apresentaram comportamentos diferentes, embora catalisados pela mesma enzima. A esterificação dos AGL de soja alcançou a conversão de 84% após 2 horas, permanecendo ao longo das próximas 10 horas de reação. Entretanto, na esterificação de AGL do óleo de macaúba foi observada máxima conversão em ésteres de 71% após 6 h de reação. Estes resultados poderiam ser atribuídos às diferentes composições em ácidos graxos de cada substrato. Óleo de soja tem em sua composição elevada concentração de ácidos graxos mono- e poli-insaturados (oleico, linoleico e linolênico), enquanto o óleo de macaúba é rico em ácidos graxos saturados (mirístico e láurico) e ácido graxo monoinsaturado (ácido oleico).

O meio de reação preparado com AGL provenientes da hidrólise do óleo de macaúba apresenta uma maior viscosidade do que aquele preparado com AGL do óleo de soja, o que pode interferir na acessibilidade destes AGL ao microambiente do biocatalisador (menor difusão externa e interna de ácidos graxos saturados devido à menor fluidez do meio de reação), principalmente tendo em conta que a reação foi realizada na ausência de solventes orgânicos. Estes resultados estão de acordo com prévios estudos reportados na literatura que mostram o efeito da composição em ácidos graxos na síntese de ésteres alquílicos (biodiesel) por reações de esterificação e transesterificação catalisadas por lipases imobilizadas preparadas por diferentes protocolos (SILVA et al., 2014; WOODCOCK et al., 2008).

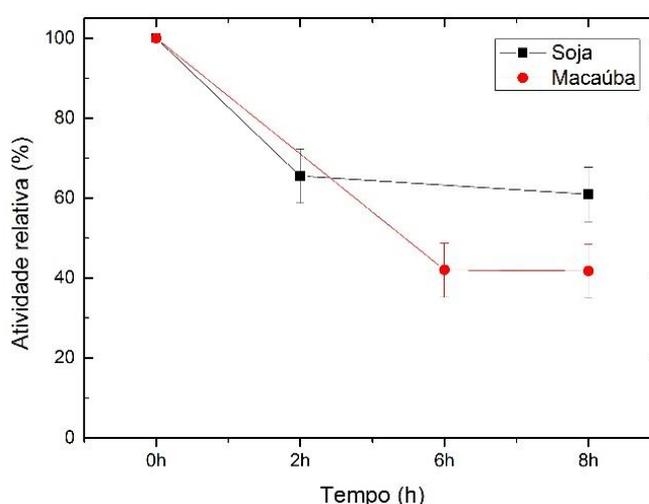
Embora a reação seja conduzida a 30 °C, temperatura muito inferior ao ponto de ebulição do etanol anidro, a agitação aplicada ao sistema favorece a evaporação do etanol para o ambiente. Conseqüentemente, uma nova esterificação do óleo de soja foi realizada em *shaker* a 30 °C, 400 rpm. A reação foi realizada em recipiente fechado com reforço na vedação exterior e a conversão em ésteres determinada após 8 horas de reação. Foi possível observar uma conversão de 81 %, evidenciando que a estabilização da conversão não foi provocada pela evaporação do etanol. Estes resultados confirmam a influência dos ácidos graxos de cada matéria-prima na reologia do meio reacional e, principalmente, a especificidade da enzima pelos diferentes AGL.

Outra possível justificativa seria a perda de atividade por parte do catalisador nas condições operacionais. Desta forma, verificou-se a atividade residual do catalisador coletado ao longo das reações de esterificação, considerando

o ponto de 8 horas de reação e o ponto de estabilização da conversão como critério de escolha. Após o tratamento do catalisador para a remoção de resíduos do meio reacional, a atividade hidrolítica de cada catalisador foi medida pelo método da hidrólise da tributirina (item 3.2.3).

Conforme observado na Figura 4.16, houve uma redução da atividade da LTL imobilizada, restando 61% e 42% de atividade nas reações utilizando soja e macaúba, respectivamente. Essa redução da atividade do catalisador em parte justifica o fato de não ter sido possível alcançar conversões mais elevadas. Outra possível justificativa seria a inibição do catalisador causada pelo acúmulo do produto no meio reacional, resultando na redução da atividade catalítica da lipase. Neste sentido, um estudo mais aprofundado e minucioso seria necessário a fim de verificar a validade desta hipótese.

Figura 4.16 – Atividade residual da LTL imobilizada ao longo da reação de esterificação dos AGL de soja e macaúba com etanol em meio isento de solvente. Atividade enzimática determinada pela hidrólise da tributirina a 37 °C em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,5. Os ensaios triplicata.



4.10 Extração em fase aquosa e purificação da lipase de mamona

Embora seja possível obter um catalisador eficiente e de baixo custo através do simples processamento de sementes de mamona, o extrato sólido ainda apresenta baixa atividade catalítica por grama de catalisador. Apesar de apresentarem um custo inferior ao das enzimas microbianas, uma das principais desvantagens de enzimas vegetais é a baixa atividade por grama de catalisador, em

virtude da baixa concentração da enzima no extrato sólido. Outra desvantagem observada ao longo deste estudo é baixa estabilidade da lipase na presença de solventes orgânicos e etanol, que pode limitar a aplicação do extrato sólido à reação de hidrólise.

Um dos fatores limitantes mais importantes a ser considerado quanto à aplicação da lipase de mamona é a presença da ricina no microambiente do ESM. O processo de preparo do extrato bruto se limita à remoção dos ácidos graxos da semente, concentrando as enzimas em um extrato sólido juntamente com todas as proteínas presentes no grão, incluindo a ricina. A presença desta toxina representa um obstáculo para aplicação de lipase de mamona, principalmente, em processos voltados para a síntese de químicos finos e compostos farmacêuticos. Considerando o risco potencial desta toxina, fica clara a necessidade de separá-la da lipase de mamona de forma que esta possa ser aplicada de maneira mais generalizada e sem riscos (ANANDAN et al., 2005; BRANDON; KORN; YANG, 2014).

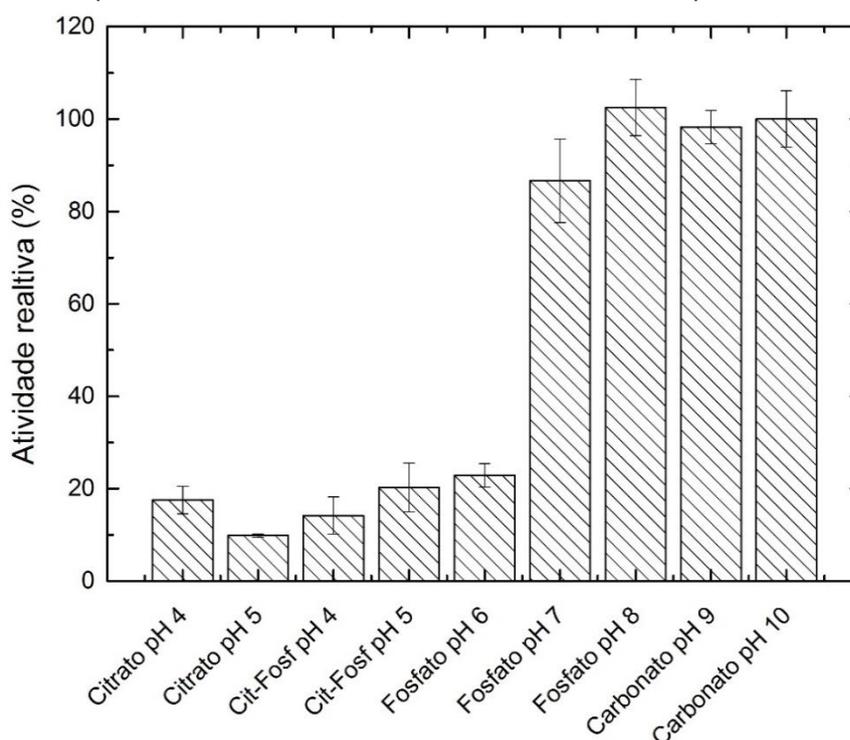
Considerando esses fatores, foram realizados ensaios visando a extração da lipase de mamona em fase aquosa. Em seguida, foram realizados ensaios preliminares de adsorção da lipase de mamona empregando suportes hidrofóbicos e iônicos. Estes ensaios foram realizados visando a purificação e concentração da lipase de mamona em uma única etapa, possibilitando a aplicação da lipase adsorvida nos suportes como biocatalisador em outros processos químicos.

4.10.1 Extração de lipase de mamona em diferentes valores de pH

Foram testadas diferentes soluções-tampão em uma faixa de pH de 4,0 a 10,0 a fim de avaliar a melhor condição para a extração da lipase para a fase líquida. Trabalhos como os de ALTAF et al. (1997), EASTMOND (2004), MAESHIMA; BEEVERS (1985) e SU et al. (2010) relatam a extração da lipase de mamona para a fase líquida, empregando técnicas sofisticadas e diversas etapas com elevado consumo de energia e reagentes. Considerando-se que a aplicação industrial de enzimas está intimamente ligada aos custos envolvidos ao longo do processo de purificação (HARRISON et al., 2003), avaliou-se a aplicação de uma técnica simples e de baixo custo de extração da lipase em fase líquida. A Figura

4.17 apresenta a atividade relativa da lipase de mamona observada no sobrenadante após 12 horas de extração em comparação com a atividade total do extrato sólido.

Figura 4.17 - Extração da lipase de mamona em diferentes tampões após 12 horas de incubação a 25 °C. Suspensão contendo 2,5g de ESM e 25 mL de tampão. Atividade relativa observada no sobrenadante em relação à atividade total observada na suspensão após 12 horas de extração. A atividade catalítica foi determinada pela hidrólise da tributirina em tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,5 a 37°C. Os ensaios foram realizados em triplicata.



Embora a lipase de mamona apresente uma melhor atividade catalítica em meio ácido, pode-se observar que dentre os tampões avaliados houve uma melhor extração da lipase empregando tampões com valores de pH neutro e alcalino. As melhores condições foram alcançadas empregando tampão carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9,0 e pH 10,0, onde aproximadamente 90% da atividade total contida no extrato sólido foi solubilizada.

O comportamento observado na extração pode ser atribuído ao impacto que a variação do pH tem sobre o estado de ionização dos resíduos de aminoácidos na superfície da proteína, e conseqüentemente sobre sua solubilidade. Lipases, como a maioria das proteínas, são solúveis em meio aquoso. Contudo, o sítio ativo e seu entorno possui um caráter altamente hidrofóbico, o que permite a sua interação hidrofóbica com moléculas e superfícies hidrofóbicas (FERNANDEZ-

LAFUENTE et al., 1998). Em pH 4,5, a enzima encontra-se com a conformação ideal, fato verificado pelo seu melhor desempenho em termos de atividade hidrolítica. O aumento do pH provoca uma perda da atividade da lipase devido a mudanças conformacionais, provavelmente provocado pela protonação e desprotonação das cadeias laterais dos aminoácidos da enzima, principalmente aminoácidos relacionados com o sítio ativo ou com as partes móveis da tampa que recobre o sítio ativo. Embora a estrutura tridimensional e os aminoácidos que compõem a lipase de mamona não sejam conhecidos, pela variação do pH pode-se supor que em pH acima de 7,0, os resíduos de aminoácidos aspartato e glutamato encontram-se completamente desprotonados (pK_a 3,65 e 4,25, respectivamente), conferindo cargas negativas na superfície da enzima. De maneira semelhante, resíduos lisina e arginina encontram-se positivamente carregados, em valores de pH abaixo de 10,5 (pK_a 10,53 e 10,76, respectivamente). Desta forma, nota-se que o aumento do pH provavelmente favorece a polarização da superfície da enzima, tornando-a mais solúvel no meio de extração que é polar, o que justifica o aumento efetivo de atividade e concentração de proteínas verificado nos ensaios de extração em valores de pH mais elevados.

A Tabela 4.4 apresenta a concentração de proteínas totais, a atividade observada no sobrenadante e a atividade específica (U_{TBU}/mg de proteína) observados em cada processo de extração. Nota-se que o aumento do pH não provoca a desnaturação irreversível da enzima, pois verifica-se que a enzima retoma a sua atividade quando incubada nas condições de ensaio (tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,5).

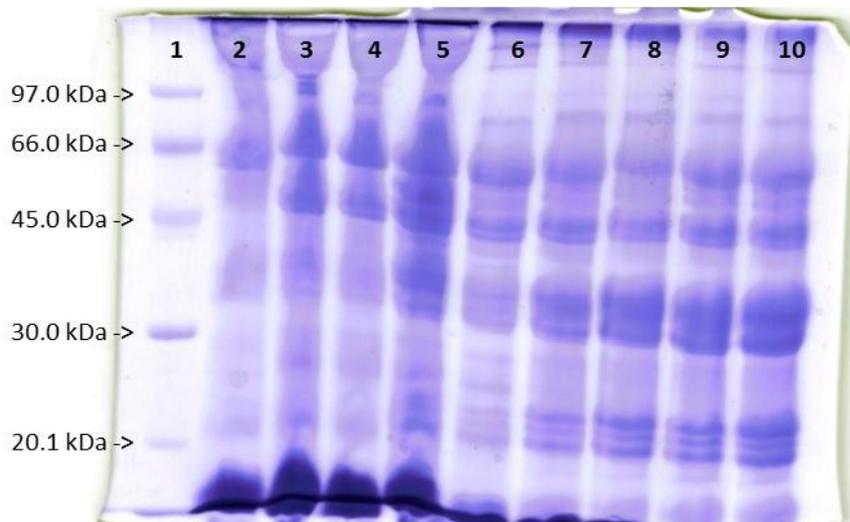
Tabela 4.4 – Concentração de proteínas e atividades das soluções de extração de lipase de mamona. Concentração de proteínas determinadas pela metodologia descrita por Bradford. A atividade catalítica foi determinada pela hidrólise da tributirina em tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,5 a 37°C. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tampão	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade do sobrenadante (U _{TBU} /mL)	Atividade específica (U _{TBU} /mg de proteína)
Citrato pH 4,0	0,79 ± 0,01	0,80 ± 0,11	1,02
Citrato pH 5,0	2,38 ± 0,14	0,47 ± 0,06	0,20
Citrato-Fosfato pH 4,0	1,09 ± 0,11	0,56 ± 0,16	0,52
Citrato-Fosfato pH 5,0	1,66 ± 0,41	0,40 ± 0,07	0,24
Fosfato pH 6,0	3,07 ± 0,07	0,75 ± 0,09	0,24
Fosfato pH 7,0	7,45 ± 0,87	3,42 ± 0,19	0,46
Fosfato pH 8,0	9,90 ± 0,35	3,85 ± 0,11	0,39
Carb.-Bicarbonato pH 9,0	8,85 ± 0,83	2,37 ± 0,02	0,27
Carb.-Bicarbonato pH 10,0	10,91 ± 0,35	3,02 ± 0,28	0,28

Em termos de proteínas solubilizadas, a melhor extração foi atingida em tampão carbonato pH 10,0 com o qual foi possível extrair 10,91 mg/mL de proteínas. O tampão fosfato de sódio pH 8,0 apresentou melhor desempenho na questão de extração de lipase ativa, seguido do tampão fosfato de sódio pH 7,0. Avaliando-se a atividade específica, o melhor resultado obtido foi com tampão citrato de sódio pH 4,0, com uma atividade específica de 1,02 U_{TBU}/mg de proteína solubilizada, seguido do tampão fosfato de sódio pH 7,0, com 0,46.

Embora tenha sido possível efetuar a extração da lipase de mamona em todos os tampões, nota-se que o aumento do pH do meio proporcionou um aumento da concentração de proteínas extraídas para a fase aquosa. Conforme pode-se observar na eletroforese apresentada na Figura 4.18, foi possível extrair para a fase aquosa proteínas de diferentes massas moleculares no microambiente do extrato bruto. EASTMOND (2004) realizou ensaios da purificação e clonagem da lipase de mamona e mostrou que a lipase ácida de mamona possui uma massa molecular de 60 kDa. Em todos os tampões utilizados para a extração é possível observar bandas na faixa de 66 kDa, sendo essas mais intensas nos tampões citrato de sódio pH 5,0, citrato-fosfato de sódio pH 4,0 e 5,0. É possível observar que o aumento do pH do meio de extração proporcionou uma maior extração de proteínas contaminantes, conforme observado nas bandas marcadas entre 45,0 e 20,1 kDa.

Figura 4.18 – Eletroforese SDS-Page em condições desnaturantes da lipase de mamona em tampões variados após 12 horas de incubação, em gel de bis-acrilamida 12% m/v. Canaletas: 1) marcador molecular de massa peso molecular em kDa; 2) citrato pH 4,0; 3) citrato pH 5,0; 4) citrato-fosfato pH 4,0; 5) citrato-fosfato pH 5,0; 6) fosfato pH 6,0; 7) fosfato pH 7,0; 8) fosfato pH 8,0; 9) carb-bicarbonato pH 9,0; 10) carb-bicarbonato pH 10,0.



O tampão escolhido para a etapa de extração da lipase em fase aquosa deve proporcionar uma extração mais seletiva, isto é, com menor quantidade de proteínas contaminantes. A atividade observada no sobrenadante também deve ser considerada, pois representa o desempenho da enzima ativa em solução. Desta forma, a escolha do meio de extração leva em conta todas as variáveis, mesmo que isso represente perda em termos de atividade ou uma quantidade maior de contaminantes em solução.

Para os ensaios de adsorção em suportes hidrofóbicos e iônicos, foi escolhida a solução de lipase extraída em tampão carbonato de sódio 100 mM, pH 9,0 dialisada. Embora o extrato escolhido apresentasse uma concentração maior de contaminantes, intencionou-se verificar a seletividade dos suportes hidrofóbicos na etapa de adsorção.

4.10.2 Adsorção da lipase de mamona em suportes iônicos e hidrofóbicos

Embora a lipase de mamona tenha sido estudada em diversos trabalhos na literatura, não foram encontrados trabalhos reportando a purificação desta enzima empregando a técnica de adsorção até o melhor de nosso

conhecimento. Lipases possuem uma alta afinidade por superfícies hidrofóbicas, adsorvendo-se fisicamente quando estas encontram-se em solução. Essa característica de lipases tem sido utilizada tanto para a purificação como para a imobilização de lipases (KOPP et al., 2015; LIMA et al., 2015; MENDES, 2009). Outra estratégia utilizada nesta etapa foi o uso de suportes iônicos para a adsorção iônica da lipase de mamona extraída em fase aquosa, técnica amplamente difundida em processos de purificação de proteínas. Nesta etapa deste trabalho foram utilizados os suportes SMMp octil (hidrofóbico), SMMp amino (suporte catiônico fraco) e a resina Streamline SP XL (suporte aniônico forte).

Conforme observado na Tabela 4.5, aproximadamente 30% da atividade hidrolítica da lipase solúvel foi adsorvida no suporte SMMp octil. O rendimento de adsorção para o suporte Streamline SP XL foi de 87% e 67% para SMMp Amino. Cerca de 35% das proteínas presentes no sobrenadante foram adsorvidas nos suportes SMMp octil; contudo não foi detectada atividade hidrolítica (hidrólise do *p*-NPB) diretamente nas partículas. Ao se avaliar a atividade específica do sobrenadante, observa-se que houve uma ligeira redução em relação ao valor inicial; indicando que apenas uma pequena quantidade de lipases desapareceu do sobrenadante.

Tabela 4.5 – Adsorção de lipase de mamona em suportes hidrofóbicos e iônicos. Adsorções realizadas sob agitação constante a 25 °C por 12 horas. A atividade catalítica foi determinada pela hidrólise do *p*-NPB em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,5 a 25 °C. Concentração de proteínas determinada pela metodologia descrita por Bradford (1976). Os ensaios foram realizados em duplicata.

	R_{Ads} (%)	A_{Rec} (%)	P_{Ads} (%)	Atividade específica ($U_{p\text{-NPB}}/\text{mg}$)*
SMMp octil	29,79	0,00	34,78	0,21
Streamline SP XL	86,97	7,65	88,43	0,24
SMMp amino	66,88	3,28	26,95	0,16

R_{Ads} : Rendimento de adsorção (atividade hidrolítica desaparecida no sobrenadante durante a adsorção) (%); A_{Rec} : Atividade recuperada (%); P_{Ads} : Proteína adsorvida (%); *: Atividade específica do sobrenadante após realizada a adsorção. Atividade específica do controle foi de 0,23 $U_{p\text{-NPB}}/\text{mg}$ de proteína.

Embora as lipases tenham afinidade por superfícies hidrofóbicas, como descrito anteriormente, proteínas contaminantes que possuem resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na superfície também são capazes de serem adsorvidas

nos suportes testados. O extrato sólido é um meio extremamente complexo que contém alta concentração de proteínas contaminantes, incluindo proteínas estruturais (que costumam possuir caráter hidrofóbico), além de ácidos graxos em baixa concentração. Esses contaminantes hidrofóbicos podem competir com a lipase por sítios de ligação no suporte SMMp octil diminuindo a eficiência da adsorção. Outro fator que pode ter dificultado a adsorção da lipase de mamona no suporte SMMp octil é o fato desta lipase ser glicosilada, conforme sugerido por ORY (1969). Neste caso, mesmo a lipase possuindo grande superfície hidrofóbica, as glicosilações podem interferir no processo de interação hidrofóbica, dificultando o contato direto da superfície da enzima com a superfície do suporte.

Conforme também observado na Tabela 4.5, foi possível verificar atividade hidrolítica nas partículas dos suportes Streamline SP XL e SMMp amino. Nota-se que além de ter apresentado uma atividade recuperada superior à do SMMp amino, houve também uma maior adsorção de proteínas no suporte Streamline SP XL. Esses resultados podem ser atribuídos à natureza deste último suporte, que é composto por gel de agarose 6% ativado com grupos sulfopropil, contendo um núcleo de quartzo com extensor de superfície de dextrano. Segundo HATTI-KAUL; MATTIASSON (2003), os extensores de dextrano conferem flexibilidade suficiente para a passagem de proteínas carregadas pelos poros das partículas além de aumentar a exposição dos grupos sulfopropil, resultando em um aumento da capacidade de adsorção de proteínas no suporte. Outro fator que pode ter originado o melhor desempenho do suporte Streamline SP XL é a maior área de superfície por grama de suporte deste material em comparação com SMMps que são muito mais densas devido ao núcleo magnético de magnetita que possui densidade de aproximadamente 5,5 (KOPP et al., 2014). Neste contexto, 1 g de Streamline SP XL possui muito mais área de superfície para adsorção de proteínas que 1 g SMMp, além dos grupos químicos nos dois suportes serem diferentes.

Além do rendimento de adsorção e da concentração de proteínas adsorvidas, um parâmetro importante a ser avaliado é o comportamento da atividade específica da enzima no sobrenadante. Em um processo de adsorção, verifica-se uma redução da atividade do sobrenadante devido às lipases serem adsorvidas nos suportes; acompanhada de uma redução na concentração de proteínas. Todavia, conforme discutido anteriormente, o processo de extração realizado neste trabalho resulta na solubilização não apenas da lipase de mamona, mas também de outras

proteínas e contaminantes oriundos das sementes de mamona. Desta forma, uma adsorção seletiva teria como resultado a redução da atividade específica no sobrenadante sem que a concentração de proteínas reduza significativamente; ou seja, a molécula alvo está sendo adsorvida no suporte mais eficientemente que os contaminantes.

Quando o suporte SMMp amino foi utilizado, aproximadamente 67% da atividade do sobrenadante foi adsorvida, enquanto apenas 27% das proteínas foram adsorvidas no suporte. Em termos de atividade específica, o menor valor foi encontrado para este mesmo suporte, o que indica que houve uma adsorção maior de lipases do que proteínas contaminantes, mesmo que a atividade hidrolítica recuperada no derivado foi de apenas 3,28%.

Os suportes contendo a lipase de mamona adsorvidas foram submetidos a um processo de dessorção, conforme descrito no item 3.3.14. As atividades hidrolíticas e a concentração de proteínas nos sobrenadantes de dessorção foram medidas ao término do processo. A partir destes dados, foram calculados os parâmetros de atividade dessorvida (em relação à atividade teoricamente adsorvida) e proteína dessorvida (em relação à concentração de proteína teoricamente adsorvida), conforme resultados apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Dessorção de lipase de mamona adsorvida em suportes hidrofóbico e iônico. Foram utilizadas solução SDS 20 mM para o suporte SMMp octil e NaCl 5M para os suportes Streamline SP XL e SMMp amino. A atividade foi determinada pela hidrólise do *p*-NPB em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,5 a 25°C. A concentração de proteínas determinadas pela metodologia descrita por Bradford (1976).

	Atividade dessorvida (%)*	Proteína dessorvida (%)#	Atividade específica (U _{p-NPB} /mg)
SMMp octil	0,00	10,88	0,00
Streamline SP XL	0,00	5,28	0,00
SMMp amino	0,04	23,30	0,003

* Atividade hidrolítica dessorvida / atividade teoricamente adsorvida

Concentração de proteína dessorvida / proteína teoricamente adsorvida

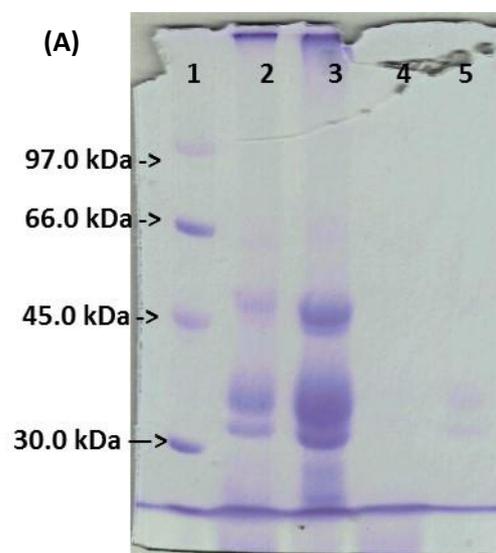
Para os suportes SMMp octil e Streamline SP XL não foi detectada atividade hidrolítica nos sobrenadantes. A ausência de atividade é esperada, uma vez que aproximadamente 89% e 95% da proteína adsorvida permaneceu aderida aos suportes, respectivamente. Por outro lado, aproximadamente 35% da atividade

da lipase adsorvida no suporte SMMp amino foi detectada no sobrenadante após o processo de dessorção; sendo que 23% das proteínas aderidas aos suportes foram medidas no sobrenadante.

O fato da lipase não ter sido dessorvida dos suportes SMMp octil e Streamline SP XL nas condições empregadas indica que a enzima interage fortemente com esses materiais. Embora tenha sido possível medir a concentração de proteínas em todos os sobrenadantes, os resultados obtidos com os suportes SMMp octil e Streamline SP XL em termos de atividade e de atividade específica indicam que a metodologia utilizada para a dessorção das proteínas aderidas aos suportes pode ser aprimorada. Uma estratégia seria variar o pH da solução de dessorção. Outra possibilidade seria a variação da força iônica do sobrenadante ou o uso de tensoativos, como Triton-X.

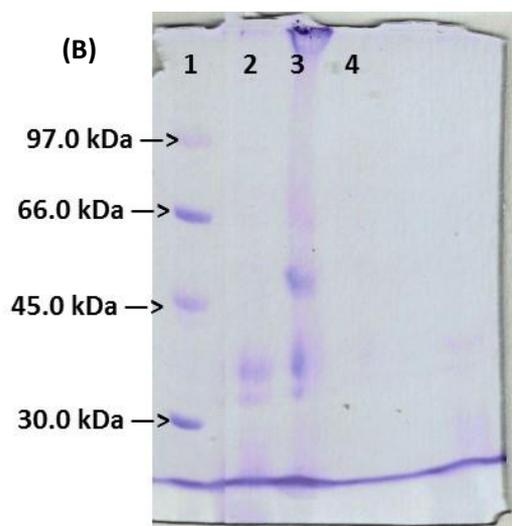
A Figura 4.19 apresenta o perfil eletroforético das proteínas adsorvidas nos suportes e seus respectivos sobrenadantes. Nota-se que embora as proteínas tenham sido adsorvidas nos suportes, foram poucas as bandas visíveis nos géis de acrilamida, com exceção da resina Streamline SP XL. Para este suporte, é possível observar que as proteínas com diferentes massas moleculares foram adsorvidas; e a canaleta do sobrenadante com poucas proteínas remanescentes. Também não foi possível visualizar bandas nos sobrenadantes dessorvidos, provavelmente devido à baixa concentração de proteínas.

Figura 4.19 - Eletroforese SDS-PAGE em condições desnaturantes da adsorção de lipase de mamona em (A) SMMp octil, (B) SMMp amino e (C) resina Streamline SP XL.



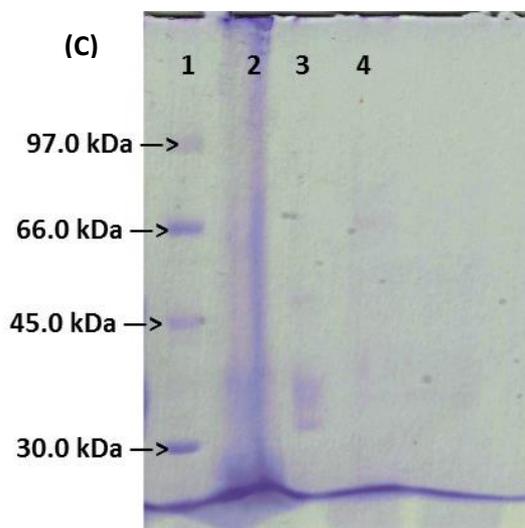
Canaletas gel A:

1. Marcador de massa molecular em kDa
2. Suporte SMMp octil
3. Sobrenadante pós-adsorção
4. Sobrenadante dessorção
5. Sobrenadante dessorção dialisado



Canaletas gel B:

1. Marcador de massa molecular kDa
2. Suporte SMMp amino
3. Sobrenadante pós-adsorção
4. Sobrenadante dessorção



Canaletas gel C:

1. Marcador de massa molecular em kDa
2. Suporte Streamline SP XL
3. Sobrenadante pós-adsorção
4. Sobrenadante dessorção

Ao se avaliar os resultados de adsorção e dessorção nos três suportes utilizados, notou-se quem os resultados mais promissores em termos de atividade específica e proteínas dessorvidas foram obtidos quando o suporte SMMp amino foi empregado. Desta forma, verificou-se a influência da concentração de grupos ativos na superfície do suporte sobre a adsorção da lipase de mamona extraída em fase aquosa. Foram utilizados suportes previamente ativados com grupos amino usando o reagente APTES na concentração 0,1 e 1,0 mmol/g de suporte. Os resultados obtidos encontram-se listados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Adsorção de lipase de mamona em suportes SMMp amino 0,1 e 1,0 mmol/g de suporte. Adsorções realizadas sob agitação constante a 25 °C por 12 horas. A atividade catalítica foi determinada pela hidrólise do *p*-NPB em reator, utilizando tampão citrato 50 mM, pH 4,5 a 25°C. Concentração de proteínas determinadas pela metodologia descrita por Bradford (1976). Experimentos realizados em duplicata.

	R_{Ads} (%)	A_{Rec} (%)	Proteína adsorvida (%)	Atividade específica ($U_{p\text{-NPB}}/\text{mg}$)*
SMMp amino 0,1	83,18	3,66	51,57	0,05
SMMp amino 1,0	58,25	4,12	68,70	0,14

R_{Ads} : Rendimento de adsorção (atividade hidrolítica desaparecida no sobrenadante durante a adsorção)(%); A_{Rec} : Atividade recuperada (%); P_{Ads} : Proteína adsorvida (%); *: Atividade específica do sobrenadante após realizada a adsorção. Atividade específica do controle foi de 0,304 $U_{p\text{-NPB}}/\text{mg}$ de proteína.

Observa-se que tanto no suporte ativado com 0,1 como com 1,0 mmol APTES/g foi possível medir a atividade hidrolítica diretamente nos derivados, apesar desta ter sido baixa. Embora as concentrações de grupos ativos nas superfícies das partículas sejam diferentes, não houve uma diferença significativa em termos de atividade recuperada para ambos os suportes indicando que a lipase de mamona possui grande sensibilidade ao interagir com superfícies perdendo suas propriedades catalíticas. A concentração de proteínas adsorvidas no suporte SMMp amino 1,0 foi ligeiramente superior à do suporte 0,1 mmol/g.

Contudo, o rendimento de adsorção do suporte SMMp amino 0,1 foi superior ao do suporte SMMp amino 1,0 (ver Tabela 4.7). A adsorção de proteínas em um determinado suporte poroso pode variar de acordo com a afinidade da molécula alvo e dos contaminantes a este suporte, sendo um processo

extremamente complexo. A adsorção de proteínas com alta densidade de cargas negativas e principalmente proteínas de alta massa molecular serão favorecidas pela redução da densidade de grupos carregados positivamente na superfície do material (PESSELA et al., 2004). Neste contexto, a diminuição da densidade de grupos na superfície do suporte pode favorecer a adsorção da lipase de mamona, que é uma enzima com alta massa molecular, e desfavorecer a adsorção de contaminantes. Esse comportamento ficou mais evidente quando as atividades específicas dos sobrenadantes foram avaliadas. Nota-se que o uso do suporte ativado com 0,1 mmol de APTES/g de suporte resultou em uma redução em 84% da atividade específica do sobrenadante; enquanto o suporte ativado com 1,0 mmol/g manteve 50% da atividade específica do sobrenadante inicial. Estes resultados indicam que a purificação da lipase de mamona ocorre mais seletivamente quando este suporte é utilizado.

A Tabela 4.8 apresenta a atividade mensurada nos sobrenadantes após a etapa de dessorção, na qual foi extremamente baixa; representando menos de 1% da atividade teoricamente adsorvida nos suportes. Em termos de proteína dessorvida, aproximadamente 50% das proteínas adsorvidas foram eluídas dos suportes. A adsorção de proteínas, incluindo enzimas, aos suportes iônicos ocorre por interações entre as regiões carregadas negativamente das enzimas e os grupos amino presentes na superfície do suporte (AHMED; AHMED, 2004). Ao longo do processo de adsorção e dessorção, podem ocorrer distorções na estrutura tridimensional da enzima, resultando em uma redução de sua atividade catalítica ou na sua completa inativação (BRENA; GONZALEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013).

Tabela 4.8 – Dessorção de lipase de mamona adsorvida em suporte SMMp amino 0,1 e 1,0 em solução NaCl 5M. Os suportes foram incubados sob agitação constante a 25 °C por 1 hora. A atividade foi determinada pela hidrólise do *p*-NPB em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,5 a 25°C. A concentração de proteínas determinadas pela metodologia descrita por Bradford (1976).

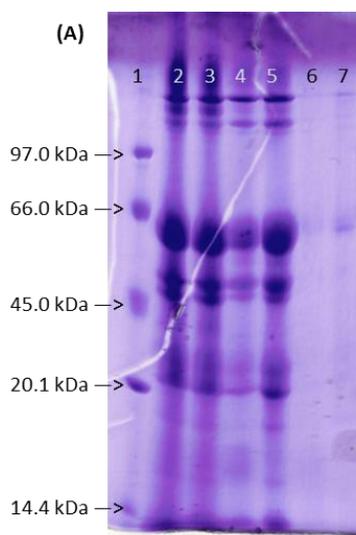
	Atividade dessorvida (%)*	Proteína dessorvida (%)#	Atividade específica (U _{<i>p</i>-NPB} /mg)
SMMp amino 0,1	0,09	51,61	0,0003
SMMp amino 1,0	0,05	46,75	0,0001

* Atividade hidrolítica dessorvida / atividade teoricamente adsorvida

Concentração de proteína dessorvida / proteína teoricamente adsorvida

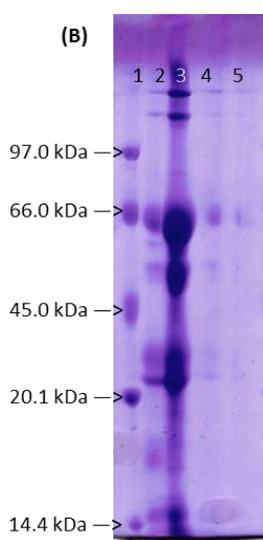
A Figura 4.20 apresenta a eletroforese dos suportes e seus respectivos sobrenadantes. Pode-se observar pela primeira vez em ambos os suportes uma banda marcada na região de 66 kDa, possivelmente referente à lipase de mamona adsorvida nos suportes. Contudo, novamente não foi possível observar a presença de bandas nos sobrenadante de dessorção. Apesar disso, os resultados de dessorção em termos de proteína e principalmente a ausência de proteínas nos suportes após a dessorção avaliados por eletroforese indicam que muito possivelmente a lipase de mamona foi dessorvida do material; porém, em uma forma inativa

Figura 4.20 – Eletroforese SDS-PAGE em condições desnaturantes da adsorção de lipase de mamona em (A) SMMp amino 0,1 e (B) SMMp amino 1,0 mmol de ATPES/g de suporte



Canaletas gel A:

1. Marcador de peso molecular em kDa
2. Sobrenadante tempo zero
3. Sobrenadante controle
4. Derivado SMMp amino 0,1
5. Sobrenadante pós-adsorção SMMp amino 0,1
6. Derivado pós-dessorção SMMp amino 0,1
7. Sobrenadante dessorção SMMp amino 0,1



Canaletas gel B:

1. Marcador de peso molecular em kDa
2. Derivado SMMp amino 1,0
3. Sobrenadante pós-adsorção SMMp amino 1,0
4. Derivado pós-dessorção SMMp amino 1,0
5. Sobrenadante dessorção SMMp amino 1,0

São poucos os trabalhos na literatura que reportam a adsorção de lipases vegetais em diferentes suportes, especialmente que utilizem a metodologia de adsorção com sucesso. Os resultados de adsorção da lipase de mamona em suportes ativados com grupo amino indicam que, diferentemente das demais lipases (que preferencialmente se adsorvem em suportes hidrofóbicos), a lipase de mamona é capaz de ligar às cargas positivas presentes na superfície do suporte.

Contudo, a lipase de mamona se mostrou muito sensível a interações com a superfície dos suportes perdendo sua atividade catalítica, provavelmente por alterações conformacionais, quando adsorvida e não demonstrando atividade após dessorção mesmo quando suportes contendo baixa densidade de grupos amino em sua superfície foram utilizados. O comportamento catalítico desta lipase em relação a mudanças de pH (que atua estritamente em valores de pH ácidos) é um indicativo de sua sensibilidade a pequenas alterações estruturais ocasionadas pelo meio e pode explicar porque a enzima perdeu atividade quando adsorvida a suportes insolúveis. Neste contexto, mesmo alterações estruturais leves podem ocasionar perda de atividade catalítica, que dependendo do grau podem ser até mesmo irreversíveis especialmente ao se levar conta que a lipase em questão é glicosilada. A presença de glicosilados pode interferir no re-novelamento de proteínas após processos de desnaturação (ALBERTS et al., 2009; PALOMO, J. M. et al., 2013).

5 CONCLUSÕES

A lipase de mamona se mostra uma interessante alternativa biotecnológica aos catalisadores químicos empregados na síntese de ésteres alquílicos por hidroesterificação devido ao seu reduzido custo comparado às demais lipases, o que motivou o estudo aqui realizado.

Na obtenção do extrato sólido de mamona verificou-se que:

- ✓ Quatro horas mostrou-se o tempo ideal de incubação em acetona gelada para remoção de triglicerídeos e ácidos graxos livres de sementes de mamona não germinadas, resultando em um extrato com elevada atividade lipolítica.
- ✓ As lavagens posteriores causam perda de atividade sendo justificáveis apenas nos casos onde seja necessária a remoção completa de resíduos de lipídeos.

A caracterização da lipase presente no ESM revelou que:

- ✓ As atividades catalíticas para diferentes substratos na hidrólise (óleo de macaúba, azeite de oliva e tributirina) e na esterificação (ácido butanoico e ácido oleico com butanol) e na transesterificação (óleo de soja e etanol), as duas últimas reações na presença de heptano: observou-se cerca de 200U/gESM para óleos e 80U/gde ESM para tributirina, mas não foi detectada atividade de esterificação, nem de transesterificação em nenhum caso, possivelmente devido à presença do solvente orgânico nas duas últimas reações.
- ✓ Estabilidade térmica: os testes nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C e 50°C mostraram que a enzima perde rapidamente atividade a temperaturas acima da ambiente.
- ✓ Estabilidade na presença de etanol: a incubação de ESM na presença de óleo de soja e etanol mostrou haver perda de atividade devido ao etanol, o que deve explicar a impossibilidade de catálise de reações de esterificação e transesterificação, já que estas ocorriam na presença de solvente orgânico.

Quanto ao estudo cinético das reações de hidrólise de óleo de soja e de macaúba catalisadas por ESM:

- ✓ Hidrólises de 10% óleo de soja, 2% ESM, em água, nas temperaturas de 25°C, 37°C e 50°C, mostrou ser 37°C a temperatura mais adequada para a reação.
- ✓ Hidrólises a longo termo de 10% óleo de soja e 10% óleo de macaúba, realizadas a 37°C, nas concentrações de ESM 2 a 6% m/v, em água ou tampão

acetato de sódio 100mM ou na presença de 100mM de cloreto de sódio mostraram que há aumento da velocidade da reação na presença de Na^+ .

- ✓ A conversão de 100% do óleo de soja foi atingida em 6 horas em água e na metade do tempo na presença de sódio (solução NaCl 100 mM). Contudo, o íon não afetou a conversão de 90% de óleo macaúba em 4 horas, possivelmente devido às diferentes características do substrato. As viscosidades dos meios são diferentes, refletindo diretamente na área de contato enzima-substrato. Esse ponto deverá ser mais estudado em trabalhos futuros.
- ✓ Velocidades iniciais das hidrólises de 10% óleo de soja e 10% óleo de macaúba, a 37°C, nas concentrações de ESM 2 a 6% m/v, mostraram que a velocidade varia linearmente com a C_{ESM} até 4%. Foi selecionado então 1% para estudo da influência da concentração de substrato na velocidade inicial de hidrólise de óleo de soja.
- ✓ Influência da concentração de substrato: o modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato representou bem o comportamento das velocidades iniciais da reação para diferentes concentrações iniciais de substrato, com um coeficiente de correlação de 0,96. Foram estimados os seguintes valores para os parâmetros cinéticos do modelo: $V_{\text{Máx}}$ ($2,85 \pm 0,75$ mM/min), K_M ($182,95 \pm 65,80$ mM) e K_I ($217,23 \pm 95,34$ mM).

Esses resultados revelam aplicação promissora de ESM como biocatalisador robusto na hidrólise de óleos vegetais visando à produção de concentrado de ácidos graxos livres (AGL).

Nas etapas de síntese de ésteres de ácidos graxos:

- ✓ Os ácidos graxos livres hidrolisados por ESM purificados foram empregados na síntese de ésteres etílicos por reação de esterificação com etanol em meio isento de solventes, utilizando-se como biocatalisador lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) imobilizada covalentemente em resina epóxi. A máxima conversão em ésteres, de 85%, foi obtida após 2 horas de reação empregando AGL do óleo de soja; e conversão de 71% dos AGL de macaúba após 6 horas de reação.
- ✓ Ensaios paralelos verificaram que não houve evaporação do etanol em virtude da agitação do sistema reacional. Verificou-se a perda de atividade do catalisador ao logo das reações de síntese de ésteres etílicos. Além desse efeito, a máxima

conversão alcançada nos ensaios de síntese pode ser atribuída à viscosidade do meio reacional e à afinidade da lipase pelos óleos vegetais.

A baixa estabilidade térmica da lipase de mamona motivou a realização do estudo preliminar de purificação da enzima presente no ESM, visando sua posterior imobilização. A imobilização possibilita sua reutilização e aumento de estabilidade, dependendo da estratégia utilizada. Nos ensaios preliminares de purificação da lipase de mamona:

- ✓ Houve uma melhor extração da lipase em fase aquosa em tampões de pHs neutros e alcalinos (em termos de atividade lipolítica). Esses resultados apontam que a extração em pHs mais elevados não provoca sua inativação permanente, haja visto a atividade observada quando exposta a pHs ácidos.
- ✓ Dentre os tampões utilizados para a extração da lipase, obteve-se a máxima seletividade na extração em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,0 e máximo rendimento em termos de proteínas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, com uma atividade específica de 1,02 e 0,46 U_{TBU}/mg de proteína, respectivamente.

Nos ensaios de adsorção, os resultados preliminares obtidos mostraram que:

- ✓ Quando o suporte hidrofóbico SMMp octil foi utilizado, um rendimento de adsorção de 30% (em termos de atividade) foi alcançado, com 35% das proteínas do extrato adsorvidas no suporte. Todavia, não foi detectada atividade hidrolítica nos derivados.
- ✓ Em termos de seletividade, as partículas magnéticas recobertas com sílica ativadas com grupos amino na superfície foram capazes de adsorver de maneira seletiva as lipases de mamona em solução - 26,95% das proteínas do sobrenadante, com um rendimento de adsorção de 67%, sendo a atividade catalítica observada tanto nos derivados como nos sobrenadantes da dessorção.
- ✓ Os ensaios de adsorção foram otimizados com o uso de suportes SMMp amino com baixa densidade de grupos reativos na superfície do suporte. Para o suporte SMMp amino 0,1 mmol APTES/g de suporte foi utilizado, foi obtido 83% de rendimento de adsorção com uma atividade recuperada de 3,66%, sendo que 50% das proteínas foram eluídas do suporte.

Esses resultados preliminares apontam que purificação e imobilização da lipase de mamona em uma única etapa pode ser realizada utilizando uma técnica simples e seletiva.

A lipase de mamona se mostra uma interessante alternativa biotecnológica aos catalisadores químicos empregados na síntese de biodiesel por hidroesterificação. Os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram a obtenção de um biocatalisador de baixo custo e com alta atividade hidrolítica. Os AGL purificados gerados na reação de hidrólise catalisada pelo extrato sólido de mamona podem ser utilizados como substrato ou compostos intermediários para produzir outros compostos de interesse industrial, tais como biolubrificantes, biocombustíveis (biodiesel), como aditivos melhoradores de fluidez a frio dos combustíveis diesel (metacrilatos de alquila e poliestireno-co-alquil metacrilatos) e ésteres de esteróis, uma classe de precursores de uma grande variedade de metabolitos (prostaglandinas, leucotrienos e hidroxí-ácidos graxos) com funções biológicas.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Validar os parâmetros cinéticos estimados no estudo da cinética de hidrólise do óleo de soja;
- Estudar a cinética de extração da lipase de mamona em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,0 e fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0;
- Caracterizar a lipase de mamona extraída em fase aquosa, quanto a pH e temperatura de máxima atividade catalítica, estabilidade térmica e estabilidade frente a solventes orgânicos;
- Realizar ensaios de adsorção em suportes catiônicos, assim como avaliar o desempenho de outros grupos funcionais;
- Investigar a dessorção da lipase previamente adsorvida nos suportes;
- Avaliar o desempenho da lipase de mamona adsorvida nas reações de hidrólise de óleos vegetais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor sp.* **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 5, p. 589-595, 2003.

ABREU, I. S. et al. First karyotype, DNA C-value and AT/GC base composition of macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) – a promising plant for biodiesel production. **Australian Journal of Botany**, v. 59, n. 2, p. 149-155, 2011.

ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406-6436, 2013.

AEHLE, W. **Enzymes in Industry**. Weinheim: Wiley, 2007. 489 p.

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315-321, 2014.

AHMED, H.; AHMED, H. **Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization**. Boca Raton: CRC Press, 2005. 408 p.

AL-ZUHAIR, S.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1155-1163, 2003.

ALBERTS, B. et al. **Essential Cell Biology**. 3 ed. New York: Garland Science, 2009. 860 p.

ALMARALES, A. et al. Hydroesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's biomass to biodiesel on Al₂O₃ supported Nb₂O₅ catalyst. **Natural Science**, v. 4, n. 04, p. 204-210, 2012.

ALTAF, A. et al. Acid Lipase of Castor Bean Lipid Bodies : Isolation and Characterisation. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 13-18, 1997.

ANANDAN, S. et al. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal Feed Science and Technology**, v. 120, n. 1-2, p. 159-168, 2005.

ANP. **Boletim mensal do biodiesel**: Jan. 2015. Brasilia, 2015. 13p.

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

AVELAR, M. H. M. et al. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 44, n. 0, p. 452-458, 2013.

AZOCAR, L. et al. Enzymatic biodiesel production kinetics using co-solvent and an anhydrous medium: a strategy to improve lipase performance in a semi-continuous reactor. **New Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 422-9, 2014.

BAADHE, R. R.; POTUMARTHI, R.; GUPTA, V. K. Lipase-Catalyzed Biodiesel Production: Technical Challenges. In: GUPTA, V. K. et al. **Bioenergy Research: Advances and Applications**. Amsterdam: Elsevier, 2014. p.119-129.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. New York: McGraw-Hill, 1977. 753 p.

BAJAJ, A. et al. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 9-14, 2010.

BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties - a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15-29, 2010.

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

BEISSON, F. et al. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 2, p. 133-153, 2000.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 7ed. New York: W. H. Freeman, 2010. 1120 p.

BERGMANN, J. C. et al. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, n. 0, p. 411-420, 2013.

BORGES, M. E.; DÍAZ, L. Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil esterification and transesterification reactions: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 2839-2849, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRANDON, D. L.; KORN, A. M.; YANG, L. L. Immunosorbent analysis of ricin contamination in milk using colorimetric, chemiluminescent and electrochemiluminescent detection. **Food and Agricultural Immunology**, v. 25, n. 2, p. 160-172, 2014.

BRENA, B.; GONZALEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. **Methods in Molecular Biology**, v. 1051, p. 15-31, 2013.

BRESSANI, A. P. et al. Production of alkyl esters from macaw palm oil by a sequential hydrolysis/esterification process using heterogeneous biocatalysts: optimization by response surface methodology. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 2, p. 287-297, 2015.

BROCKERHOFF, H.; JENSEN, R. G. **Lipolytic enzymes**. New York: Academic Press, 1974. 342 p.

CARVALHO, A. K. F. et al. Assessing the potential of non-edible oils and residual fat to be used as a feedstock source in the enzymatic ethanolysis reaction. **Industrial Crops and Products**, v. 50, n. 0, p. 485-493, 2013.

CASTRO, H. F. D. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. et al. Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 618692, 2010.

CHOWDHURY, A.; MITRA, D.; BISWAS, D. Biolubricant synthesis from waste cooking oil via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 139-144, 2013.

CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN, K.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, n. 0, p. 497-520, 2014.

CICONINI, G. et al. Biometry and oil contents of *Acrocomia aculeata* fruits from the Cerrados and Pantanal biomes in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 45, n. 0, p. 208-214, 2013.

COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Characterization of the pulp and kernel oils from *Syagrus oleracea*, *Syagrus romanzoffiana*, and *Acrocomia aculeata*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 8, p. C1156-61, 2011a.

_____. Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jervivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2139-2142, 2011b.

CORNISH-BOWDEN, A. **Fundamentals of Enzyme Kinetics**. 4ed. Berlin: Wiley-Blackwell, 2013. 473 p.

DA RÓS, P. C. M. et al. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5508-5516, 2010.

DE SOUSA, J. S. et al. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1-4, p. 133-137, 2010.

DEMIRBAS, A. **Biodiesel: A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines**. London: Springer, 2008. 208 p.

DENNISON, C. **A Guide to Protein Isolation**. 2 ed. London: Springer, 2003. 249 p.

DIAZ, G. C. et al. Hydroesterification of *nannochloropsis oculata* microalga's biomass to biodiesel using as catalyst pure niobium oxide (Nb_2O_5), niobium oxide

supported on alumina ($\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{Al}_2\text{O}_3$) and niobium oxide impregnated with phosphoric acid ($\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{H}_3\text{PO}_4$). **Current Organic Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 1350-1357, 2013.

DICOSIMO, R. et al. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437-6474, 2013.

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. 3ed. New York: Academic Press, 1964. 1116 p.

DORS, G. et al. Transesterification of palm oil catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* lipase in a packed-bed reactor. **Energy and Fuels**, v. 26, n. 9, p. 5977-5982, 2012.

EASTMOND, P. J. Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 44, p. 45540-5, 2004.

EMBRAPA. Embrapa soja. **Soja na alimentação**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=7>. Acesso em: 12/01/15.

ENTRESSANGLES, B.; DESNUELLE, P. Action of pancreatic lipase on aggregated glyceride molecules in an isotropic system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology**, v. 159, n. 2, p. 285-295, 1968.

EVANS, D. R. H.; ROMERO, J. K.; WESTOBY, M. Concentration of Proteins and Removal of Solutes. In: RICHARD, R. B. e MURRAY, P. D. **Methods in Enzymology**: Academic Press, volume 463, 2009. p.97-120.

FERNANDES, P.; CABRAL, J. M. S. Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success. In: SOETAERT, W. e VANDAMME, E. J. **Industrial Biotechnology**: Wiley-VCH, 2010. p.522.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 185-197, 1998.

FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; LARDIÈRES, J. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 1, n. 2, p. 127-134, 2000.

FRANSSEN, M. C. R. et al. Immobilised enzymes in biorenewables production. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6491-6533, 2013.

GHALY, A. E. et al. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 54-76, 2010.

GIORDANO, R. L. C. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de amido: inibição pelo produto**. 1987. 203 p. Dissertação (Mestrado) – Escola politécnica da USP, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.

GUI, M. M.; LEE, K. T.; BHATIA, S. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. **Energy**, v. 33, n. 11, p. 1646-1653, 2008.

GUISAN, J. M. New opportunities for immobilization of enzymes. **Methods in Molecular Biology**, v. 1051, p. 1-13, 2013.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; DIJKSTRA, A. J. **The Lipid Handbook** 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. 791 p.

HARRISON, R. G. et al. **Bioseparations Science and Engineering**. Oxford: Oxford University Press, 2003. 547 p.

HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. **Isolation and Purification of Proteins**. Boca Raton: CRC Press, 2003. 676 p.

HERNANDEZ-MARTIN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 277-86, 2008.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.

JANSON, J. C. **Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods, and Applications**. 2 ed. Weinheim: Wiley, 2011. 598p.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, n. 0, p. 228-240, 2013.

JUNGBAUER, A.; HAHN, R. Ion-Exchange Chromatography. In: BURGESS, R. R.; DEUTSCHER, M. P. **Guide to Protein Purification**. 2 ed. London: Academic Press, 2009. P. 349-371, (Methods in Enzimology, v. 463)

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.

KATOCH, R. **Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**. New York: Springer, 2011. 441 p.

KENNEDY, R. M. Hydrophobic chromatography. In: MURRAY, P. D. **Guide to Protein Purification**. London: Academic Press, 1990. p.339-343. (Methods in Enzimology, v. 182)

KNOTHE, G. et al. **Manual de biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. 352 p.

KOPP, W. **Síntese e ativação superficial de novos suports magnéticos para imobilização de enzimas**. 2013. Tese (Doutorado). Departamento de Engenharia Química, Departamento de Física, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

KOPP, W. et al. Synthesis and characterization of robust magnetic carriers for bioprocess applications. **Materials Science and Engineering: B**, v. 193, n. 0, p. 217-228, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 4, p. 500-518, 2010.

LEIVA-CANDIA, D. E. et al. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. **Fuel**, v. 123, n. 0, p. 33-42, 2014.

LESER, E. W.; ASENJO, J. A. Rational design of purification processes for recombinant proteins. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 584, n. 1, p. 43-57, 1992.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083-1095, 2010.

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

LIU, S. Enzymes. In: _____. **Bioprocess Engineering**. Amsterdam: Elsevier, 2013. p.323-390

LOPES, D. D. C. et al. Economic feasibility of biodiesel production from Macauba in Brazil. **Energy Economics**, v. 40, n. 0, p. 819-824, 2013.

MAESHIMA, M.; BEEVERS, H. Purification and Properties of Glyoxysomal Lipase from Castor Bean. **Plant Physiology**, v. 79, n. 2, p. 489-493, 1985.

MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Lipid Emulsions. In: SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. Weinheim: Wiley, 2005. 3636 p.

MCCUE, J. T. Theory and use of hydrophobic interaction chromatography in protein purification applications. In: BURGESS, R. R.; DEUTSCHER, M. P. **Guide to Protein Purification**. 2 ed. London: Academic Press, 2009. p.405-414, (Methods in Enzimology, v. 463)

MEKALA, N. K. et al. Current bioenergy researches: strengths and future challenges. In: GUPTA, et al. **Bioenergy Research: Advances and Applications**. Amsterdam: Elsevier, 2014. p.1-21.

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

MENDES, A. A. et al. Preparation and application of epoxy–chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. **Reactive and Functional Polymers**, v. 73, n. 1, p. 160-167, 2013.

MENDES, A. A. et al. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the

biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 109-115, 2011.

MENDES, A. A. et al. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 503-511, 2012.

MENG, X. et al. Highly efficient solvent-free synthesis of 1,3-diacylglycerols by lipase immobilised on nano-sized magnetite particles. **Food Chemistry**, v. 143, p. 319-24, 2014.

MOTTA, P. E. F. et al. Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 1023-1031, 2002.

MOURA, E. F. et al. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, v. 119, n. 4, p. 447-454, 2009.

MOUSSAVOU MOUNGUENGUI, R. W. et al. Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 39, n. 5, p. 441-456, 2013.

NARWAL, S.; GUPTA, R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 4, p. 479-490, 2013.

NASIR, N. F. et al. Process system engineering in biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 22, n. 0, p. 631-639, 2013.

NELSON, D. D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6 ed. New York: W.H. Freeman, 2011. 1158 p.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, n. 0, p. 71-92, 2013.

NOVOZYMES; A/S. Disponível em: < <http://www.novozymes.com/en/about-us/facts-about-Novozymes/Novozymes-history/Pages/default.aspx> >. Acesso em: novembro 2013.

ORY, R. Acid lipase of the castor bean. **Lipids**, v. 4, n. 3, p. 177-185, 1969.

PALOMO, J. M. et al. Improving lipase activity by immobilization and post-immobilization strategies. **Methods in Molecular Biology**, v. 1051, p. 255-73, 2013.

PALOMO, J. M. et al. 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, n. 0, p. 279-286, 2002.

PESSELA, B. C. C. et al. Ion exchange using poorly activated supports, an easy way for purification of large proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1034, n. 1–2, p. 155-159, 2004.

PHUAH, E.-T. et al. Kinetic study on partial hydrolysis of palm oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, n. 0, p. 91-97, 2012.

PIEROZAN, M. K. et al. Optimization of extraction of lipase from wheat seeds (*Triticum aestivum*) by response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9716-9721, 2009.

PINOTTI, L. M. **Produção e purificação de penicilina G acilase**. 2003. 270 p. Tese (Doutorado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

PIRES, T. P. et al. Ecophysiological traits of the macaw palm: A contribution towards the domestication of a novel oil crop. **Industrial Crops and Products**, v. 44, 2013.

POETSCH, J. et al. *Acrocomia aculeata* — a sustainable oil crop. **Rural** 21, v. 3, p. 41-44, 2012.

POPPE, J. K. et al. Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: characterization and application in transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 94, n. 0, p. 57-62, 2013.

RAMOS, M. J. et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 261-268, 2009.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3975-3981, 2008.

RIBEIRO, B. D. et al. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 615803, 2011.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, n. 1–2, p. 1-22, 2010.

RODRIGUES, R. C. et al. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized–stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1268-1273, 2010.

ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid–liquid reactor. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 947-953, 2001.

SAGIROGLU, A.; ARABACI, N. Sunflower seed lipase: extraction, purification, and characterization. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 37-51, 2005.

SALIHU, A. et al. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, n. 0, p. 36-44, 2012.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 1, p. 224-230, 2010.

SANGALETTI, N. et al. Enzymatic transesterification of soybean ethanolic miscella for biodiesel production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 11, p. 2098-2106, 2013.

SANTOS, H. O. D. **Conservação de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.)** 2010. 85 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SANTOS, K. C. et al. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, v. 49, n. 0, p. 462-470, 2013.

SBARDELOTTO, A.; LEANDRO, G. V. Escolha de cultivares de soja com base na composição química dos grãos como perspectiva para maximização dos lucros nas indústrias processadoras. **Ciência Rural**, v. 38, p. 614-619, 2008.

SETH, S. et al. An insight into plant lipase research – challenges encountered. **Protein Expression and Purification**, v. 95, n. 0, p. 13-21, 2014.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering: Basic concepts**. 2 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 553 p.

SILITONGA, A. S. et al. Overview properties of biodiesel diesel blends from edible and non-edible feedstock. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 22, n. 0, p. 346-360, 2013.

SILVA, W. C. et al. Influence of feedstock source on the biocatalyst stability and reactor performance in continuous biodiesel production. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 881-886, 2014.

SOARES, C. M. F. et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 79, n. 1-3, p. 745-757, 1999.

SOARES, D. et al. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, n. 0, p. 15-23, 2013.

SOETAERT, W.; VANDAMME, E. J. **Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success**. Weinheim: Wiley, 2010. 476 p.

SU, E.-Z. et al. Lipases in the castor bean seed of Chinese varieties: activity comparison, purification and characterization. **Journal of Shanghai University (English Edition)**, v. 14, n. 2, p. 137-144, 2010.

SUN, J. et al. Lipase-catalysed ester synthesis in solvent-free oil system: is it esterification or transesterification? **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2828-32, 2013.

TAN, H. W.; ABDUL AZIZ, A. R.; AROUA, M. K. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, n. 0, p. 118-127, 2013.

TÜTER, M. Castor bean lipase as a biocatalyst in the esterification of fatty acids to glycerol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 3, p. 417-420, 1998.

VERRALL, S. **Downstream processing of natural products: a practical handbook**. Weinheim: Wiley, 1996. 354 p.

VILLENEUVE, P. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 6, p. 308-317, 2003.

VILLENEUVE, P. et al. Lipase-catalyzed synthesis of canola phytosterols oleate esters as cholesterol lowering agents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 1, p. 150-155, 2005.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 4 ed. Weinheim: John Wiley & Sons, 2011. 1408 p.

WANDECK, F. A. **Oleaginosas nativas: aproveitamento para fins energéticos e industriais**. Gessy Lever, 1985. 29p.

WOODCOCK, L. L. et al. Enzymatic synthesis of a series of alkyl esters using novozyme 435 in a packed-bed, miniaturized, continuous flow reactor. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n. 6, p. 466-472, 2008.

XIE, W.; MA, N. Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 6, p. 890-896, 2010.

XUE, R.; WOODLEY, J. M. Process technology for multi-enzymatic reaction systems. **Bioresource Technology**, v. 115, n. 0, p. 183-195, 2012.

YAN, Y. et al. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. **Applied Energy**, v. 113, p. 1614-1631, 2014.

ANEXO A

A regulação do biodiesel combustível brasileiro é feita pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, no que tange a produção e a comercialização do biodiesel. A Tabela 1 apresenta as especificações a serem atendidas pela legislação brasileira, americana e europeia.

Tabela 1- Especificações do Biodiesel, segundo resolução ANP 14/2012 (Brasil), ASTM D6751 (EUA) e EN 14214 (União Europeia).

Aspecto	Unidade	ANP 14/2012	ASTM D6751	EN 14214
		Límpido e isento de impurezas, com anotação da temperatura do ensaio.		
Massa específica	kg/m ³	850 - 900, T = 20 °C	-	860 - 900, T = 15 °C
Viscosidade cinemática a 40 °C	mm ² /s	3,0 - 6,0	1,9 - 6,0	3,5 - 5,0
Teor de água, Máx	mg/kg	350	500	500
Ponto de fulgor, mín	°C	100	93	120
Teor de éster, mín	% massa	96,5	-	96,5
Resíduo de carbono, Máx	% massa	0,05 - Em 100% da amostra	0,05 - Em 100% da amostra.	0,3 - Em 10% da amostra.
Cinzas sulfatadas	% massa	0,02	0,02	0,02
Enxofre total, Máx	mg/kg	10	15	10
Sódio + Potássio, Máx	mg/kg	5	-	5
Cálcio + Magnésio, Máx	mg/kg	5	5	5
Fósforo, Máx	mg/kg	10	10	4
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, Máx	-	1	1	1
Número de cetano	-	Anotar	47 - Mín	51 - Mín
Ponto de entupimento de filtro frio, Máx	°C	19	-	De acordo com a região
Índice de acidez, Máx	mg KOH/g	0,5	0,05	0,5
Glicerol livre, Máx	% massa	0,02	0,02	0,02
Glicerol total, Máx	% massa	0,25	0,24	0,25
Monoacilglicerol, Máx	% massa	0,8	-	0,7
Diacilglicerol, Máx	% massa	0,2	-	0,2
Triacilglicerol, Máx	% massa	0,2	-	0,2
Metanol e/ou Etanol, Máx	% massa	0,2	0,2 - Metanol	0,2
Índice de iodo	g/100g	Anotar	-	120 - Máx
Estabilidade à oxidação a 110 °C, mín	h	6	3	8

Fonte: Resolução ANP nº 14 de 11.05.2012 – DOU 18.05.2012; American Society for Testing Materials ASTM D6751-12; European Standard EN 14214:2008.