

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES PELA TÉCNICA CLEA PARA
SÍNTESE DE BIODIESEL EM REATOR DE FLUXO EM VÓRTICE

MARGARITA DÍAZ RAMOS

São Carlos - SP

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES PELA TÉCNICA CLEA PARA
SÍNTESE DE BIODIESEL EM REATOR DE FLUXO EM VÓRTICE

MARGARITA DÍAZ RAMOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de doutor em Engenharia Química. Área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 30 de Outubro de 2017.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli (PPG-EQ/UFSCar)

Coorientador: Dr. William Kopp (Kopp Technologies, São Carlos)

São Carlos - SP

2017

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE MARGARITA DÍAZ RAMOS APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 30 DE OUTUBRO DE 2017.

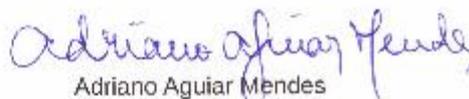
BANCA EXAMINADORA:



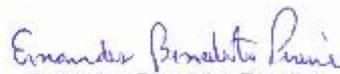
Paulo Waldir Tardioli
Orientador, UFSCar



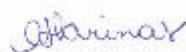
Willian Kopp
Coorientador, Kopp Technologies



Adriano Aguiar Mendes
UNIFAL



Ernandes Benedito Pereira
UNIFAL



Cristiane Sanchez Farinas
EMBRAPA/UFSCar

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Gloria Luz e Oscar Jhon, ao meu
namorado Diego, por todo o amor,
apoio, dedicação e incentivo durante
todos esses anos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e a toda minha família pelo grande carinho, apoio, confiança, e palavras de conforto para a conclusão deste trabalho.

Agradeço a todas as pessoas e instituições que foram essenciais na realização deste trabalho.

Ao orientador Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli pela confiança para realizar este trabalho, orientação, apoio e dedicação.

Ao Dr. Willian Kopp pela coorientação, dedicação, confiança, apoio e amizade.

À CAPES pela concessão da bolsa durante o doutorado. À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2016/10636-8 e ao CNPq (processo 405889-2016-0) pelo apoio financeiro.

Ao programa de pós-graduação em engenharia química, aos professores e funcionários.

Aos meus colegas e amigos do Departamento de Engenharia Química da UFSCar – Agnes, Mayerlenis, Vinicius, Felipe, Laiane, Murilo, Leticia, Erick, Thaís, Carlota pela convivência, amizade e companheirismo. Quero agradecer em especial à Jessica B. Carmello Dos Santos e Viviana González Gil pelo carinho, pelo apoio, por todos aqueles momentos que fizeram mais agradável este doutorado e pela amizade sincera.

RESUMO

Devido à heterogeneidade dos óleos vegetais usados na síntese de biodiesel, estes podem ser transformados mais rapidamente usando uma mistura constituída por lipases com diferentes atividades e especificidades, em vez de lipases únicas. Neste contexto, este trabalho de doutorado teve por objetivo avaliar a síntese enzimática de biodiesel em reator de fluxo em vórtice, catalisada por uma mistura de lipases que foram selecionadas e imobilizadas através de uma técnica de baixo custo conhecida como CLEA (do inglês cross-linked enzyme aggregate). Misturas de duas lipases de diferentes fontes incluindo as lipases de *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Candida antarctica* fração B (CALB), pâncreas de porco (LPP) e *Pseudomonas fluorescens* (LPF) foram avaliadas na transesterificação do óleo de soja. A mistura de LPP e LTL alcançou a maior concentração de ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAG) nas condições avaliadas, 22,03% com 8 h, enquanto que as lipases individuais LTL e LPP alcançaram 4,32% e 0,22% de EEAG, respectivamente. Essas lipases foram imobilizadas individualmente usando a técnica CLEA e avaliadas individualmente e misturadas na transesterificação etílica de óleo de soja. CLEA de LPP, preparado com proteína de soja, denominado LPP-PS-CLEA, alcançou em torno de 60% de EEAG, uma concentração 12 vezes maior que a alcançada com a LPP solúvel após 34 h de reação e com uma carga enzimática duas vezes mais baixa. CLEA de LTL foi preparado na presença do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS), denominado LTL-SDS-CLEA, e usado para compor uma mistura com LPP-PS-CLEA (50% - 50%, em atividade) para catalisar a transesterificação etílica do óleo de soja. O uso da mistura, em 48 h de reação, resultou em um aumento na concentração final de EEAG de aproximadamente 20% em relação aos CLEAs individuais. Com 10 h de reação, a mistura de CLEAs alcançou 90% de concentração mássica de EEAG. Finalmente, a mistura dos CLEAs foi avaliada no reator de fluxo em vórtice, alcançando 86,1% de EEAG com 6 h de reação e mantendo entorno de 80% da atividade durante 5 ciclos de reação. A mistura de CLEAs de LPP e LTL se mostrou promissora na síntese de biodiesel, particularmente pelo uso de uma lipase de baixo custo (LPP) e de uma técnica simples de imobilização de enzimas sem a necessidade do uso de suportes sólidos.

Palavras-chave: Biodiesel; Cross-linked enzyme aggregates CLEA; Lipase; Transesterificação; Imobilização; Reator de fluxo em vórtice.

ABSTRACT

Due to the heterogeneity of the vegetable oils used in the synthesis of biodiesel, they can be transformed more quickly using a mixture consisting of lipases with different activities and specificities instead of single lipases. In this context, this PhD work aimed to evaluate the enzymatic synthesis of biodiesel in vortex flow reactor catalyzed with a mixture of lipases. The lipases were selected and later immobilized by a low-cost technique known as CLEA (cross-linked enzyme aggregate). Mixtures of two lipases from different sources including *Thermomyces lanuginosus* (TLL), *Candida antarctica* fraction B (CALB), porcine pancreas (PPL) and *Pseudomonas fluorescens* (PFL) lipases were evaluated in the transesterification of soybean oil. The mixture of 50 % of PPL and 50 % of TLL reached the highest concentration of fatty acid ethyl esters (FAEE). Under the conditions evaluated, it was obtained 22.03% in 8 h, whereas the individual lipases, TLL and PPL reached 4.32 % and 0.22 % of FAEE, respectively. These lipases were individually immobilized by CLEA technique and evaluated (individually and mixed) in the ethylic transesterification of soybean oil. The PPL CLEA, called PPL-SP-CLEA, reached around 60 % FAEE, a concentration 12 times higher than that achieved with soluble PPL after 34 h of reaction and with a 2-fold lower enzymatic loading. On the other hand, the LTL CLEA, called LTL-SDS-CLEA, was prepared using ethanol as a precipitant, the surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS) and glutaraldehyde. The CLEAs LPP-PS-CLEA and LTL-SDS-CLEA were used in a mixture (50 % - 50 %) to catalyze the transesterification of soybean oil. The use of the mixture within 48 hours of reaction resulted in the increase of the final FAEE concentration of almost 20% relative to the individual CLEAs. Through 10 h of reaction, the mixture of CLEAs reached 90% of the FAEE mass concentration. Finally, this mixture was evaluated in the vortex flow reactor, reaching 86.1% of FAEE in 6 h of reaction and saving nearly 80% of activity through 5 cycles of reaction. The mixture of CLEAs LPP-PS-CLEA and LTL-SDS-CLEA showed to be a potential approach to improve the rate of the transesterification reaction, by the synergistic action of lipases.

Keywords: Biodiesel; Cross-linked enzyme aggregates CLEA; Lipase; Transesterification; Immobilization; Vortex flow reactor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2-1: Perfil brasileiro de matérias-primas consumidas para produção de biodiesel, atualizado em 28/09/2017. Fonte: ANP, conforme Resolução ANP nº 17/2004 e Resolução ANP nº 30/2013. 9
- Figura 2-2: Transesterificação de triglicerídeos, onde R, R', R'', R''' representam as cadeias carbônicas dos ácidos graxos e álcool. Adaptado de TAN et al. (2003)..... 9
- Figura 2-3: Ação catalítica natural das lipases. (A) Reação de hidrólise do triglicerídeo formando glicerol e ácidos graxos, (B) Reação inversa que combina o glicerol e os ácidos graxos para formar o triglicerídeo. Adaptado de JAEGER; REETZ, 1998..... 12
- Figura 2-4: Fenômeno de ativação interfacial das lipases em superfícies hidrofóbicas Adaptado de HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009. 14
- Figura 2-5: Reação catalisada por lipase 1,3 específica. Adaptado de KAPOOR; GUPTA, 2012. 16
- Figura 2-6: Migração acil de lipases 1,3 específicas. Adaptado de KAPOOR; GUPTA, 2012. 17
- Figura 2-7: Representação esquemática de um agregado bimolecular da LPF (PDB: 3LIP). Azul claro: amino terminal; azul escuro: resíduos Lys; vermelho: os centros ativos da lipase. Fonte: DE LIMA et al., 2013 19
- Figura 2-8: Estrutura 3D da superfície da LPF na forma “aberta” (A) Face da tampa, os resíduos da tampa em laranja e os resíduos hidrofóbicos em amarelo (B) Face oposta à tampa, os resíduos de lisinas em azul. Fonte: PALOMO et al., 2005..... 19
- Figura 2-9: Estrutura das formas aberta e fechada da LTL. Fonte (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010)..... 20
- Figura 2-10: Estrutura 3D da superfície da CALB mostrando as faces da tampa (esquerda) e oposta (direita) (Protein Data Bank, code PDB 1TCA). Resíduos azuis - hidrofóbicos; vermelho - Lys e amino terminal; Resíduos verdes - Asp e Glu. Fonte (VESCOVI et al., 2016a) 22
- Figura 2-11: Estrutura 3D do complexo LPP - Colipase – Éter monoctílico de tetraetilenoglicol (TGME) (PDB: 1ETH). Construída usando PyMOL Molecular Graphics System, v 1.7.4. Acervo próprio. 24
- Figura 2-12: Métodos de imobilização: A) Adsorção; B) Ligação covalente; C) Entrecruzamento e D) Retenção física. Fonte: AMINI et al. (2017)..... 26

Figura 2-13:	Imobilização de enzimas pela técnica CLEA	29
Figura 2-14:	Reator de fluxo em vórtice. Adaptado de (GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000).....	31
Figura 2-15:	(a) Regime de Couette laminar, (b) regime de Taylor laminar, (c) regime de vórtices “wavy”, (d) e turbulento. Fonte: ilustração obtida no site < https://www.tvt.kit.edu/21_1899.php >.....	32
Figura 3-1:	Configuração dos reatores usados para avaliar a estabilidade operacional do LPP-PS-CLEA. a) Reator de fluxo em vórtice, b) Reator tipo cesto.	42
Figura 4-1:	Perfil de concentração mássica de EEAG alcançado pelas lipases livres individuais e misturadas na reação de transesterificação de óleo de soja com etanol a 30°C, razão molar óleo/álcool de 1:5, oferecendo uma carga enzimática total de 500 TBU/g de óleo.....	48
Figura 4-2:	Perfil de concentração mássica de EEAG alcançado pelos CLEAs na reação de transesterificação de óleo de soja com etanol a 30°C, razão molar óleo/álcool de 1:5, oferecendo uma carga enzimática de 2500 TBU/g de óleo.....	51
Figura 4-3:	Efeito da proteína de soja na atividade recuperada dos CLEAs de LPP	57
Figura 4-4:	Efeito da concentração de glutaraldeído na atividade recuperada e no rendimento de imobilização do LPP-PS-CLEA.	59
Figura 4-5:	Efeito da concentração de polialdeído-amido na atividade recuperada e no rendimento de imobilização do LPP-PS-CLEA	60
Figura 4-6:	Perfil de concentração mássica de EEAG obtido com a LPP solúvel e o LPP-PS-CLEA. Condições de reação: razão molar óleo/etanol de 1:5, oferecendo uma carga enzimática de 2600 TBU/g óleo, 30°C, 300 rpm em shaker.	63
Figura 4-7:	Número de ciclos do LPP-PS-CLEA na transesterificação de óleo de soja com etanol em três diferentes sistemas de reação. Condições de reação: razão molar óleo/etanol de 1:5, oferecendo uma carga enzimática de 3500 TBU/g óleo, 30°C, 300 rpm em diferentes	65
Figura 4-8:	Perfil de concentração mássica de EEAG obtido pelos LTL-SDS-CLEA e LPP-PS-CLEA individuais e misturados na transesterificação de óleo de soja. Condições de reação: razão molar óleo/etanol de 1:5, oferecendo uma carga enzimática de 3000 TBU/g óleo com os CLEAs individuais ou 6000 TBU/g de óleo com a mistura dos CLEAs, 30°C, 300 rpm em shaker.	74

- Figura 4-9: Efeito da razão molar de óleo de soja/etanol na concentração mássica de EEAG obtida pela mistura dos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA, oferecendo uma carga enzimática de 500 TBU/g óleo de soja com 18h e 24h..... 76
- Figura 4-10: Perfis de concentração mássica de EEAG alcançados pela mistura de CLEAs com razões molares óleo de soja/etanol de 1:3 e 1:5..... 77
- Figura 4-11: Perfil de concentração mássica de EEAG alcançado pela mistura de CLEAs numa razão molar de óleo de soja/etanol de 1:3 oferecendo uma carga enzimática de 6000 TBU/g de óleo no reator de fluxo em vórtice 78
- Figura 4-12: Reuso da mistura de CLEAs na transesterificação de óleo de soja com etanol durante 6 h a 30°C, oferecendo uma carga enzimática de 6000 TBU/g óleo no reator de fluxo em vórtice. 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-1:	Produção de Biodiesel com a LPP imobilizada.	3
Tabela 2-1:	Classificação dos biocombustíveis. Adaptado de (RODIONOVA et al., 2017).	7
Tabela 2-2:	Composição dos resíduos de aminoácido da LPF. Adaptado de (SCHRAG et al., 1997).....	18
Tabela 2-3:	Composição dos resíduos de aminoácido da LTL. Adaptado de (DEREWENDA et al., 1994).....	21
Tabela 2-4:	Composição dos resíduos de aminoácido da CALB. Adaptado de (UPPENBERG et al., 1994).....	23
Tabela 2-5:	Composição dos resíduos de aminoácido da LPP. Adaptado de (HERMOSO et al., 1996).....	25
Tabela 2-6:	Vantagens e desvantagens dos métodos de imobilização. Fonte: (JEGANNATHAN et al., 2008; ZHAO et al., 2015).....	27
Tabela 3-1:	Ácidos graxos presentes no óleo de soja Liza®	36
Tabela 3-2:	Atividade enzimática oferecida nas reações de transesterificação	41
Tabela 4-1:	Caraterização das enzimas comerciais.....	45
Tabela 4-2:	Concentração mássica de EEAG alcançada na transesterificação do óleo de soja com as lipases livres individuais e misturadas, carga enzimática total oferecida de 500 TBU/g de óleo, razão molar óleo de soja/etanol de 1: 5, a 30°C, 40°C e 50°C, 300 rpm, durante 8 h de reação.	46
Tabela 4-3:	Ensaio de transesterificação realizados para confirmar a ação sinérgica das lipases	49
Tabela 4-4:	Atividade recuperada global e atividade específica dos CLEAs de LPP, LTL e Combi-CLEA na presença de proteína de soja, preparados nos experimentos preliminares	50
Tabela 4-5:	CLEAs de lipase pancreática reportadas na literatura	53
Tabela 4-6:	Rendimento de precipitação para a lipase LPP e atividade recuperada do CLEA de LPP após entrecruzamento com glutaraldeído.	54
Tabela 4-7:	Resultados de imobilização com diferentes tempos de entrecruzamento	66
Tabela 4-8:	Composição do produto final da transesterificação de óleo de soja com o LPP-PS-CLEA em frasco fechado após 24h de reação.	67

Tabela 4-9: Experimentos de síntese de CLEAs de LTL e Combi-CLEA	68
Tabela 4-10: CLEAs de LTL preparados conforme metodologia descrita por (LÓPEZ-SERRANO et al., 2002).....	70
Tabela 4-11: CLEAs de LPP lavados com etanol ou tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A_{ag}	Atividade total dos agregados redissolvidos (TBU)
A_{CLEA}	Atividade total do CLEA ressuspendido (TBU)
A_i	Atividade total da solução inicial de enzima (TBU)
A_{Lav}	Atividade total nas lavagens dos CLEAs (TBU)
A_{Sobre}	Atividade total no sobrenadante (TBU)
Asp	Ácido aspártico
BSA	Albumina de soro bovino
CALB	Lipase de <i>Candida antarctica</i>
CLEA	Cross-linked enzyme aggregate
Combi-PS-CLEA	CLEA preparado a partir de uma solução de proteína de soja e das lipases LTL e LPP misturadas.
D	Largura do espaço entre os dois cilindros do reator de fluxo em vórtice. $d = R_{ex} - R_{in}$
DAG	Diglicerídeos
DME	Dimetoxietano
EEAG	Ésteres etílicos de ácidos graxos
Glu	Ácido glutâmico
His	Histidina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
KOH	Hidróxido de potássio
L	Altura do cilindro interno do reator de fluxo em vórtice
LCR	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
LPF – PFL	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
LPP – PPL	Lipase pancreática de porco
LPP-CLEA	CLEA da lipase pancreática de porco
LPP-PS-CLEA	CLEA da lipase pancreática de porco preparado usando proteína

	de soja
LPB	Lipase pancreática bovina
LTL – TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
LTL-SDS-CLEA	CLEA da lipase <i>Thermomyces lanuginosus</i> preparado usando dodecil sulfato de sódio
LRM	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
LRO	Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>
Lys	Lisinas
MAG	Monoglicerídeos
NaOH	Hidróxido de sódio
Re	Numero de Reynolds
R _{ex}	Raio do cilindro externo do reator de fluxo em vórtice
R _{in}	Raio do cilindro interno do reator de fluxo em vórtice
RFV	Reator de fluxo em vórtice
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietileno glicol
PS – SP	Proteína de soja
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
Ta	Número de Taylor
TAG	Triglicerídeos
ATB	Álcool terc-butílico
TBU	Unidade de hidrolise de tributirina
Γ	Razão de aspecto do reator de fluxo em vórtice $\Gamma = L/d$
η	Razão de raios. $\eta = R_{in}/R_{ex}$
Ω	Velocidade do cilindro interno do reator de fluxo em vórtice.

Rad/s

v Viscosidade cinemática (cm²/s)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	xii
RESUMO	xiii
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Biocombustíveis	7
2.1.1. Biodiesel	8
2.1.2. Produção de Biodiesel por rota enzimática	11
2.2. Lipases	11
2.2.1. Estrutura e Mecanismo de atuação das lipases.....	12
2.2.2. Especificidade das lipases	14
2.2.3. Migração acil	17
2.2.4. Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (LPF).....	18
2.2.5. Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (LTL)	20
2.2.6. Lipase de <i>Candida antarctica</i> fração B (CALB)	21
2.2.7. Lipase Pancreática de Porco (LPP)	23
2.3. Imobilização de lipases	26
2.3.1. CLEA.....	28
2.4. Reator de fluxo em vórtice	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Materiais	35
3.1.1. Enzimas	35
3.1.2. Proteínas espaçadoras	35
3.1.3. Agentes precipitantes.....	35

3.1.4.	Agentes entrecruzantes	35
3.1.5.	Substratos	35
3.1.6.	Padrões e outros reagentes.....	36
3.2.	Métodos.....	36
3.2.1.	Seleção da mistura de lipases	36
3.2.2.	Inativação das lipases LTL e LPP livres	37
3.2.3.	Seleção de agente precipitante.....	37
3.2.4.	Metodologia de preparação de CLEAs.....	38
3.2.5.	Tratamento dos CLEAs para seu uso nas reações de transesterificação	40
3.2.6.	Reação de transesterificação do óleo de soja com etanol.....	41
3.2.7.	Estabilidade operacional dos CLEAs	42
3.2.8.	Determinação do teor de água nos CLEAs.....	43
3.2.9.	Determinação da concentração de proteína.....	43
3.2.10.	Determinação de atividade hidrolítica.....	43
3.2.11.	Preparação do polialdeído-amido	43
3.2.12.	Cromatografia Gasosa	44
3.2.13.	Determinação de MAG, DAG, TAG.....	44
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1.	Seleção da mistura de lipases para a síntese de biodiesel.....	45
4.2.	Preparação de CLEAs de LPP	52
4.2.1.	Seleção do agente precipitante	53
4.2.2.	Avaliação da proteína de soja na atividade recuperada do CLEA de LPP	55
4.2.3.	Efeito do entrecruzante na atividade do LPP-PS-CLEA	58
4.2.4.	Transesterificação de óleo de soja.....	62
4.2.5.	Reuso do LPP-PS-CLEA na transesterificação do óleo de soja.....	64

4.3. Preparação de CLEAs de LTL.....	68
4.4. Mistura dos CLEAs de LPP e LTL na síntese de biodiesel	72
4.5. Razão molar entre os substratos	75
4.6. Síntese de biodiesel em reator de fluxo em vórtice com a mistura dos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA.....	77
4.7. Reuso da mistura dos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA na síntese de biodiesel em reator de fluxo em vórtice.....	78
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	81
5.1. Conclusões	81
5.2. Sugestões para trabalhos futuros	82
REFERENCIAS	83

1. INTRODUÇÃO

Devido à diminuição das reservas de petróleo, seu elevado preço e principalmente ao impacto ambiental dos gases de escape nos motores abastecidos com combustíveis petroquímicos, a pesquisa para desenvolver combustíveis alternativos, renováveis e ecológicos recebeu muito impulso nos últimos anos. O biodiesel é um dos que tem despertado maior interesse no Brasil e no mundo, gerando nos últimos anos oportunidades para pesquisas e desenvolvimento no âmbito acadêmico e industrial, com destaque para novos processos de síntese que utilizem matérias-primas renováveis, reduzem o consumo energético e apresentem menor impacto ambiental.

O biodiesel é comumente produzido por transesterificação de triglicerídeos, derivados de óleos vegetais, gorduras animais ou óleos residuais utilizados para cocção de alimentos (HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009; WATANABE et al., 2001; ZHANG et al., 2003) com álcoois de cadeia curta (metanol ou etanol) por catálise homogênea em meio alcalino (ZHAO et al., 2015). Este processo está longe de ser ambientalmente amigável e competitivo com o diesel de petróleo, devido a várias desvantagens, podendo ser destacadas a necessidade de matérias-primas refinadas que aumentam o custo de produção (60 - 75 % do custo de produção correspondem ao gasto com matérias-primas) (ÇETINKAYA; KARAOSMANOĞLU, 2004; HAAS, 2005), o alto gasto energético, a dificuldade de recuperação do glicerol, o tratamento de efluentes alcalinos e a ocorrência de reações indesejadas na presença de água e ácidos graxos livres (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; MA; HANNA, 1999).

Ao contrário da catálise química, a rota enzimática para produção de biodiesel é mais simples, pois enzimas, mais especificamente lipases, atuam em condições brandas de temperatura e pressão, com fácil separação de produtos, necessidades mínimas de tratamento de águas residuais, fácil recuperação do glicerol e ausência de reações secundárias, fazendo possível o uso de matérias-primas não refinadas e de baixo custo (HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009; JEGANNATHAN et al., 2008; LIMA et al., 2015; MOREIRA et al., 2007; RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008; WATANABE et al., 2001). Desse modo, o processo enzimático tornou-se uma promissora alternativa à

catálise química. Ainda assim, a rota enzimática apresenta várias limitações para sua aplicação ao nível industrial, como o alto custo das enzimas e o longo tempo de reação requerido, comparado ao da rota química.

Por sua vez, o alto custo das enzimas está relacionado à sua natureza e às técnicas de imobilização que são usadas para viabilizar seu uso. Atualmente, lipases provenientes de fungos como as lipases de *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica* do tipo B (CALB), *Rizomucor miehei* (LRM) e *Thermomyces lanuginosus* (LTL) são as mais usadas para a produção de biodiesel. Algumas dessas enzimas são vendidas pela Novozyme com os nomes comerciais Novozym 435 (CALB imobilizada em uma resina acrílica macroporosa), Lipozyme RM IM (LRM imobilizada em uma resina aniônica) e Lipozyme TL IM (LTL imobilizada em um gel de sílica granulada). Entretanto, estes biocatalizadores são caros, pois a sua preparação exige etapas dispendiosas de extração e imobilização das enzimas (GUAUQUE; FORESTI; FERREIRA, 2013; SHELDON, 2011a).

O uso de preparações de lipases de menor custo torna-se uma alternativa muito interessante para viabilizar a síntese de biodiesel pela rota enzimática, daí a importância de preparações como a lipase pancreática de porco (LPP) que é a lipase livre mais barata, comparada com outras lipases não imobilizadas, disponível comercialmente. Por exemplo, seu preço de mercado (em USD/U) é até 20 mil vezes menor (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012)), tornando essa lipase atrativa para aplicações de síntese nas que o custo é considerado um fator crítico.

Entretanto, quando a LPP é usada na síntese de biodiesel e comparada com outras lipases de origem microbiana, geralmente produz baixos rendimentos (< 20 %) (GAMBA; LAPIS; DUPONT, 2008; GULDHE et al., 2015; SEBASTIAN; MURALEEDHARAN; SANTHIAGU, 2017). No entanto, existem alguns trabalhos, apresentados na Tabela 1-1, em que o uso de diferentes técnicas de imobilização em suportes junto com a otimização das condições de reação, permitiu à LPP atingir rendimentos satisfatórios na síntese de biodiesel em comparação com outras preparações de lipases (CABALLERO et al., 2009; DESAI; DAVE; DEVI, 2006; PAULA et al., 2007; TAN et al., 2014). Contudo, a imobilização da LPP em suportes sólidos pode aumentar o custo final do biocatalisador.

Tabela 1-1: Produção de Biodiesel com a LPP imobilizada.

Método de imobilização / Suporte	Substratos	Condições de reação	Rendimento de reação (%)	Referência
Ligação Iônica / Resina de troca iônica	Óleo de girassol / Etanol	45 °C; Razão molar óleo/álcool: 1:3; 10% de lipase (m/m de substrato total); 7 h	80	(YESILOGLU, 2004)
Ligação covalente / Quitosana	Óleo de Salicornia / Metanol	25 °C; Razão molar óleo/alcool: 1:3; 20 g de lipase imobilizada; 15,2 % de água (v/v mistura total); Solvente: Hexano; 12 h	55	(DESAI; DAVE; DEVI, 2006)
Ligação covalente / Polissiloxano-Álcool Polivinílico	Óleo de Babassu / Etanol, Propanol e Butanol.	40 - 50 ° C; Razão molar óleo/álcool: 1:10; 20 % da lipase (m/m do substrato total); 48 h	75 (Etanol) 80 (Propanol) 95 (Butanol)	(PAULA et al., 2007)
Retenção física / Sepiolite	Óleo de girassol / Etanol	40 °C; Razão molar óleo/álcool: 1:11; 0,1 % da lipase imobilizada (m/m total de substrato); 0,1 ml de NaOH 10 N	58,8 (24 h)	(CABALLERO et al., 2009)
Ligação covalente / Suporte amorfo de AlPO ₄			67,0 (31 h)	(LUNA et al., 2013)
Ligação covalente / Nanoparticulas de Ag	Óleo de soja / Metanol	40 °C; Razão molar óleo/álcool: 1:3; 0,05 % de lipase imobilizada (m/m total de substrato); 6 h	95	(DUMRI; HUNG ANH, 2014)

Desse modo, técnicas de imobilização como a técnica CLEA (do inglês cross-linked enzyme aggregate) (SHELDON, 2007), que consiste na precipitação das enzimas induzida pela adição de um agente precipitante como sais, solventes orgânicos ou polímeros, seguido do entrecruzamento com um agente bifuncional ou polifuncional (ZHEN et al., 2013), tem se tornado uma alternativa para obter derivados catalíticos de baixo custo de produção, devido à ausência de suporte. Esta metodologia possui outras vantagens como a possibilidade de coimobilizar diferentes enzimas, usar enzimas semi-purificadas, alta atividade enzimática concentrada no derivado catalítico e alta estabilidade (CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000).

No entanto, sua aplicação em escala industrial é difícil já que os CLEAs são usualmente muito pequenos e não tem boa resistência mecânica; por isso, são considerados problemáticos para qualquer tipo de reator na indústria atual (GARCIA-GALAN et al., 2011; KOPP et al., 2014; PCHELINTSEV; YOUSHKO; ŠVEDAS, 2009). O reator de fluxo em vórtice (RFV) é um tipo de reator que pela sua configuração promove uma agitação eficiente, porém menos agressiva do que a obtida com agitadores convencionais e, portanto, pode ser considerado uma promissora alternativa quando as partículas do biocatalisador são sensíveis ao cisalhamento, como os CLEAs (GIORDANO et al., 1998; RESENDE et al., 2005).

Assim, a imobilização de lipases (por exemplo, lipases de baixo custo como a PPL) mediante uma técnica de imobilização sem suporte, a técnica CLEA, torna-se uma alternativa interessante para diminuir o custo do biocatalisador e possibilitar a síntese de biodiesel pela rota enzimática.

Igualmente, como foi mencionado previamente, o longo tempo de reação requerido pela rota enzimática, comparado ao da rota química, também é um dos principais entraves para sua aplicação ao nível industrial. Devido à heterogeneidade dos óleos vegetais e dos intermediários formados na reação de transesterificação, estes podem ser transformados mais rapidamente usando uma mistura constituída por lipases com diferentes atividades e especificidades, em vez de lipases únicas. Por exemplo, usando duas lipases com diferente regioespecificidade, lipases de *Rhizopus oryzae* (LRO) e *Candida rugosa* (LCR), em experimentos separados, o rendimento máximo alcançado foi 70 % em 18 h de reação com a LRO e 20% em 30 h com a LCR. Entretanto, quando as enzimas foram misturadas obteve-se rendimento superior a 90 %

em 18 h. A melhoria do processo foi atribuída ao fato da LCR, não regioespecífica, conseguir hidrolisar o ácido graxo na posição *sn*-2 do 1,2-diglicerídeo liberado pela ação da LRO que é 1,3 regioespecífica. Uma vez que o fenômeno da migração acil é evitado, o rendimento e a velocidade da reação aumentam, melhorando assim o processo (DU et al., 2005; LEE et al., 2006). Por outro lado, RODRIGUES et al. (2011) avaliaram uma mistura de duas lipases com regioespecificidades semelhantes (1,3 regioespecíficas), LTL e LRM, na transesterificação e hidrólise de óleo de soja, rendendo 90 e 95% de conversão, respectivamente. Esses rendimentos foram aproximadamente 15% maior do que aqueles obtidos com apenas a LTL e duas vezes maior que os obtidos com a LRM. Comparando as velocidades iniciais de reação, LTL e LRM atacam diferentes ácidos graxos no óleo, tanto na transesterificação quanto na hidrólise; portanto, os rendimentos de conversão foram maiores usando a mistura LTL/LRM do que as enzimas individuais (RODRIGUES; AYUB, 2011).

Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a síntese de biodiesel a partir da transesterificação etílica de óleo de soja em reator de fluxo em vórtice, catalisada por uma mistura de lipases imobilizadas pela técnica CLEA. A mistura de lipases foi selecionada a partir de preparações lipolíticas de diferentes fontes microbianas, comumente usadas na síntese de biodiesel, incluindo as lipases de *Candida antarctica* fração B (CALB), *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Pseudomonas fluorescens* (LPP) e a lipase animal de pâncreas de porco (LPP).

Para o objetivo geral ser atingido, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Imobilizar diferentes lipases individualmente e/ou de forma conjunta (co-imobilização) empregando a técnica de precipitação/reticulação CLEA.
- Avaliar a síntese enzimática de biodiesel em reator de fluxo em vórtice (RFV).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biocombustíveis

Devido à diminuição das reservas de petróleo, seu elevado preço e principalmente ao impacto ambiental dos gases de escape nos motores abastecidos com combustíveis petroquímicos, a pesquisa para desenvolver combustíveis alternativos, renováveis e ecológicos recebeu muito impulso nos últimos anos (CHRISTOPHER; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, 2014; RODIONOVA et al., 2017).

Os biocombustíveis referem-se a combustíveis líquidos ou gasosos gerados diretamente através dos processos biológicos ou derivado da conversão química de biomassa de organismos vivos (RODIONOVA et al., 2017). Em geral, os biocombustíveis podem ser classificados em primários ou secundários (de primeira, segunda ou terceira geração) (Tabela 2-1).

Tabela 2-1: Classificação dos biocombustíveis. Adaptado de (RODIONOVA et al., 2017).

Biocombustíveis			
Primário	Secundário		
	Primeira geração	Segunda geração	Terceira geração
Lenha, Aparas de madeira, Pellets, Resíduos animais, Resíduos florestais e vegetais, Gás de aterro	Bioetanol ou butanol por fermentação de amido ou açúcares. Biodiesel por transesterificação de culturas oleaginosas.	Bioetanol e biodiesel produzidos a partir de tecnologias convencionais, mas baseados em novas culturas de amido, óleo e açúcar. Bioetanol, biobutanol, diesel sintético produzido a partir de materiais lignocelulósicos	Biodiesel a partir de microalgas. Bioetanol de microalgas e algas. Hidrogênio de microalgas verdes e micróbios.

Atualmente, o Brasil se destaca mundialmente como um país que valoriza a diversidade de fontes energéticas, integrando na sua matriz energética o etanol a partir

de cana-de-açúcar e mais recentemente, em escala crescente, o biodiesel, produzido a partir de diferentes fontes e adicionado ao diesel de petróleo em proporções variáveis. Em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória de 2 % (B2), em todo o território nacional, e esse percentual foi sucessivamente aumentado até o atual percentual de 8%. (LA ROVERE; PEREIRA; SIMÕES, 2011; “www.anp.gov.br/wwwanp/biocombustiveis/biodiesel”).

A grande vantagem do uso do biodiesel é que os motores de ignição por compressão (diesel) podem operar com diesel de petróleo com proporções de 2% (B2), 5% (B5) ou 20% (B20) e até biodiesel puro (B100), sem necessidade de investimentos tecnológicos no desenvolvimento ou modificação dos motores existentes. Além disso, essas misturas de biodiesel podem reduzir os níveis de gases do aquecimento global, como o CO₂ (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

2.1.1. Biodiesel

O biodiesel é composto de ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais, gorduras animais ou óleos residuais utilizados na cocção de alimentos (HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009; WATANABE et al., 2001; ZHANG et al., 2003). Mais de 95 % da produção global de biodiesel é realizada a partir de óleos vegetais refinados (BALAT; BALAT, 2010). Por exemplo, no Brasil, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) Brasil, reportou o uso principalmente de óleo de soja (72,51%) como matéria-prima para a produção de biodiesel, Figura 2-1.

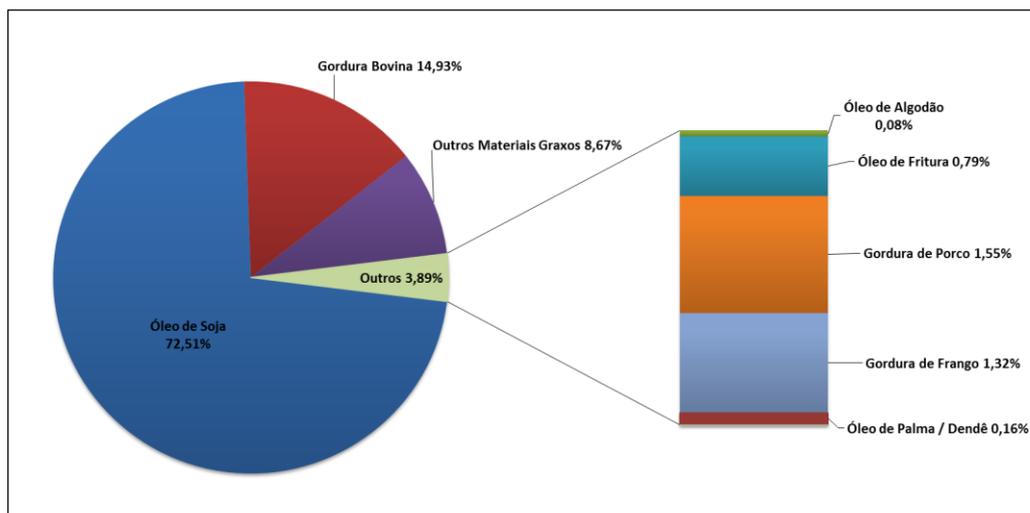


Figura 2-1: Perfil brasileiro de matérias-primas consumidas para produção de biodiesel, atualizado em 28/09/2017. Fonte: ANP, conforme Resolução ANP nº 17/2004 e Resolução ANP nº 30/2013.

A rota tecnológica mais empregada para a produção de biodiesel é a transesterificação de óleos vegetais e álcoois de cadeia curta, principalmente metanol (KUMAR TIWARI; KUMAR; RAHEMAN, 2007), como se mostra na Figura 2-2. Nesta reação, o excesso de álcool altera o equilíbrio da reação para o lado direito, favorecendo a produção do produto desejado (mistura de ésteres alquílicos) (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

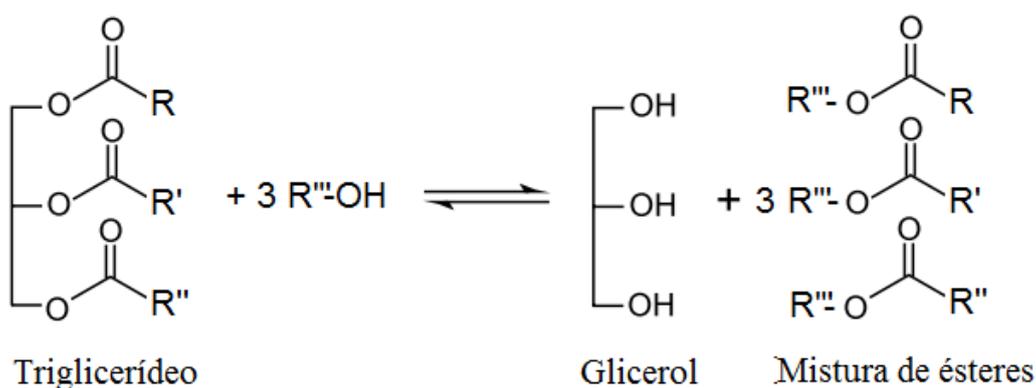


Figura 2-2: Transesterificação de triglicerídeos, onde R, R', R'', R''' representam as cadeias carbônicas dos ácidos graxos e álcool. Adaptado de TAN et al. (2003).

Os catalisadores usados podem ser ácidos e bases minerais, enzimas (lipases) e bases não iônicas (RAMADHAS; JAYARAJ; MURALEEDHARAN, 2005). No entanto, a catálise homogênea em meio alcalino é geralmente empregada, devido à sua maior rapidez, simplicidade e eficiência (LEUNG; WU; LEUNG, 2010). Nesta rota, o hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH) é usado como catalisador, juntamente com metanol (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001). Uma vez que a presença de água pode hidrolisar alguns dos ésteres produzidos, com consequente formação de sabão, o teor de ácidos graxos livres deve ser inferior a 3% e os outros materiais devem ser substancialmente anidros. Assim, a catálise alcalina apresenta várias desvantagens, podendo ser destacadas alto gasto energético, dificuldade de recuperação do glicerol, tratamento de efluente alcalino e ocorrência de reações indesejadas na presença de água e ácidos graxos livres, o que exige o uso de matérias-primas refinadas (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; MA; HANNA, 1999; SHIMADA et al., 2002).

Uma vez que 60 – 75% do custo de produção de biodiesel corresponde ao gasto com matérias-primas, o uso de óleos não comestíveis ou residuais é uma alternativa aos óleos refinados, a fim de tornar o processo de produção de biodiesel viável economicamente (ADAMCZAK; BORNSCHEUER; BEDNARSKI, 2009; ÇETINKAYA; KARAOSMANOĞLU, 2004; HAAS, 2005). A produção de biodiesel a partir de outras fontes não comestíveis foi amplamente investigada nos últimos anos (KHANAHMADI et al., 2016; KUMAR TIWARI; KUMAR; RAHEMAN, 2007; KUMARI; SHAH; GUPTA, 2007).

Para o aproveitamento de óleos ou gorduras não refinadas ou residuais, sem a necessidade de etapas de pré-tratamento e purificação adicionais ao processo atual, a rota enzimática é uma alternativa vantajosa devido à elevada seletividade das enzimas, evitando as reações indesejáveis e, por conseguinte, tornando possível o uso deste tipo de matéria-prima (HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009; JEGANNATHAN et al., 2008; MOREIRA et al., 2007; RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008; WATANABE et al., 2001).

2.1.2. Produção de Biodiesel por rota enzimática

Como o biodiesel é essencialmente uma mistura de ésteres de ácidos graxos obtidos a partir dos triglicerídeos, as lipases são as enzimas mais populares para a sua produção e devido à sua elevada especificidade, estas enzimas tornam possível o uso de matérias-primas não refinadas e de baixo custo (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001). As lipases mais comumente usadas para a síntese de biodiesel são as lipases de: *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia* e *Thermomyces lanuginosus*. No entanto, a lipase B de *Candida antarctica* comercialmente disponível na forma imobilizada (Novozym 435) é a enzima mais frequentemente usada (ADAMCZAK; BORNSCHEUER; BEDNARSKI, 2009; KIRK; WU, 2002).

A transesterificação enzimática pode superar os problemas mencionados para a rota química. No entanto, os derivados enzimáticos são mais caros do que os catalisadores químicos, o que desmotiva sua aplicação na indústria. Por isso, sua recuperação e reuso são, muitas vezes, uma obrigação para sua viabilidade comercial.

A rota enzimática tem a vantagem de ser conduzida à temperatura ambiente e, com a enzima imobilizada, pode-se reutilizar o catalisador. No entanto, a catálise enzimática requer um maior tempo de reação do que a rota química, entre 4 a 40 h ou mais. Além disso, um excesso de álcool, necessário para deslocar o equilíbrio e favorecer a formação de ésteres, pode inibir a lipase. Uma estratégia usualmente reportada na literatura para contornar a inibição da enzima é alimentar o álcool no reator em três etapas (SHIMADA et al., 2002).

2.2. Lipases

As lipases (glicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas cuja função natural é a hidrólise de triglicerídeos (TAG) (Figura 2-3) em sistemas macroaquosos, na interface água-lipídeo, com a liberação de ácidos graxos livres, diglicerídeos (DAG), monoglicerídeos (MAG) e glicerol (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; VILLENEUVE et al., 2000). Entretanto, são também capazes de catalisar reações de esterificação e transesterificação (acidólise, alcoólise e interesterificação) em meio orgânico (com teor restrito de água) (KAPOOR; GUPTA, 2012).

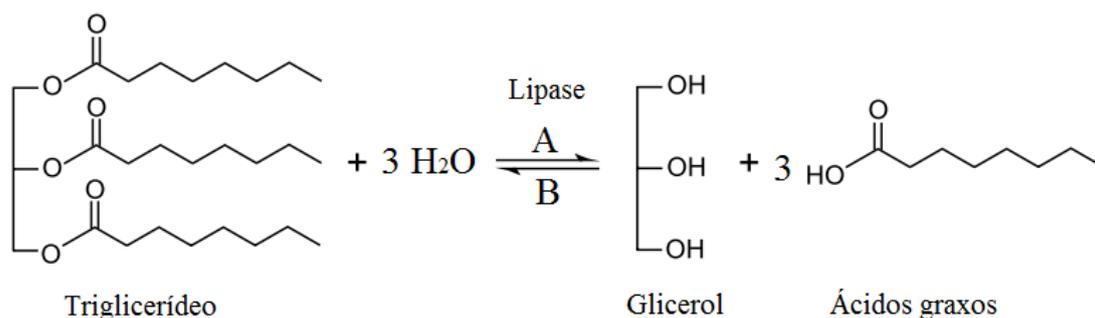


Figura 2-3: Ação catalítica natural das lipases. (A) Reação de hidrólise do triglicerídeo formando glicerol e ácidos graxos, (B) Reação inversa que combina o glicerol e os ácidos graxos para formar o triglicerídeo. Adaptado de JAEGER; REETZ, 1998.

Devido à ampla especificidade frente ao substrato, alta regio e/ou enantioespecificidade, as lipases apresentam grande potencial de aplicação na formulação de detergentes (HASAN et al., 2010), hidrólise de óleos e gorduras (JUNG; CAMMAROTA; FREIRE, 2002; MENDES; PEREIRA; DE CASTRO, 2006; VESCOVI et al., 2016b), síntese de ésteres de ácidos graxos como ingredientes cosméticos, surfactantes ou biocombustíveis (NIE et al., 2006; OZYILMAZ; GEZER, 2010; VESCOVI et al., 2017), indústrias farmacêutica (GOTOR-FERNÁNDEZ; BRIEVA; GOTOR, 2006), dentre outras (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; JAEGER; REETZ, 1998; KAPOOR; GUPTA, 2012).

Lipases com propriedades diferentes (como especificidade, estabilidade térmica, pH ótimo, etc.), são comumente obtidas a partir de fontes vegetais, animais e cultivo de microrganismos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006), onde seu papel fisiológico é metabolizar lipídios. A maioria das lipases comerciais são provenientes de fungos e bactérias (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; JAEGER; REETZ, 1998).

2.2.1. Estrutura e Mecanismo de atuação das lipases

A elucidação da estrutura tridimensional de várias lipases permitiu reconhecer características estruturais comuns a todas: (i) exibem um padrão de dobramento característico, conhecido como dobra α/β -hidrolase. (ii) o sítio ativo é formado por uma tríada catalítica constituída por aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e aspartato (Asp) / glutamato (Glu). (iii) apresentam uma sequência peptídica de

α -hélice que cobre o sítio ativo, chamada “lid” que atua como uma tampa cobrindo o sítio ativo do solvente. Contudo, algumas lipases podem apresentar uma tampa muito pequena ou simples, que não isola completamente o centro ativo, como é o caso da lipase B de *Candida antarctica* (KAPOOR; GUPTA, 2012; VERGER, 1997) ou da lipase pancreática do porquinho-da-índia, a qual tem uma "mini-tampa" composta apenas por cinco aminoácidos (KAPOOR; GUPTA, 2012; VERGER, 1997). Em outros casos, a tampa pode ser bastante grande ou mesmo ter uma tampa dupla, como no caso da lipase de *Bacillus thermocatenuatus* (CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009).

As lipases têm um mecanismo de atuação muito complexo. Em 1958, Sarda e Desnuellea definiram as lipases em termos cinéticos, com base no fenômeno de "ativação interfacial". Esse fenômeno relaciona o aumento da atividade das lipases em substratos insolúveis (tais como emulsões), quando comparada com os mesmos substratos em soluções monoméricas ou solúveis no meio aquoso (VERGER, 1997). Esta propriedade foi utilizada durante muito tempo para distinguir as lipases de esterases, que agem apenas em moléculas de ésteres carboxílicos solúveis em água.

A determinação da estrutura tridimensional e a presença da tampa nas lipases de *Mucor miehei* e pancreática humana em 1990 permitiu explicar o fenômeno de ativação interfacial das lipases proposto por Sarda e Desnuellea (KAPOOR; GUPTA, 2012). Em soluções aquosas homogêneas, as lipases estão em equilíbrio entre duas formas (Figura 2-4): uma forma principal “fechada”, quando a tampa cobre o sítio ativo do meio, apresentando uma baixa atividade lipolítica e uma forma “aberta”, na qual a tampa ao interagir com a interface água-lipídeo, se afasta, permitindo o acesso do substrato ao sítio ativo. Na presença de gotas dos substratos naturais (óleos), as lipases são adsorvidas na superfície hidrofóbica através da área muito hidrofóbica formada pela face interna da tampa e os arredores do sítio ativo (PALOMO et al., 2002).

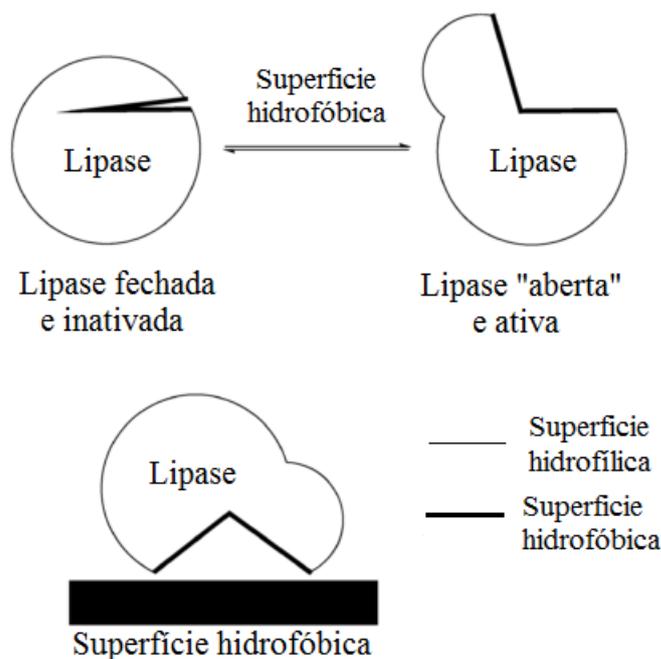


Figura 2-4: Fenômeno de ativação interfacial das lipases em superfícies hidrofóbicas
Adaptado de HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009.

As lipases também são capazes de sofrer tal "ativação interfacial" na presença de outras interfaces hidrofóbicas como suportes hidrofóbicos (BASTIDA et al., 1998), proteínas hidrofóbicas e também a superfície hidrofóbica oferecida por uma lipase na forma "aberta", formando uma estrutura bimolecular compreendendo duas lipases (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2003).

Posteriormente revelou-se que a presença da tampa pode não estar necessariamente correlacionada com o fenômeno de ativação interfacial; por exemplo, as lipases de *Candida antarctica* B, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e a lipase pancreática de nutria não apresentam a ativação interfacial, no entanto, têm uma tampa anfifílica cobrindo seus sítios ativos (JAEGER; REETZ, 1998; VERGER, 1997).

2.2.2. Especificidade das lipases

As lipases exibem diferentes tipos de especificidades, cada uma das quais discutida a seguir.

Especificidade ao substrato: As lipases apresentam especificidade em relação ao tipo de ácido graxo. Por exemplo, as lipases de *Candida rugosa* e *Rhizomucor miehei* tem maior preferência por ácido oleico do que por ácido elaídico (isômero trans do ácido oleico). Por outro lado, a lipase de *Candida antarctica* do tipo A tem maior preferência pelo ácido elaídico que pelo ácido oleico (BORGDORF; WARWEL, 1999). As lipases também exibem especificidade pelo comprimento da cadeia do ácido graxo. A maioria das lipases preferem ésteres de ácidos graxos saturados de cadeia média (C4) a cadeia longa (C16), com algumas exceções. A lipase de *Penicillium roquefortii* pode hidrolisar ésteres de cadeia curta, mas não hidrolisa ésteres de cadeia média e longa, enquanto, que a lipase de *Rhizomucor miehei* pode eficientemente hidrolisar ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (C22) (RANGHEARD et al., 1989). Lipases de pâncreas de porco e *Candida rugosa* tem preferência pelos ácidos graxos de cadeia curta (BERGER; SCHNEIDER, 1991; KAPOOR; GUPTA, 2012; MACRAE; HAMMOND, 1985).

Outras lipases preferem a hidrólise dos ésteres que são formados a partir de ácidos graxos de cadeia longa com ligações duplas entre C-9 e C-10, tais como as lipases de *Geotrichum candidum* e sementes de aveia não germinadas (GHAZALI; HAMIDAH; CHE MAN, 1995; KAPOOR; GUPTA, 2012; MACRAE; HAMMOND, 1985).

Além disso, as lipases também apresentam especificidade no que se refere às partes alcoólicas dos substratos. A atividade da lipase frente à diferentes classes de álcoois estão na ordem: álcoois primários > secundários > terciários. Álcoois terciários e seus ésteres são substratos pobres para lipases (KAPOOR; GUPTA, 2012; MACRAE; HAMMOND, 1985).

Regioespecificidade (Especificidade quanto à posição): Quanto a sua capacidade de hidrolisar triglicerídeos as lipases podem ser divididas em dois grupos principais (KAPOOR; GUPTA, 2012; MACRAE; HAMMOND, 1985).

(i) **Lipases não específicas:** são lipases que liberam os ácidos graxos de qualquer posição no triglicerídeo. Catalisam a degradação completa do triglicerídeo em glicerol e ácidos graxos livres (Figura 2-3A). Os diglicerídeos e monoglicerídeos são formados como intermediários na mistura reacional. Esses intermediários são

hidrolisados mais rapidamente do que os triglicerídeos e, portanto, não se acumulam na reação. Lipases de *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas cepacia*, *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescen*, *Candida rugosa* são exemplos desta classe (GHAZALI; HAMIDAH; CHE MAN, 1995; KAPOOR; GUPTA, 2012).

(ii) **Lipases 1,3 específicas:** Estas são as que liberam preferencialmente ácidos graxos das posições sn-1 e sn-3 para formar ácidos graxos livres e di- e/ou monoglicéridos (Figura 2-5). Algumas das lipases deste tipo, lipase de *Aspergillus niger*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Candida antarctica* do tipo B, *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosus*, a lipase pancreática de porco, *Mucor javanicus*, e várias *Rhizopus spp.* (GHAZALI; HAMIDAH; CHE MAN, 1995; KAPOOR; GUPTA, 2012)

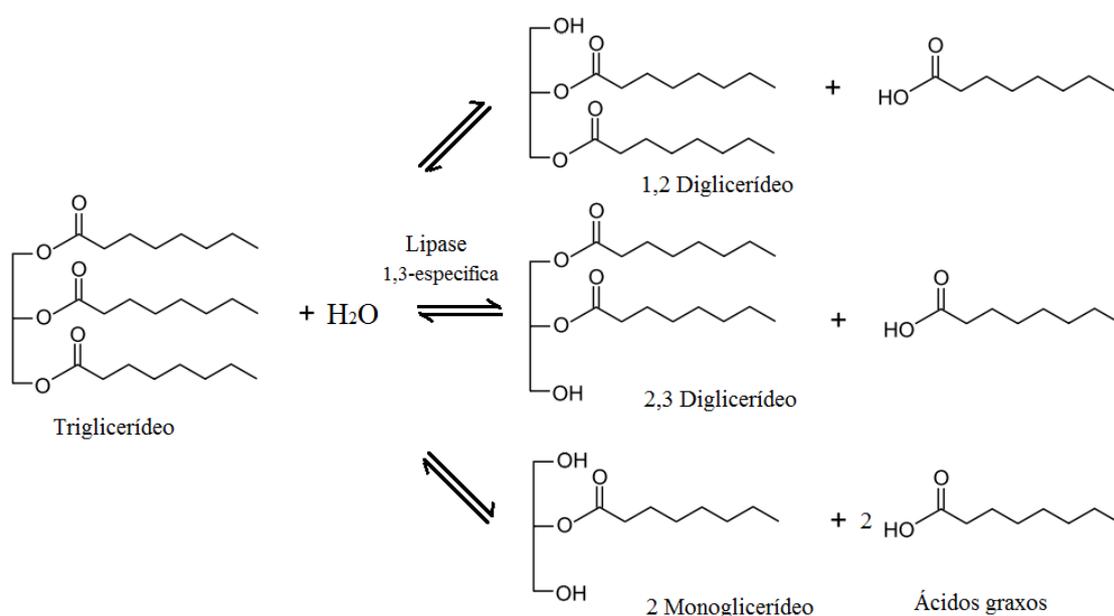


Figura 2-5: Reação catalisada por lipase 1,3 específica. Adaptado de KAPOOR; GUPTA, 2012.

A regioespecificidade é mantida quando as lipases são utilizadas em condições de baixo teor de água (GHAZALI; HAMIDAH; CHE MAN, 1995).

Estereoespecificidade: É definida como a capacidade das lipases para distinguir entre a posição sn-1 e sn-3 no triglicerídeo. Por exemplo, as lipases de *Pseudomonas sp.* e *P. aeruginosa* apresentam total estereoespecificidade para a posição sn-1 do substrato gliceril trioctanoato, enquanto que a lipase de *C. antarctica* do tipo B

apresenta preferência pela posição sn-3 para o mesmo substrato (ROGALSKA et al., 1993).

2.2.3. Migração acil

É o processo não enzimático que envolve o movimento espontâneo de um grupo acil proveniente de um grupo hidroxílico para uma posição adjacente (KAPOOR; GUPTA, 2012). Durante a hidrólise de triglicerídeos catalisada por uma lipase 1,3 específica são formados 2-monoglicerídeo e 1,2 ou 2,3-diglicerídeos. Esses intermediários sofrem uma migração acil lenta para produzir 1,3-diglicerídeos e 1-monoglicerídeos, que por sua vez são hidrolisados pelas lipases 1,3 específicas para formar ácidos graxos livres e glicerol (Figura 2-6). Dessa forma, tempos de reação prolongados podem eventualmente resultar em hidrólise completa de triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol.

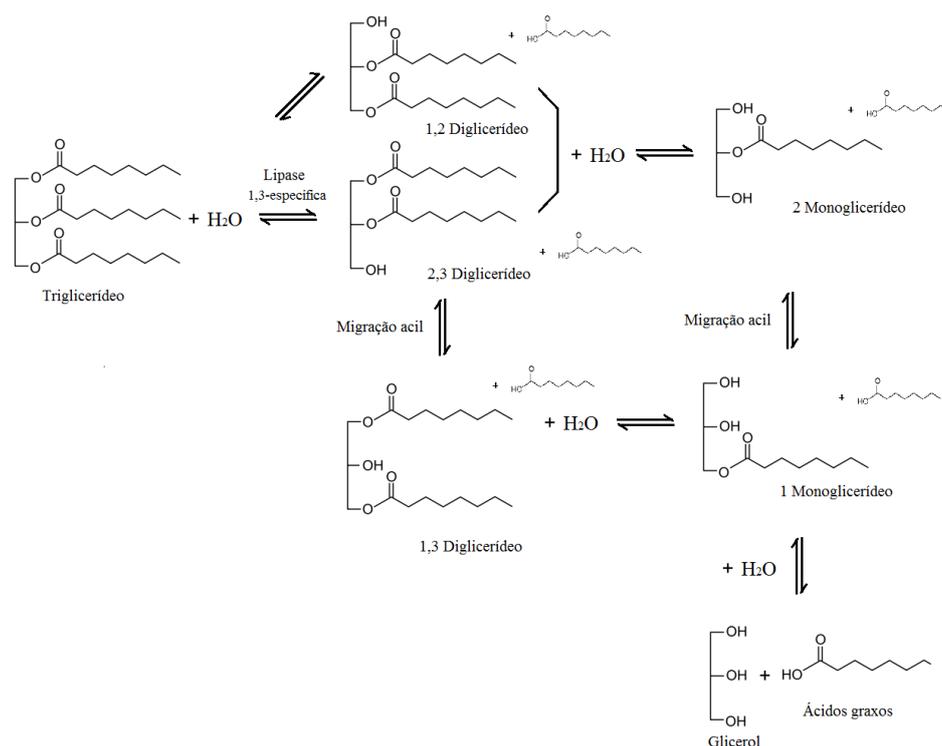


Figura 2-6: Migração acil de lipases 1,3 específicas. Adaptado de KAPOOR; GUPTA, 2012.

Em seguida, será feita uma breve revisão sobre as lipases utilizadas neste trabalho: lipases de *Pseudomonas fluorescens* (LPF), *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Candida antarctica* fração B (CALB) e lipase do pâncreas de porco (LPP).

2.2.4. Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF)

As lipases de bactérias *Pseudomonas* são conhecidas como lipases termoestáveis (MUSTRANTA; FORSELL; POUTANEN, 1993) e têm sido utilizadas para uma ampla variedade de aplicações biotecnológicas em síntese orgânica (JAEGER; REETZ, 1998) e formulação de detergentes (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). A lipase de *Pseudomonas fluorescens*, comercialmente disponível na sua forma livre e imobilizada, é constituída por uma cadeia de 320 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 33 kDa; a composição dos resíduos de aminoácidos da lipase é apresentada na Tabela 2-2 (BORNSCHEUER et al., 1994; FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2003; SCHRAG et al., 1997). Seu sítio catalítico é formado pela tríade Ser87-Asp264- His286 (SCHRAG et al., 1997).

Tabela 2-2: Composição dos resíduos de aminoácido da LPF. Adaptado de (SCHRAG et al., 1997)

Resíduo de aminoácido	Unidades	% do resíduo de aminoácido
Ala	39	12,19
Arg	9	2,81
Asn	18	5,63
Asp	15	4,69
Cys	2	0,63
Gln	15	4,69
Glu	7	2,19
Gly	36	11,25
His	6	1,88
Ile	11	3,44
Leu	31	9,69
Lys	7	2,19
Met	1	0,31
Phe	7	2,19
Pro	13	4,06
Ser	22	6,88
Thr	34	10,63
Trp	3	0,94
Tyr	14	4,38
Val	30	9,38

A LPF tem a tendência de formar agregados bimoleculares (Figura 2-7) em concentrações enzimáticas moderadas. Essa estrutura bimolecular é muito menos ativa que a forma monomérica da lipase e pode ser dissociada por adição de detergentes (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2003).

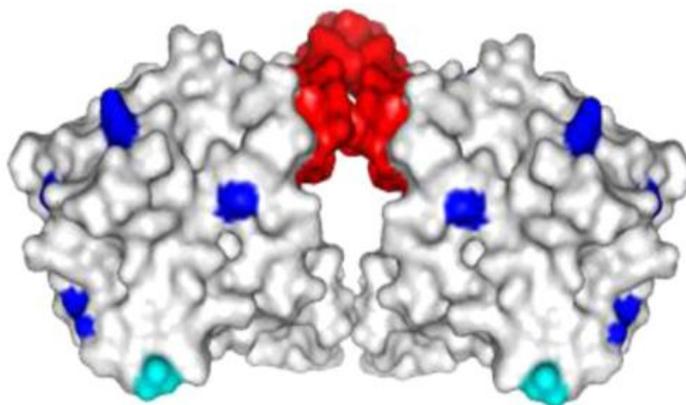


Figura 2-7: Representação esquemática de um agregado bimolecular da LPF (PDB: 3LIP). Azul claro: amino terminal; azul escuro: resíduos Lys; vermelho: os centros ativos da lipase. Fonte: DE LIMA et al., 2013

A Figura 2-8A apresenta a estrutura do monômero da LPF na forma “aberta”. É possível observar que a área próxima ao centro ativo não possui resíduos de Lys, enquanto que a maior parte das lisinas está localizada no lado oposto do sítio ativo (Figura 2-8B) (PALOMO et al., 2005).

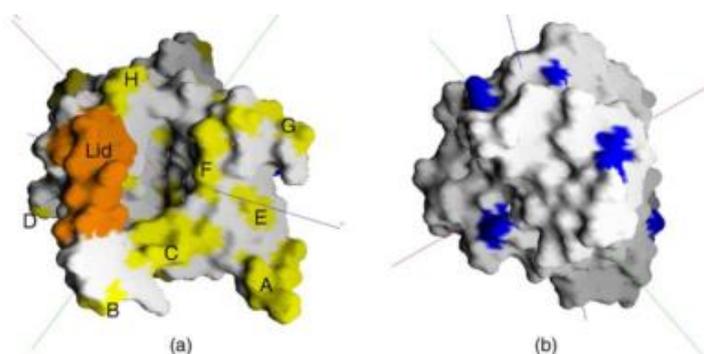


Figura 2-8: Estrutura 3D da superfície da LPF na forma “aberta” (A) Face da tampa, os resíduos da tampa em laranja e os resíduos hidrofóbicos em amarelo (B) Face oposta à tampa, os resíduos de lisinas em azul. Fonte: PALOMO et al., 2005.

A LPF é uma lipase não regioespecífica, estável na faixa de temperatura de 20 a 50°C e pH 6-10, enquanto sua atividade ótima foi observada na temperatura de

55°C e pH 8 a 10 (KOJIMA; YOKOE; MASE, 1994; MUSTRANTA; FORSSELL; POUTANEN, 1993).

2.2.5. Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL)

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (anteriormente *Humicola laguginosa*) é uma enzima termoestável. Lipolase[®] e Lipozyme TL IM[®] são as preparações comerciais da LTL na forma solúvel e imobilizada, respectivamente, fornecidas pela Novozymes.

Devido à sua elevada atividade e estabilidade, a LTL tem sido utilizada para uma ampla variedade de processos. Uma das principais aplicações da LTL têm sido a modificação de óleos e gorduras, o que inclui a hidrólise de óleos e gorduras. Esta enzima é específica para as posições 1 e 3, por isso a hidrólise do éster na posição 2 deve principalmente seguir a migração acil para a posição 1, conforme mostra a Figura 2-6, (FREITAS et al., 2007). A LTL também é utilizada na produção de biodiesel e produtos químicos finos (principalmente em processos enantio e regioseletivos ou específicos), entre outros (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

A LTL é uma proteína de cadeia simples, constituída por 269 aminoácidos, massa molecular de 31,7 kDa e tamanho aproximado de 35 Å × 45 Å × 50 Å (Figura 2-9). O seu ponto isoelétrico é de 4,4.

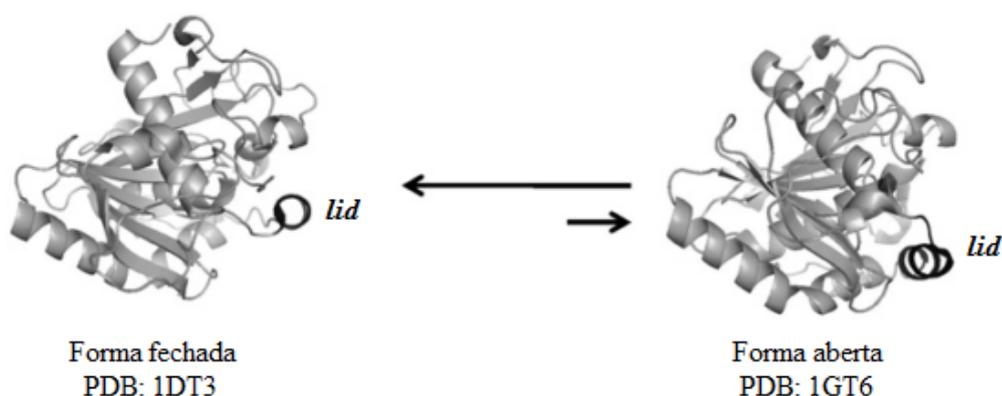


Figura 2-9: Estrutura das formas aberta e fechada da LTL. Fonte (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010)

A composição dos resíduos de aminoácido da lipase LTL é apresentada na Tabela 2-3.

Tabela 2-3: Composição dos resíduos de aminoácido da LTL. Adaptado de (DEREWENDA et al., 1994)

Resíduo de aminoácido	Unidades	% do resíduo de aminoácido
Ala	21	7,81
Arg	14	5,20
Asn	19	7,06
Asp	19	7,06
Cys	6	2,23
Gln	6	2,23
Glu	12	4,46
Gly	28	10,41
His	6	2,23
Ile	16	5,95
Leu	20	7,43
Lys	7	2,60
Met	0	0,00
Phe	15	5,58
Pro	12	4,46
Ser	17	6,32
Thr	19	7,06
Trp	4	1,49
Tyr	10	3,72
Val	18	6,69

A LTL é bastante estável, mantém sua atividade na faixa de 55-60°C, com a máxima atividade em torno de pH 9. Similarmente à LPF, a LTL tem a tendência de formar agregados bimoleculares com diferentes atividade, estabilidade e especificidade comparados com o monômero da LTL (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

2.2.6. Lipase de *Candida antarctica* fração B (CALB)

A lipase B de *Candida antarctica* é uma das lipases mais utilizada devido à sua elevada atividade e por ser uma lipase não regioespecífica. A CALB é disponível comercialmente na forma solúvel e imobilizada, sendo a forma imobilizada conhecida como Novozyme 435[®], derivado desenvolvido para a síntese de produtos de alto valor agregado, em que o seu alto custo tem um impacto limitado. Apresenta aplicações em vários processos industriais, como a síntese de compostos oticamente ativos na indústria

farmacêutica, síntese de polímeros, síntese de ésteres usados na indústria de alimentos ou na produção de biodiesel (KIRK; WU, 2002; VESCOVI et al., 2016a).

A CALB, Figura 2-10, é uma enzima globular ($30 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$) composta por 317 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular de 33,3 kDa, pI de 6,0, pH ótimo para catálise igual a 7,0 e é estável em meio aquoso na faixa de pH de 3,5 a 9,5 (KIRK; WU, 2002; UPPENBERG et al., 1994).

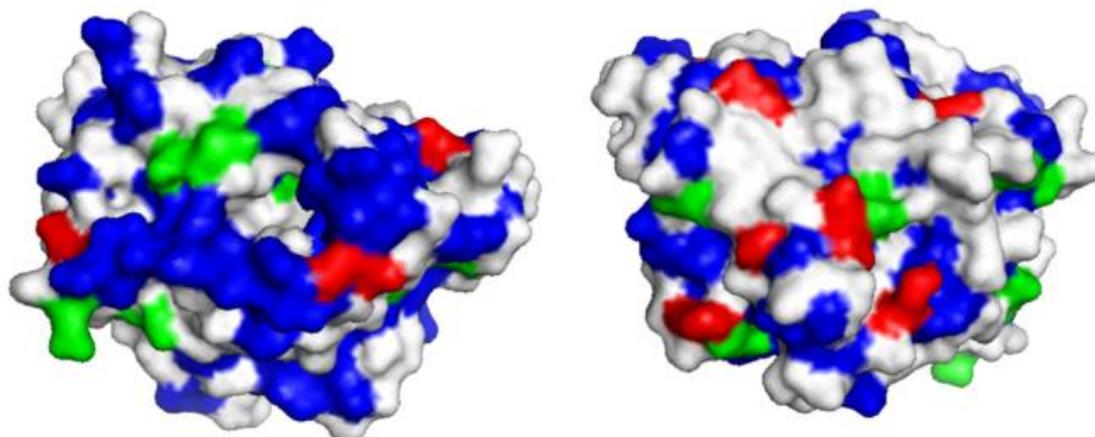


Figura 2-10: Estrutura 3D da superfície da CALB mostrando as faces da tampa (esquerda) e oposta (direita) (Protein Data Bank, code PDB 1TCA). Resíduos azuis - hidrofóbicos; vermelho - Lys e amino terminal; Resíduos verdes - Asp e Glu. Fonte (VESCOVI et al., 2016a)

A composição dos resíduos de aminoácido da CALB é apresentada na Tabela 2-4.

Tabela 2-4: Composição dos resíduos de aminoácido da CALB. Adaptado de (UPPENBERG et al., 1994)

Resíduo de aminoácido	Unidades	% do resíduo de aminoácido
Ala	36	11,36
Arg	8	2,52
Asn	14	4,42
Asp	14	4,42
Cys	6	1,89
Gln	18	5,68
Glu	4	1,26
Gly	26	8,20
His	1	0,32
Ile	11	3,47
Leu	31	9,78
Lys	9	2,84
Met	4	1,26
Phe	10	3,15
Pro	30	9,46
Ser	31	9,78
Thr	27	8,52
Trp	5	1,58
Tyr	9	2,84
Val	23	7,26

2.2.7. Lipase Pancreática de Porco (LPP)

A lipase pancreática de porco (LPP) é a preparação de lipase mais barata comercialmente disponível, o que é recomendado para processos de sínteses em que o custo é considerado como fator crítico (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012; PAULA et al., 2007). É considerada uma das lipases mais promissoras na resolução de álcoois racêmicos e ácidos carboxílicos por meio da hidrólise enantiosseletiva dos ésteres correspondentes (LADNER; WHITESIDES, 1984; MIURA et al., 2008).

Também tem sido utilizada na hidrólise regioseletiva (BAGI; SIMON; SZAJÁNI, 1997), pré-tratamento de águas residuais ricas em lipídios (MASSE; KENNEDY; CHOU, 2001) e sua aplicação em meios orgânicos envolve a síntese de sabores e fragrâncias (GOGOI et al., 2006; OZYILMAZ; GEZER, 2010), biodiesel

(MOREIRA et al., 2007; YESILOGLU, 2004), produtos farmacêuticos (ZHENG et al., 2011), emulsificantes e cosméticos (PAULA et al., 2007; PLOU et al., 1996).

A LPP é uma glicoproteína (Figura 2-11) composta de uma única cadeia de 449 aminoácidos (GARNER; SMITH, 1972; HERMOSO et al., 1996), com massa molecular de 50 - 52 kDa, e um volume molecular de $46 \text{ \AA} \times 26 \text{ \AA} \times 11 \text{ \AA}$ (HERMOSO et al., 1996; MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012).

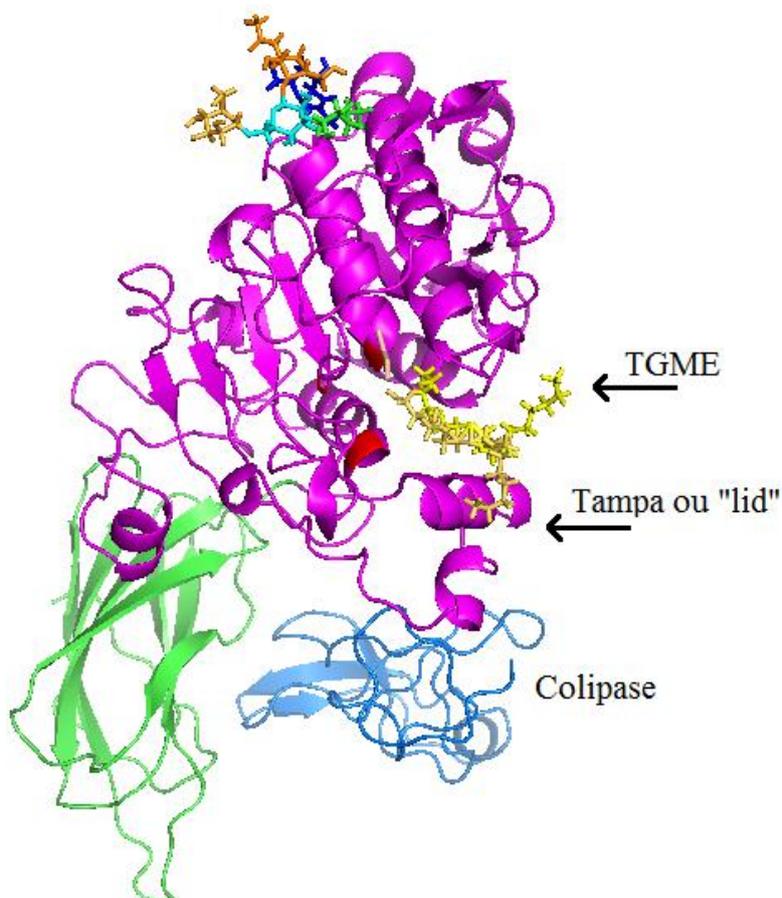


Figura 2-11: Estrutura 3D do complexo LPP - Colipase – Éter monoctílico de tetraetilenoglicol (TGME) (PDB: 1ETH). Construída usando PyMOL Molecular Graphics System, v 1.7.4. Acervo próprio.

A composição dos resíduos de aminoácido da LPP é apresentada na Tabela 2-5.

Tabela 2-5: Composição dos resíduos de aminoácido da LPP. Adaptado de (HERMOSO et al., 1996)

Resíduo de aminoácido	Unidades	% do resíduo de aminoácido
Ala	21	4,68
Arg	21	4,68
Asn	30	6,68
Asp	32	7,13
Cys	14	3,12
Gln	17	3,79
Glu	21	4,68
Gly	39	8,69
His	10	2,23
Ile	26	5,79
Leu	29	6,46
Lys	22	4,90
Met	4	0,89
Phe	25	5,57
Pro	25	5,57
Ser	31	6,90
Thr	25	5,57
Trp	6	1,34
Tyr	16	3,56
Val	35	7,80

A estrutura tridimensional da LPP revelou a presença de dois domínios com funções específicas, o domínio N-terminal que compreende os resíduos 1-336 e a tríade catalítica Ser¹⁵³, Asp¹⁷⁷ e His²⁶³ e o domínio C-terminal composto pelos aminoácidos 337-449, o qual interage exclusivamente com a colipase e a tampa (HERMOSO et al., 1996). A colipase é um pequeno cofator secretado pelo pâncreas com massa molecular de 10 kDa que fixa a lipase à interface água-lipídio revestida com os sais biliares (HERMOSO et al., 1996).

A LPP exibe a atividade mais elevada em meio de pH alcalino na faixa de 7,3-9,0 e com temperaturas entre 35 a 40°C (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012). A hidrólise de triglicerídeos pela LPP ocorre nas posições sn-1 e sn-3 (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012).

2.3. Imobilização de lipases

Apesar das vantagens do uso das enzimas como biocatalisador, há também várias desvantagens que desmotivam a sua aplicação na indústria, tais como, elevado custo de produção e purificação, instabilidade em determinadas condições de processo (temperatura e pH extremos, presença de solventes orgânicos, elevada agitação, etc.) e dificuldade de recuperação custo-efetiva por serem solúveis no meio reacional (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996). Um dos métodos propostos para solucionar essas dificuldades operacionais é a imobilização de enzimas, que basicamente é desenvolvida para possibilitar a reutilização e melhorar a estabilidade da enzima. Além disso, as enzimas são aplicadas em forma imobilizada para tolerar solventes orgânicos, calor e força de cisalhamento (AMINI et al., 2017; JEGANNATHAN et al., 2008).

Os métodos comuns utilizados para a imobilização da lipase incluem adsorção, ligação covalente na superfície de um suporte sólido insolúvel, entrecruzamento de agregados enzimáticos e a retenção física pelo confinamento em matrizes poliméricas, como mostrado na Figura 2-12.

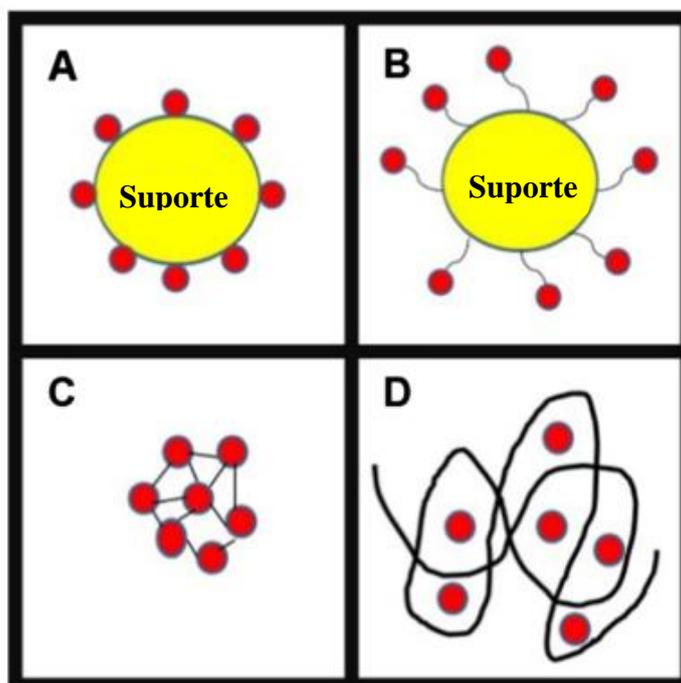


Figura 2-12: Métodos de imobilização: A) Adsorção; B) Ligação covalente; C) Entrecruzamento e D) Retenção física. Fonte: AMINI et al. (2017)

As combinações dos diferentes métodos de imobilização são possíveis (JEGANNATHAN et al., 2008). Na Tabela 2-6 estão descritas as vantagens e desvantagens de cada método de imobilização.

Tabela 2-6: Vantagens e desvantagens dos métodos de imobilização. Fonte: (JEGANNATHAN et al., 2008; ZHAO et al., 2015)

Método	Vantagens	Desvantagens
Adsorção	Fácil preparação Não envolve nenhum produto químico tóxico	Estabilidade da enzima imobilizada muito baixa Reutilização limitada Inadequada para aplicações industriais.
Ligação covalente	O suporte deve ser ativado por um reagente específico Ligações fortes Aumenta a estabilidade da enzima	Custos mais elevados Atividade recuperada baixa Pode mudar a estrutura da enzima
Retenção física	Mais estável que a lipase imobilizada por adsorção	Problemas de transferência de massa
Entrecruzamento	Alta atividade recuperada Alta atividade volumétrica Baixo custo de produção Enzimas não purificadas	Baixos rendimentos de imobilização Dificuldade na separação Baixa estabilidade mecânica

A imobilização de lipases tem sido assunto de vários trabalhos científicos (BAGI; SIMON; SZAJÁNI, 1997; DA RÓS et al., 2010; DE LIMA et al., 2017; FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; KOPP et al., 2015; SÉVERAC et al., 2011; VESCOVI et al., 2017; VESCOVI; DOS SANTOS; TARDIOLI, 2017). Um dos métodos mais vantajosos para imobilizar lipases é a adsorção em suportes hidrofóbicos, pois na presença de interfaces hidrofóbicas (gotas de óleo, bolhas de ar, superfícies hidrofóbicas, etc.) algumas lipases apresentam ativação interfacial, podendo ser

imobilizadas com a tampa aberta, independente do meio em que a enzima será utilizada (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008).

Assim, a escolha adequada de um suporte para a imobilização de lipases depende especialmente do seu caráter hidrofóbico/hidrofílico, além de fatores comuns a todas as enzimas, tais como, resistência mecânica, resistência microbiológica, disponibilidade de grupos funcionais reativos para ligações com a enzima e/ou modificações químicas, estabilidade térmica, durabilidade química, facilidade de regeneração, capacidade de carga e custo (MATEO et al., 2007; VILLENEUVE et al., 2000).

A recuperação e a reutilização do derivado enzimático são questões de suma importância quando se pensa em sua aplicação industrial, principalmente visando a produção de biomoléculas que não possuem alto valor agregado, como por exemplo, ésteres etílicos (ou metílicos) de ácidos graxos (biodiesel). Suportes magnéticos podem ser uma alternativa viável, pois podem ser manipulados remotamente através da aplicação de um campo magnético externo (FRANZREB et al., 2006). Partículas magnéticas com grupos funcionais em sua superfície específicos para a imobilização enzimática podem tornar factível a separação seletiva de enzimas imobilizadas (MA et al., 2006) para processos onde a separação por filtração convencional ou centrifugação não seria possível ou viável economicamente (KOPP, 2013; TARTAJ et al., 2005).

2.3.1. CLEA

Os métodos para imobilizar enzimas sem o uso de suportes estão ganhando importância, e uma dessas técnicas de imobilização muito estudada nos últimos anos é a formação de agregados enzimáticos reticulados (CLEAs do inglês: cross-linked enzyme aggregates). CLEAs são obtidos pelo entrecruzamento covalente de uma ou várias enzimas unidas em um complexo supramolecular usando um agente bifuncional, como o glutaraldeído, ou um polímero reativo (por exemplo, dextrana ou amido oxidados), formando assim agregados insolúveis que retêm completa ou parcialmente a atividade catalítica, como é apresentado na Figura 2-13. Esta metodologia é baseada no fenômeno de precipitação induzida por sais inorgânicos, polímeros ou solventes orgânicos, em condições que mantenham a atividade catalítica das enzimas (CAO et al., 2001; CAO;

VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000; LÓPEZ-SERRANO et al., 2002; RUIZ TORAL et al., 2007).

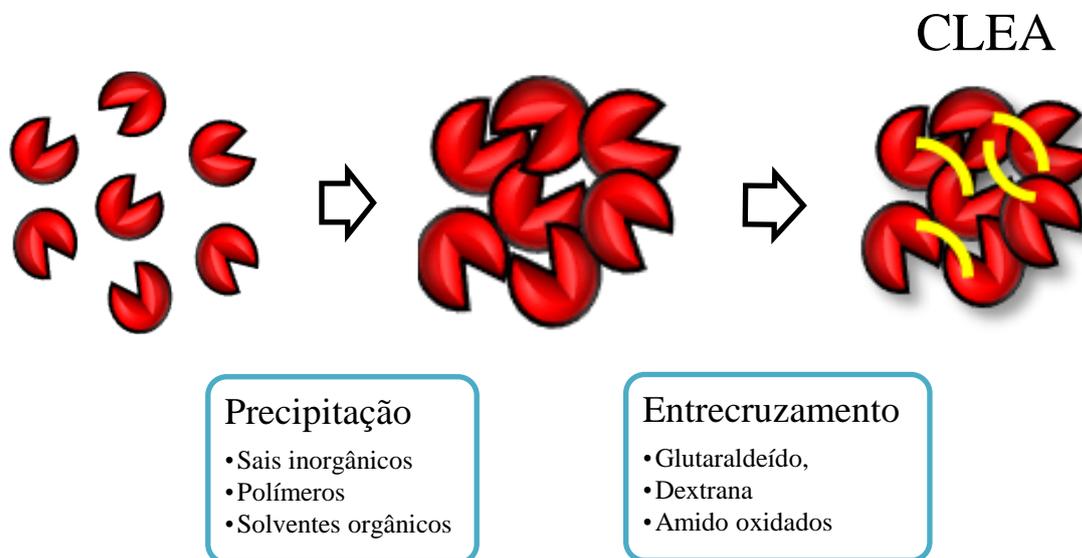


Figura 2-13: Imobilização de enzimas pela técnica CLEA

Este método de imobilização é interessante pela sua simplicidade. Além disso, oferece a possibilidade de usar uma enzima semi-purificada e a oportunidade de coimobilizar diferentes enzimas. Devido à ausência de compostos não catalíticos como suportes e apenas uma pequena quantidade de agente entrecruzante, a técnica CLEA permite a obtenção de biocatalisadores com elevada atividade volumétrica e menores custos de produção (MATEO et al., 2004). Entretanto, a sua principal desvantagem é a dificuldade no manuseio e recuperação das partículas de biocatalisador devido à sua baixa resistência mecânica, além dos problemas difusivos de transferência de massa, principalmente com substratos macromoleculares (WILSON et al., 2004).

CLEAs de várias enzimas, incluindo as lipases tem sido reportado na literatura, rendendo atividades muito superiores aos das enzimas livres, tanto para as lipases como para outras enzimas (LÓPEZ-SERRANO et al., 2002; SCHOEVAART et al., 2004).

Mediante precipitação e entrecruzamento simultâneos de duas ou mais enzimas, é possível produzir um CLEA que pode catalisar uma ampla variedade de

biotransformações e reações em cascata (DALAL; KAPOOR; GUPTA, 2007). Esses CLEAs têm sido chamados de Combi-CLEAs.

Particularmente para lipases, podem-se preparar misturas com diferentes regioespecificidades e/ou quimioespecificidades, além da possibilidade de se obter derivados com atividade muito superior ao da enzima livre. Essa hiperativação pode ser causada por mudanças conformacionais da proteína induzidas pelo agente precipitante e/ou aditivos, que por ação do agente de reticulação, “congela” a proteína numa conformação cataliticamente favorável (DALAL; KAPOOR; GUPTA, 2007; LÓPEZ-SERRANO et al., 2002; SCHOEVAART et al., 2004; SHELDON, 2007; SHELDON; SCHOEVAART; VAN LANGEN, 2005).

2.4. Reator de fluxo em vórtice

O reator de fluxo em vórtice (RFV) consiste de dois cilindros concêntricos: o cilindro exterior é estático e o cilindro interior gira induzindo pela sua rotação um fluxo em vórtice. A Figura 2-14 mostra um esquema do reator de fluxo em vórtice. É possível operar o RFV em regime batelada, semi-contínuo ou contínuo.

O uso deste tipo de reator é motivado pelas características do fluxo em vórtice ou mais conhecido como fluxo Taylor-Couette. Os vórtices promovem uma agitação eficiente, bem como elevadas taxas de transferência de massa e calor. A agitação menos agressiva do que a obtida com agitadores convencionais é uma característica importante quando as partículas do biocatalisador são sensíveis ao cisalhamento (GIORDANO et al., 1998; MOORE, 1994).

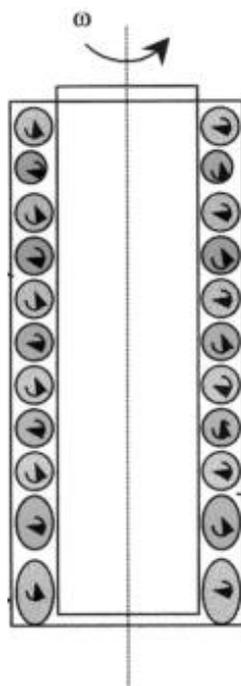


Figura 2-14: Reator de fluxo em vórtice. Adaptado de (GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000)

Por meio da alteração da velocidade de rotação do cilindro interno, é possível abranger uma série de diferentes padrões de fluxo, desde o laminar até o turbulento (GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000).

Com baixas velocidades de rotação do cilindro interno apresenta-se o denominado fluxo laminar-Couette (Figura 2-15a). Esse padrão de fluxo não apresenta velocidade axial, portanto o transporte de massa que ocorre na direção axial é dado somente por mecanismos de difusão, assemelhando-se com um reator de fluxo em pistão. Acima de uma velocidade de rotação crítica, apresenta-se outro padrão de fluxo, fluxo laminar de Taylor, onde o fluxo circular se bifurca para uma série de vórtices toroidais assimétricos em contra-rotação (Figura 2-15b). Estas condições permitem um acréscimo de transferência de massa, sendo semelhante a um sistema de CSTRs conectados em série, com uma adequada transferência de massa entre os vórtices (RESENDE et al., 2001). Um posterior aumento na velocidade de rotação gera um terceiro padrão de fluxo oscilante, gerando ondas azimutais que viajam em torno do cilindro interno, conhecido como fluxo de vórtices “wavy” (Figura 2-15c). Um posterior aumento na rotação do cilindro interno torna o sistema turbulento (Figura 2-15d).

Nestes, casos, a transferência de massa entre vórtices torna-se dominante e todo o reator com fluxo de vórtice se comporta como um CSTR (CURRAN; BLACK, 2004; RESENDE et al., 2001).

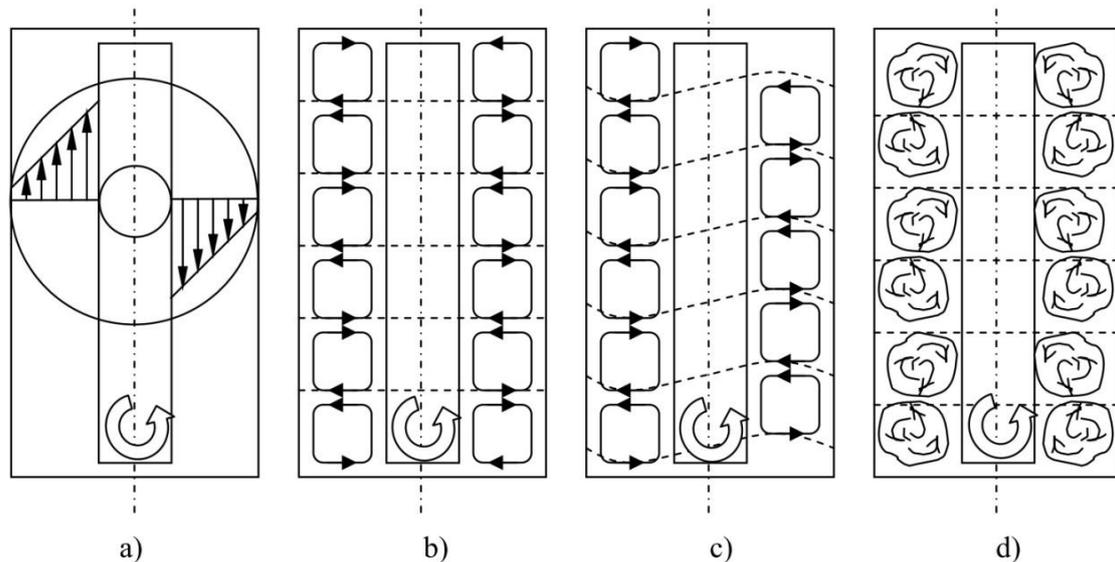


Figura 2-15: (a) Regime de Couette laminar, (b) regime de Taylor laminar, (c) regime de vórtices “wavy”, (d) e turbulento. Fonte: ilustração obtida no site <https://www.tvt.kit.edu/21_1899.php>.

Para o RFV, a hidrodinâmica é descrita pelo número adimensional de Taylor, que descreve a relação entre as forças rotativas e as viscosas, definido pela equação (2-1)

$$Ta = \frac{\Omega_i r_i d}{\nu} \left(\frac{d}{r_i} \right)^{0,5} = Re \left(\frac{d}{r_i} \right)^{0,5} \quad (2-1)$$

Onde Ω é a velocidade (rad/s) do cilindro interno, d é a largura do espaço entre os dois cilindros (cm), ν é a viscosidade cinemática (cm²/s) e r_i é o raio do cilindro interno (cm). Os quatro regimes principais, são diferenciados pelo número de Taylor, sendo eles: o laminar Couette entre 0 e 41,3; o fluxo com vórtices de Taylor para o número de Taylor crítico, $Ta_{crit} = 41,3$, que é geralmente apresentado em sistemas com uma relação de aspecto elevada ($\Gamma = L/d > 20$), isto é, onde a largura (d) do intervalo anular é relativamente pequena; o fluxo em vórtices “wavy” com número de Taylor de 115,2, para uma relação de aspecto alta ($\Gamma > 20$) que só apresentar com uma relação de

raios inferior a 1,4, e finalmente o fluxo turbulento apresentado a um número de Taylor de 288 (CURRAN; BLACK, 2004; MOORE, 1994).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Enzimas

As lipases comerciais de *Candida antarctica* fração B (CALB), *Termomyces lanuginosus* (LTL), *Pseudomonas fluorescens* (LPF) e pâncreas de porco Tipo II (LPP) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

3.1.2. Proteínas espaçadoras

Proteínas inertes como albumina de soro bovino (BSA) marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e proteína de soja (PS) 92% da Doremus Ingredientes (Brasil), obtida no mercado local, foram usadas como proteínas espaçadoras na formação dos CLEAs.

3.1.3. Agentes precipitantes

Foram usados como agentes precipitantes: acetona marca Qhemis (Jundiaí, SP, Brazil), Sulfato de amônia 99% marca JT Baker (Pensilvânia, USA) e etanol hidratado (96%) obtido em posto de combustível local.

3.1.4. Agentes entrecruzantes

Como agentes entrecruzantes foram usados glutaraldeído (25%, v/v) marca Vetec Química Fina (Duque de Caixas, RJ, Brazil) e polialdeído-amido obtido a partir do amido solúvel marca Panreac Química (Barcelona, Spain).

3.1.5. Substratos

Para a medida da atividade hidrolítica das lipases, utilizou-se tributirina, adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), como substrato.

Para as reações de transesterificação foram usados como substratos óleo de soja marca Liza[®] adquirido no mercado local e etanol anidro (99,8 %) marca Synth

(Diadema, SP, Brazil). A composição em ácidos graxos do óleo é mostrada na Tabela 3-1.

Tabela 3-1: Ácidos graxos presentes no óleo de soja Liza®

Ácido graxo	(PRADO et al., 2014)	(AVELAR et al., 2013)	(DE ARAÚJO et al., 2011)	(DE REZENDE et al., 2008)
	Composição (% em massa)			
Ác. Cáprico (10:0)	0,11			
Ác. Lauríco (12:0)	0,78			
Ác. Mirístico (14:0)	0,23			
Ác. Palmítico (16:0)	13,51	10,70	11,40	12,70
Ác. Palmitoleico (16:1)	0,09	0,03		
Ác. Estearíco (18:0)	3,45	3,00	1,20	4,60
Ác. Oleico (18:1)	24,04	24,00	25,80	32,70
Ác. Linoleico (18:2)	50,50	56,70	56,50	50,00
Ác. Linolênico (18:3)	5,07	5,40	5,00	
Ác. Araquidônico (20:0)	0,14	0,10		

3.1.6. Padrões e outros reagentes

Reagente Bradford foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Álcool terc-butilico (ATB) marca Panreac Química (Barcelona, Spain). Metaperiodato de sódio marca Synth (Diadema, SP, Brazil). Heptadecanoato de etila marca Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Padrão de lipídeos: misturas de ésteres metílicos de ácidos graxos C14-C22 marca Supelco, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Todos os outros reagentes empregados foram de grau analítico.

3.2. Métodos

3.2.1. Seleção da mistura de lipases

A seleção das lipases para imobilização pela técnica CLEA, a relação em que foram misturadas e a temperatura usada na síntese de biodiesel foram avaliadas em diferentes misturas de lipases solúveis na transesterificação de óleo de soja com etanol a diferentes temperaturas 30°C, 40°C e 50°C durante 8 h, conforme metodologia descrita no item 3.2.6. As quatro preparações de lipases foram misturadas em suas possíveis combinações (CALB – LTL; CALB – LPF; CALB – LPP; LTL – LPF; LTL – LPP e

LPP – LPP), avaliando no total 6 misturas com 3 diferentes proporções 75 % - 25 %, 50 % - 50 % e 25 % - 75 %.

3.2.2. Inativação das lipases LTL e LPP livres

Para confirmar a ação sinérgica das lipases foram realizados ensaios de transesterificação com a mistura das lipases LTL e LPP e inativando uma das lipases por vez.

A LTL foi inativada antes de cada experimento em banho de água fervente e a LPP foi inativada deixando uma quantidade da preparação em pó submersa em metanol por 1 h e seca a 60°C durante 24 h.

3.2.3. Seleção de agente precipitante

Em um tubo falcon de 15 mL com 3 mL de precipitante (solução saturada de sulfato de amônio, etanol hidratado ou acetona) foi adicionado 1,0 mL de solução de enzima (5,0 mg de proteína/mL, preparado por dissolução da LPP em tampão fosfato de sódio 5,0 mM, pH 7,0) em banho de gelo. A mistura resultante foi mantida sob agitação (150 rpm) durante 3 h a 4°C em um agitador orbital (Marconi, MA830); o tubo falcon permaneceu deitado durante o experimento. Depois, a suspensão foi centrifugada a $10414 \times g$ durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a fase sólida foi dissolvida em 3,0 mL de tampão fosfato de sódio 5,0 mM a pH 7,0. O rendimento de precipitação foi calculado a partir da equação (3-1).

$$\text{Rendimento de precipitação (\%)} = \frac{A_{ag}}{A_i} * 100\% \quad (3-1)$$

Onde A_{ag} é a atividade total dos agregados redissolvidos (TBU) e A_i é a atividade total da solução inicial de enzima (TBU).

A seleção do agente precipitante foi feita unicamente para a LPP devido à pouca informação reportada na literatura em relação com a preparação de CLEAs de LPP. Para a LTL, vários protocolos de preparação de CLEAs são reportados na literatura, portanto, a seleção do agente precipitante não foi realizada. No entanto, foi confirmada a precipitação total da LTL quando foi usado o etanol como agente precipitante, usando a metodologia descrita neste item.

3.2.4. Metodologia de preparação de CLEAs

3.2.4.1. Preparação de CLEAs (experimentos preliminares)

Com o objetivo de confirmar a ação conjunta das lipases e a possibilidade de coimobilização das lipases selecionadas pela técnica CLEA, foram realizados experimentos preliminares de imobilização e transesterificação com os derivados obtidos. As condições de imobilização nos experimentos preliminares não foram otimizadas e só foi medida a atividade recuperada global e atividade específica dos CLEAs de LPP, LTL e do Combi-CLEA preparados. A metodologia de preparação desses CLEAs é apresentada a seguir.

Cinco mililitros de solução enzimática foram preparados em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7, contendo um total de 24000 TBU (lipases individuais ou misturadas em uma relação 50 % - 50 %) e proteína de soja (adicionada como proteína espaçadora) até uma concentração final de 50 mg de proteína total/mL de solução. O CLEA preparado a partir de uma solução das lipases misturadas foi denominado Combi-PS-CLEA. Em seguida, foi adicionada acetona para uma razão volumétrica de 3:1 (volume acetona/volume solução enzimática). A solução resultante foi mantida sob agitação de 200 rpm em um agitador orbital (Marconi, MA830) a 4°C (etapa de precipitação); após 30 min, foi adicionado glutaraldeído para uma concentração final de 8 µmol de grupos aldeído/mg de proteína total (enzima + proteína de soja). Após a adição do glutaraldeído, a solução resultante foi mantida sob agitação de 200 rpm a 4°C durante 2,5 h (etapa de entrecruzamento). O tubo falcon de 50 mL utilizado no experimento permaneceu deitado durante o experimento. Finalmente, a suspensão foi centrifugada a $10414 \times g$ durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o CLEA obtido foi lavado duas vezes com tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7,0. Os CLEAs resultantes foram ressuspensos em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7,0, para medida de atividade hidrolítica.

3.2.4.2. CLEA de LPP

Em um tubo falcon de 15 mL contendo 3 mL de precipitante foi adicionado 1,0 mL de solução de LPP (5,0 mg de proteína/mL, preparada pela diluição da LPP em tampão fosfato de sódio 5,0 mM, pH 7,0) em banho de gelo. A mistura resultante foi

mantida sob agitação a 150 rpm e 4°C em agitador orbital (Marconi, MA830), (etapa de precipitação). Após 30 min, foi adicionado o agente entrecruzante (glutaraldeído ou polialdeído-amido) e a imobilização prosseguiu durante 2,5 h (etapa de entrecruzamento), com o tubo falcon mantido deitado durante o experimento. Finalmente, a suspensão foi centrifugada a $10414 \times g$ durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a fase sólida foi lavada duas vezes, com 3,0 mL de tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 (ou com etanol hidratado, quando o CLEA de LPP foi usado na transesterificação de óleo de soja). A atividade de hidrólise foi medida nos sobrenadantes de lavagem. O CLEA de LPP resultante (denominado LPP-CLEA) foi ressuspensionado em 3,0 mL de tampão fosfato de sódio 5,0 mM, pH 7,0 (ou etanol hidratado) e sua atividade de hidrólise foi determinada usando tributirina como substrato, conforme metodologia descrita no item 3.2.10.

O CLEA de LPP também foi preparado usando proteína de soja (denominado LPP-PS-CLEA). Neste caso, o protocolo geral de preparação de CLEA foi o mesmo já descrito, exceto que a solução de proteína continha LPP e PS nas razões mássicas LPP/PS de 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 e 1:9.

3.2.4.3. CLEA de LTL

O CLEA de LTL foi preparado baseado na metodologia descrita por LÓPEZ-SERRANO et al. (2002). Em um tubo falcon de 15 mL, 1,0 mL de solução de LTL (preparada pela diluição de 0,5 mL da solução de estoque de LTL em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7 e 2,5% (m/v) de SDS) foi adicionado a 3,0 mL de etanol hidratado em banho de gelo. Foi adicionado 80 μ L de glutaraldeído 25% (v/v) e a imobilização prosseguiu durante 16 h, sob agitação de 150 rpm e 4°C em agitador orbital (Marconi, MA830), com o tubo falcon permanecido deitado durante o experimento. Um volume de 1,0 mL de etanol hidratado foi adicionado à mistura final, que foi, então, centrifugada. O sobrenadante foi descartado e o resíduo lavado 2 vezes com 5 mL de etanol hidratado, centrifugado e decantado (a atividade de hidrólise foi medida nos sobrenadantes de lavagem). A preparação enzimática obtida foi mantida em 5,0 mL de etanol hidratado (daqui em diante denominada LTL-SDS-CLEA).

A atividade recuperada e o rendimento de imobilização nos CLEAs foram determinados a partir da Eq. (3-2) e Eq. (3-3), respectivamente.

$$\textit{Atividade recuperada} (\%) = \frac{A_{CLEA}}{A_i - (A_{sobre} + A_{lav})} * 100 \quad (3-2)$$

$$\textit{Rendimento de imobilização} (\%) = \frac{A_i - (A_{sobre} + A_{lav})}{A_i} * 100 \quad (3-3)$$

Onde A_{CLEA} é a atividade total do CLEA ressuspenso (TBU), A_i é a atividade total da solução inicial de enzima (TBU), A_{sobre} é a atividade total no sobrenadante (TBU) e A_{lav} é a atividade total nas lavagens (TBU).

Em alguns casos foi calculada uma atividade recuperada global definida a partir da Eq. (3-4):

$$\textit{Atividade recuperada global} (\%) = \frac{A_{CLEA}}{A_i} * 100 \quad (3-4)$$

3.2.5. Tratamento dos CLEAs para seu uso nas reações de transesterificação

Para posterior utilização na transesterificação de óleo de soja, os CLEAs de LPP e LTL, após as lavagens com tampão fosfato de sódio ou etanol (metodologia descrita nos item 3.2.4.2 e 3.2.4.3), foram novamente lavados 2 vezes com álcool terc-butílico. Isso foi feito para retirar a maior quantidade de água da estrutura dos CLEAs, a fim de evitar a reação de hidrólise, não desejada.

O CLEA foi suspenso em álcool terc-butílico numa razão de 20% (massa/volume), a suspensão foi mantida sob agitação suave a temperatura ambiente em agitador orbital durante 10 min. Após lavagem, a fase sólida foi centrifugada a $10414 \times g$ durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a fase sólida foi lavada mais uma vez. Finalmente, o CLEA foi seco em geladeira a 4°C até obter massa constante. A atividade de hidrólise dos CLEAs de LPP e LTL tratados com álcool terc-butílico foi determinada pelo método de hidrólise de tributirina (descrito no item 3.2.10), usando $100 \mu\text{L}$ de uma suspensão, $2,5 \text{ mg}$ de CLEA/mL de etanol. Não foi possível medir a atividade de hidrólise dos CLEAs sólidos devido à grande concentração de enzima por mg de CLEA.

3.2.6. Reação de transesterificação do óleo de soja com etanol

As reações de transesterificação foram realizadas em frascos fechados de 50 mL contendo óleo de soja e etanol anidro numa razão molar de 1:5. A reação foi iniciada pela adição da lipase solúvel ou imobilizada e mantida a 30°C e 300 rpm em shaker com agitação horizontal. As quantidades dos reagentes e de enzima oferecidas variou dependendo do tipo de experimento para oferecer diferentes razões de atividade de hidrólise (TBU) por cada grama de óleo de soja, como descrito a seguir (Tabela 3-2).

Tabela 3-2: Atividade enzimática oferecida nas reações de transesterificação

Experimento	% de biocatalisador (m/m meio de reação)	Atividade oferecida (TBU/g óleo de soja)
Seleção da mistura de lipases ^a	1 - 3	500
CLEAs preliminares individuais ou misturados	30	2500
Perfil de concentração de EEAG com LPP-PS-CLEA	12	2600
Perfil de concentração de EEAG com LPP-PS-CLEA	7,5	3000
Perfil de concentração de EEAG com LTL-SDS-CLEA	3,1	3000
Perfil de concentração de EEAG com LTL-SDS-CLEA	6,0	6000
Mistura dos CLEAs de LPP e LTL	11	6000

^aForam usados 10,0 g de óleo de soja.

Amostras foram coletadas periodicamente e submetidas a uma etapa de purificação do biodiesel produzido na reação.

3.2.6.1. Purificação do Biodiesel

Para a purificação do biodiesel produzido nas reações de transesterificação, o meio reacional foi submetido a duas lavagens com água fervente na relação biodiesel:água de 1:1. Após cada lavagem, a amostra foi centrifugada, recuperando-se a fase superior, composta pelos ésteres de etila (biodiesel), e descartando-se a fase inferior, composta pelo glicerol e água de lavagem. A amostra final foi seca a 60°C por 16 h em estufa antes de ser submetida à análise de ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAG) por cromatografia gasosa.

3.2.7. Estabilidade operacional dos CLEAs

3.2.7.1. Reuso do CLEA de LPP

O reuso foi avaliado em reações de transesterificação conduzidas em três diferentes sistemas de reação (50 mL): frascos fechados agitados a 300 rpm em shaker com agitação orbital (Marconi, MA832), reator de fluxo em vórtice com razão de raios (η) de 0,24, razão de aspecto (Γ) de 6,72 e rotação do cilindro interno de 900 rpm (IKA®, RW 20), suficiente para que ocorresse a suspensão total das partículas dos CLEAs, e reator tipo cesto com agitação magnética a 1000 rpm (IKA®, C-MAG HS 7). As dimensões dos dois últimos reatores são apresentadas na Figura 3-1. As reações de transesterificação foram realizadas empregando óleo de soja e etanol anidro numa relação molar de 1:5 a 30°C durante 24 h (cada ciclo). A reação foi iniciada pela adição do CLEA de LPP, oferecendo uma carga enzimática de 3500 TBU/g de óleo.

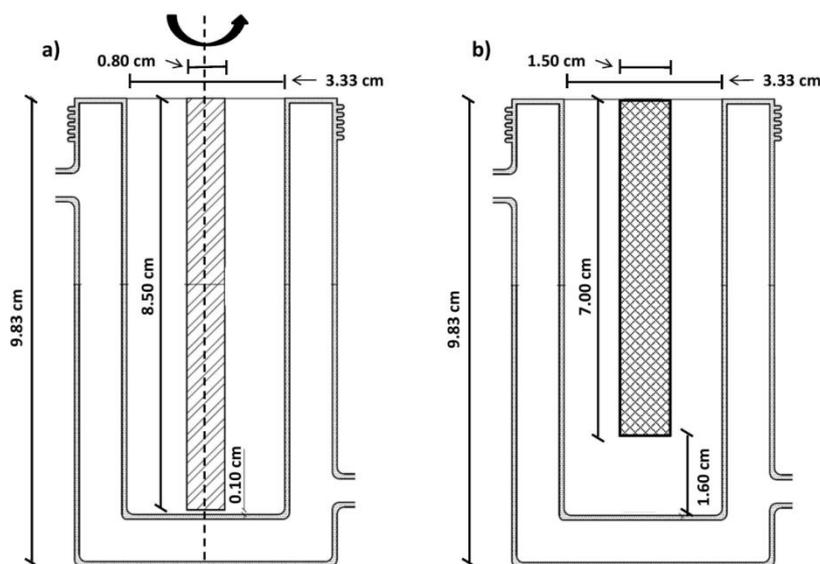


Figura 3-1: Configuração dos reatores usados para avaliar a estabilidade operacional do LPP-PS-CLEA. a) Reator de fluxo em vórtice, b) Reator tipo cesto.

3.2.7.2. Reuso da mistura de CLEAs em reator de fluxo em vórtice

O reuso da mistura de CLEAs de LPP e LTL foi avaliado em reações de transesterificação conduzidas em bateladas na relação molar de 1:3 a 30°C durante 6 h em reator de fluxo em vórtice (ver Figura 3-1), com agitação mecânica variando de 900

até 2000 rpm a cada 2 h (IKA®, RW 20), suficiente para que ocorresse a suspensão total das partículas dos CLEAs. A reação foi iniciada pela adição dos CLEA de LPP e LTL, oferecendo uma carga enzimática total de 6000 TBU/g de óleo.

3.2.8. Determinação do teor de água nos CLEAs

O teor de água nos CLEAs foi determinado pelo método titulométrico de Karl Fisher no Tritrino 907 titrator (Metrohm, Herisau, Switzerland) (MARGRETH; SCHLINK; STEINBACH, 2010).

3.2.9. Determinação da concentração de proteína

O teor de proteína nas preparações enzimáticas foi determinado pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976), baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 à proteína. Albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como proteína padrão na preparação da curva padrão.

3.2.10. Determinação de atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica foi determinada pelo método de hidrólise de tributirina, baseado na metodologia descrita por BEISSON et al. (2000), com pequenas modificações. O método consiste na hidrólise de uma mistura de 1,5 mL de tributirina, 5,0 mL de tampão fosfato 100 mM pH 7,5 e 14 mL de água destilada a 37°C por 5 min, usando 100 µL de solução de lipase (ou CLEA ressuspendido) na diluição adequada, sob agitação de 500 rpm. O ácido butírico liberado foi titulado com solução de KOH 20 mM em titulador TITRINO 907 (Metrohm, Herisau, Suíça). Uma unidade de tributirina (TBU) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol do ácido butírico sob as condições experimentais.

3.2.11. Preparação do polialdeído-amido

Um massa de 1,65 g de amido solúvel foi dissolvida em 50 mL de água destilada em banho de água fervente durante 10 min. Após ajustar o pH da solução para 4,0, foram adicionados 3,85 g de metaperiodato de sódio. O pH foi, então, novamente ajustado para 4,0. A solução resultante foi incubada a 30°C, protegida da luz, por 2,0 h. Os grupos hidroxila ativados foram oxidados a grupos aldeído. Posteriormente, a solução foi dialisada 5 vezes, usando uma membrana de 10 kDa, e 4L de água

deionizada durante pelo menos 2 h à temperatura ambiente e sob agitação suave (YU; CHANG; MA, 2010). Os grupos aldeído foram quantificados por iodometria (NEVELL, 1963). Nas condições acima, a concentração de grupos aldeído na solução de amido foi de aproximadamente 200,0 $\mu\text{mol/mL}$.

3.2.12. Cromatografia Gasosa

EEAG foram quantificados por cromatografia gasosa em um cromatógrafo a gás Agilent 7890 A, equipado com detector de ionização por chama (250 °C). Os ésteres etílicos foram separados em uma coluna capilar HP-Innowax (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm). A temperatura da coluna começou a 150°C durante 2 min e depois foi aumentada para 180°C a 10°C/min. Esta temperatura foi mantida por 3 minutos, sendo novamente aumentada para 230°C a 10°C/min e mantida por 12 minutos. O heptadecanoato de metila foi usado como padrão interno. As amostras de EEAG (50 mg) foram diluídas em 1,0 mL de heptadecanoato de metila (10 mg/mL, em heptano) e 1,0 μL foi injetado no equipamento. A concentração mássica percentual foi calculada de acordo com a Equação (3-5):

$$\text{Concentração mássica de FAEE} = \frac{(\Sigma A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100\% \quad (3-5)$$

Onde ΣA é a área total do pico de ésteres etílicos de ácidos graxos de C14:0 a C22:0 (o padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos foi usado para a identificação dos picos); A_{EI} é a área do pico do heptadecanoato de metila (C17); C_{EI} é a concentração do heptadecanoato de metila (10 mg/mL); V_{EI} é o volume da solução do heptadecanoato de metila (1 mL), e m é a massa de amostra de biodiesel (~ 50 mg) (LIMA et al., 2015).

3.2.13. Determinação de MAG, DAG, TAG

Os acilglicerídeos foram determinados por CLAE Waters com detector UV (206 nm) usando a coluna de fase reversa Ascentis® Express C18, conforme a metodologia reportada por HOLCAPEK et al. (1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos neste trabalho.

Foram estudadas três preparações comerciais de lipases solúveis de fonte microbiana e uma de fonte animal: *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Pseudomonas fluorescens* (LPF), *Candida antarctica* fração B (CALB) e lipase de pâncreas de porco (LPP). Na Tabela 4-1 são apresentadas as principais características dessas preparações.

Tabela 4-1: Caracterização das enzimas comerciais

Lipase	Atividade de hidrólise (TBU/g ou mL)	Concentração de proteína (mg/ g ou mL)	Atividade específica (TBU/ mg de proteína)
LTL ^a	60969,5 ± 847,0	23,1 ± 0,04	2639,4
CALB ^a	13122,3 ± 46,0	9,3 ± 0,1	1411,0
LPF ^b	21700,0 ± 0,9	19,8 ± 0,1	1096,0
LPP ^b	31500,0 ± 0,2	132,6 ± 0,5	237,6

^a Preparações de lipases disponíveis em solução; atividade de hidrólise em TBU/mL; Concentração de proteína em mg/mL

^b Preparações de lipases disponíveis na forma em pó, atividade de hidrólise em TBU/g de pó; Concentração de proteína em mg/g de pó

4.1. Seleção da mistura de lipases para a síntese de biodiesel

Na Tabela 4-2 são apresentados os resultados dos ensaios de transesterificação conduzidos com as misturas de lipases a 30°C, 40°C e 50°C. Estudos reportados na literatura têm apresentado as lipases microbianas de *Thermomyces lanuginosus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Candida antarctica* fração B mais eficientes do que a lipase de pâncreas de porco nas reações de transesterificação de óleos vegetais (óleo de soja, óleo de palma, óleo de Jatropha) (GAMBA; LAPIS; DUPONT, 2008; GULDHE et al., 2015; MOREIRA et al., 2007; NGUYEN et al., 2017; SEBASTIAN; MURALEEDHARAN; SANTHIAGU, 2017; SHAH; SHARMA; GUPTA, 2004; SOUZA; MENDES; CASTRO, 2016). De fato, a menor concentração mássica de EEAG (0,22%) foi obtida com a lipase pâncreas de porco a 30°C, sendo a LPF mais ativa, também a 30°C (7,42%). Este comportamento também se repete para as transesterificações realizadas a 40°C e 50°C (Tabela 4-2).

Tabela 4-2: Concentração mássica de EEAG alcançada na transesterificação do óleo de soja com as lipases livres individuais e misturadas, carga enzimática total oferecida de 500 TBU/g de óleo, razão molar óleo de soja/etanol de 1: 5, a 30°C, 40°C e 50°C, 300 rpm, durante 8 h de reação.

Teste	Porcentagem de atividade de cada lipase na mistura				Concentração mássica de EEAG (%)		
	LTL	LPP	LPF	CALB	30 ° C	40 ° C	50 ° C
1	100				4,32 ± 1,19	1,85 ± 0,44	1,33 ± 0,36
2	75	25			15,16 ± 1,72	5,35 ± 1,26	3,71 ± 2,35
3	<u>50</u>	<u>50</u>			22,03 ± 0,05	4,94 ± 1,15	3,95 ± 0,56
4	25	75			8,80 ± 0,33	4,18 ± 2,43	1,53 ± 0,64
5		100			0,22 ± 0,03	0,65 ± 0,02	1,37 ± 1,29
6	75		25		10,31 ± 0,19	5,78 ± 0,04	5,66 ± 0,02
7	50		50		11,50 ± 4,65	5,40 ± 0,02	4,68 ± 2,22
8	25		75		9,75 ± 2,36	6,95 ± 0,84	5,84 ± 3,57
9			100		7,42 ± 0,68	5,72 ± 0,08	5,62 ± 3,89
10	75			25	5,63 ± 0,39	5,37 ± 0,02	3,78 ± 1,23
11	50			50	4,36 ± 1,01	4,44 ± 0,11	4,67 ± 0,54
12	25			75	1,77 ± 0,87	4,05 ± 1,07	4,56 ± 0,58
13				100	1,90 ± 1,35	3,13 ± 0,13	5,12 ± 0,39
14		75	25		4,22 ± 2,23	3,19 ± 0,40	3,65 ± 2,08
15		50	50		9,97 ± 1,06	5,18 ± 1,01	5,12 ± 1,46
16		25	75		7,24 ± 1,03	6,13 ± 0,58	5,69 ± 1,97
17		75		25	1,22 ± 0,29	2,87 ± 0,70	4,01 ± 1,33
18		50		50	1,64 ± 0,80	3,36 ± 0,21	3,92 ± 1,02
19		25		75	2,20 ± 1,40	3,41 ± 0,93	2,82 ± 1,53
20			75	25	3,80 ± 1,27	4,96 ± 0,04	3,28 ± 0,03
21			50	50	3,53 ± 1,18	5,27 ± 0,02	1,08 ± 0,08
22			25	75	1,91 ± 0,16	5,15 ± 0,05	4,01 ± 0,02

Entretanto, a concentração de EEAG com 100 % de LTL livre (500 TBU/g óleo) a 30°C foi de 4,32 % (Tabela 4-2, teste 1), enquanto que com a mistura 50 % de LTL (250 TBU/g óleo) e 50 % de LPP (250 TBU/g óleo) a 30 °C, essa concentração atingiu 22,03 % (Tabela 4-2, teste 3), a maior concentração de EEAG alcançada nestes experimentos. A mistura dessas lipases a 40 °C e 50 °C também mostraram concentrações de EEAG maiores às alcançadas com as lipases individuais, confirmando o efeito positivo da mistura destas lipases. No entanto, o aumento da temperatura

diminuiu a concentração mássica de EEAG obtida com a mistura das lipases LTL e LPP em todas as proporções avaliadas; essa diminuição pode ser explicada pela desativação térmica das lipases, além do efeito negativo do etanol sobre a estrutura da lipase (CHRISTOPHER; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, 2014). A polaridade do etanol pode alterar a conformação nativa da enzima, interrompendo as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas, levando à agregação e inativação irreversível da enzima (KIRAN; SURESH BABU; DIVAKAR, 2001; SOUMANOU; BORNSCHEUER, 2003). De fato, é reportada a baixa estabilidade em metanol/etanol das lipases, sendo geralmente necessária a adição em etapas do álcool na reação de transesterificação para reduzir esse efeito (HERNÁNDEZ-MARTÍN; OTERO, 2008; SHIMADA et al., 2002).

Outra mistura que mostrou um incremento na concentração de EEAG em comparação com as lipases individuais foi a mistura de LTL e LPF (testes 6, 7, 8; 30 °C). A mistura 50 % de LTL (250 TBU/g óleo) e 50 % de LPF (250 TBU/g óleo) a 30 °C, atingiu 11,50 % de EEAG, enquanto que a concentração de EEAG alcançada com as lipases individuais foi menor (4,32 % com a LTL e 7,42 % com a LPF). As concentrações de EEAG alcançadas com a mistura das lipases LTL e LPF também diminuíram com o aumento da temperatura.

A lipase CALB mostrou um aumento na concentração de EEAG quando a temperatura aumentou de 30 °C a 50 °C, passando de 1,90 % a 5,12 % de EEAG, respectivamente. Igualmente, a LPP teve um pequeno aumento na concentração de EEAG com a temperatura. Por outro lado, as lipases LTL e LPF apresentaram uma diminuição na concentração de EEAG com o aumento na temperatura. As misturas das lipases LTL, LPF e LPP, com a CALB, não mostraram um aumento significativo na concentração de EEAG. Isso possivelmente, pelo efeito contrário que tem a temperatura nas lipases LTL e LPF. Apresentando o maior rendimento em EEAG após 8 h de transesterificação a 30°C, a mistura das lipases LPP e LTL na relação 50 % - 50 % foi, então, usada na reação de transesterificação sob as condições experimentais acima mencionadas durante 28 h, com amostras sendo retiradas periodicamente para análise da concentração mássica de EEAG. Os resultados são apresentados na Figura 4-1.

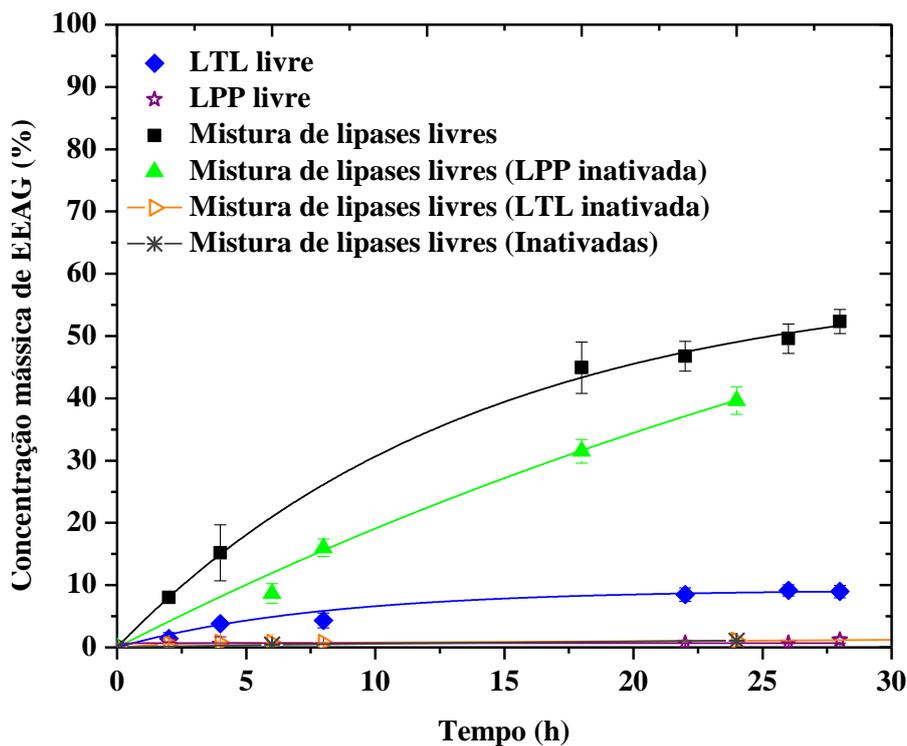


Figura 4-1: Perfil de concentração mássica de EEAG alcançado pelas lipases livres individuais e misturadas na reação de transesterificação de óleo de soja com etanol a 30°C, razão molar óleo/álcool de 1:5, oferecendo uma carga enzimática total de 500 TBU/g de óleo.

A mistura alcançou 52,3 % de EEAG com 28 h, enquanto que a LTL (100 %) e LPP (100 %) alcançaram 9,0 % e 1,2 % de EEAG, respectivamente. Esse aumento notável na concentração de EEAG na reação catalisada pela mistura das lipases pode ser explicado pelas diferentes especificidades em relação ao tipo de ácido graxo que apresentam essas lipases, já que as duas lipases são 1,3 regioespecíficas. FREITAS et al. (2007) reportaram que a LPP possui maior especificidade por ácidos linoleico e linolênico, presentes no óleo de soja, do que a LTL. Dessa forma, provavelmente a ação sinérgica dessas duas lipases tenha contribuído para o aumento na concentração de EEAG na transesterificação.

A ação sinérgica das lipases foi confirmada realizando ensaios de transesterificação com a mistura das lipases LTL e LPP e inativando uma das lipases por vez. No item 3.2.2, a metodologia usada para inativar as lipases, é descrita. Assim, para verificar a inativação das duas lipases também foi realizado um ensaio de

transesterificação usando a mistura das duas lipases inativas. A Tabela 4-3 mostra como esses ensaios foram realizados. Os resultados também são apresentados na Figura 4-1.

Tabela 4-3: Ensaios de transesterificação realizados para confirmar a ação sinérgica das lipases

Ensaio	Lipase	% de cada lipase na mistura ^a	Quantidade de cada lipase	Atividade oferecida (TBU/g de óleo)
A	LTL	100	82 µL	500
B	LPP	100	135 mg	500
C	LTL – LPP	50	41 µL de LTL e 67,5 mg de LPP	500
D	LTL – LPP	50	41 µL de LTL e 67,5 mg de LPP inativada	250
E	LTL – LPP	50	41 µL de LTL inativada e 67,5 mg de LPP	250
F	LTL – LPP	50	41 µL de LTL inativada e 67,5 mg de LPP inativada	0

^a % em relação à atividade oferecida

A inativação das lipases foi confirmada, pois apenas 1,1% de EEAG foi obtido em 24 h de reação. Portanto, a concentração de ésteres alcançada com as misturas onde uma das lipases está inativa pode ser relacionado com a atividade oferecida pela lipase ativa.

A mistura com a LPP inativa (Ensaio D, Tabela 4-3), com apenas 250 TBU/g oferecidos pela LTL, alcançou 39,7% de EEAG em 24 h de reação, uma concentração menor à alcançada com a mistura das lipases ativas. Esses resultados sugerem um efeito de ativação e estabilização da LTL na presença do extrato bruto da LPP, que permite alcançar uma concentração de ésteres maior que quando é usada a LTL individual e com o dobro da carga enzimática (9,0% de EEAG; Ensaio A, Tabela 4-3). Além disso, também pode-se confirmar a ação sinérgica das lipases LPP e LTL, já que a mistura pôde alcançar uma concentração de EEAG maior quando também são oferecidos 250 TBU/g pela LPP (52,3 % de EEAG; Ensaio C, Tabela 4-3), levando em consideração que quando foram oferecidos 500 TBU/g pela LPP, apenas uma concentração de EEAG de 1,05 % foi alcançada. Por tanto, a LTL parece ser mais ativa

que a LPP frente à maioria dos ácidos graxos no óleo de soja. No entanto, a LPP pode apresentar maior atividade frente a alguns deles. A fim de aumentar a estabilidade operacional e permitir o reuso das lipases, justifica-se, então, a imobilização das lipases. Experimentos preliminares de imobilização das lipases individuais e co-imobilizadas pela técnica CLEA foram realizados conforme metodologia descrita no item 3.2.4.1, com o objetivo de confirmar a ação conjunta das lipases no combi-CLEA. Nos experimentos preliminares não foram otimizadas as condições de preparação dos CLEAs e só foi medida a atividade recuperada global (segundo equação 3-4) e atividade específica dos CLEAs de LPP e LTL e do Combi-CLEA. Os resultados de atividade recuperada global e a atividade específica dos CLEAs preparados são apresentados na Tabela 4-4.

Tabela 4-4: Atividade recuperada global e atividade específica dos CLEAs de LPP, LTL e Combi-CLEA na presença de proteína de soja, preparados nos experimentos preliminares

CLEA	Atividade recuperada global (%)	Atividade (TBU/mg de CLEA)
LPP-PS-CLEA	19,04 ± 1,54	10,6 ± 0,7
LTL-PS-CLEA	8,96 ± 0,12	1,5 ± 0,1
Combi-PS-CLEA	20,32 ± 0,79	5,9 ± 0,9

Individualmente, CLEAs de LPP apresentaram maior atividade hidrolítica do que CLEAs de LTL. Entretanto, a mistura dessas lipases (combi-CLEA) permitiu a preparação de um derivado com boa atividade hidrolítica e bom potencial para uso em reações de transesterificação.

Esses três biocatalisadores foram usados na transesterificação do óleo de soja conforme a metodologia descrita no item 3.2.6. Os perfis de concentração mássica de EEAG obtidos com o combi-CLEA e os CLEAs das lipases individuais e misturados são mostrados na Figura 4-2.

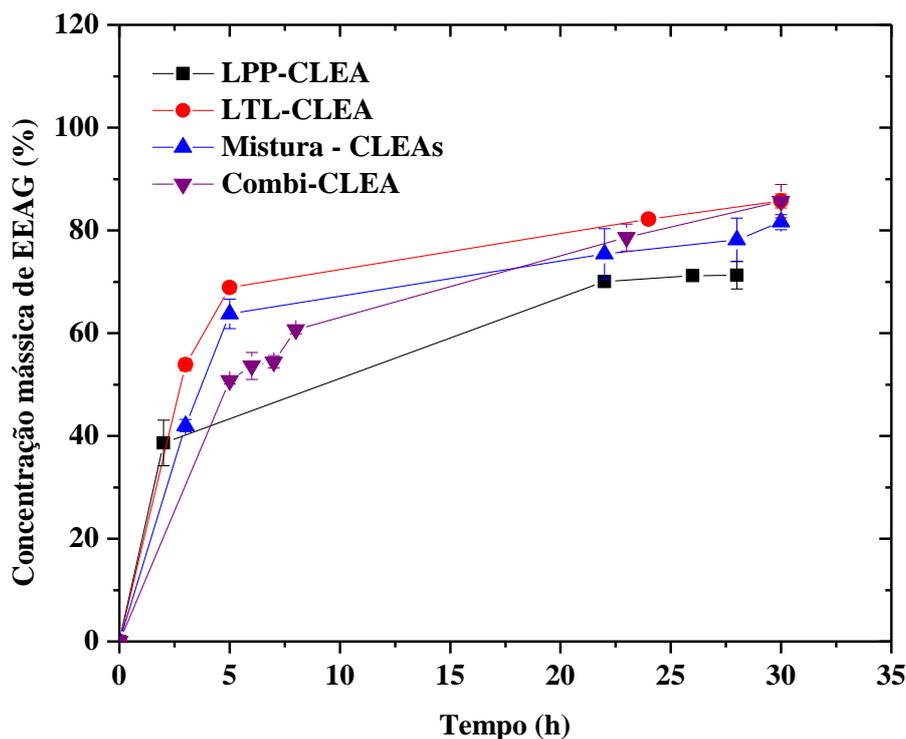


Figura 4-2: Perfil de concentração mássica de EEAG alcançado pelos CLEAs na reação de transesterificação de óleo de soja com etanol a 30°C, razão molar óleo/álcool de 1:5, oferecendo uma carga enzimática de 2500 TBU/g de óleo.

Os CLEAs de LTL e LPP apresentaram melhor desempenho que as enzimas na forma solúvel. Por exemplo, o CLEA da LPP atingiu 71,3% de EEAG, representando um aumento de aproximadamente 60 vezes em relação ao rendimento obtido com a enzima solúvel. A mistura de CLEAs de LPP e LTL, o Combi-CLEA e o CLEA de LTL, produziram similar quantidade de EEAG, em torno de 86%, indicando que as enzimas de fato estão trabalhando em sinergia. Entretanto, como cargas enzimáticas iguais foram utilizadas, o custo do combi-CLEA ou da mistura de CLEAs seria inferior ao do CLEA de LTL, devido ao menor custo da LPP. Comparada a outras lipases comerciais da Sigma-Aldrich seu preço (em dólar por unidade de atividade enzimática) é até 20.000 vezes menor (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012), motivando a continuação desse projeto.

Esses resultados preliminares mostraram que a combinação das lipases LPP e LTL (50%-50%) tem um efeito positivo na produção de biodiesel, bem como a imobilização das lipases pela técnica CLEA, que permitiu alcançar altas concentrações de EEAG na transesterificação, o que não foi possível com as lipases livres. Estudos

posteriores foram conduzidos no sentido de aperfeiçoar o preparo dos CLEAs individuais quanto às condições de precipitação e entrecruzamento para aumentar assim a atividade recuperada e a estabilidade operacional das lipases. Além disso, se espera estabelecer condições comuns para a co-imobilização da mistura das lipases (combi-CLEA).

Os resultados referentes a otimização da preparação de CLEAs de LPP são apresentados a seguir.

4.2. Preparação de CLEAs de LPP

O CLEA de LPP se torna interessante pela possibilidade de preparar um derivado catalítico barato devido ao baixo custo da enzima e à ausência de suporte, o que pode ser uma vantagem no processo de produção de biodiesel (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012). Além disso, na literatura se encontram poucos trabalhos reportando a imobilização da LPP pela técnica CLEA. Apenas um estudo reporta a preparação de um combi-CLEA de LPP, α -amilase e fosfolipase A₂ a partir do extrato bruto da LPP (DALAL; KAPOOR; GUPTA, 2007) e dois sobre CLEAs de lipase pancreática bovina (CUI et al., 2017; CUI; LIU; LI, 2016) foram reportados na literatura. Na Tabela 4-5, é possível observar as condições de preparação destes CLEAs.

Tabela 4-5: CLEAs de lipase pancreática reportadas na literatura

CLEA	Precipitante /aditivo	Atividade recuperada	Condições e observações	Ref.
Combi-CLEA de lipase, α-amilase e fosfolipase A₂	DME	100 %	O reuso do CLEA de lipase foi possível por 3 – 4 ciclos de hidrólise de palmitato de p-nitrofenila a 37°C durante 30 min sem perda de atividade	(DALAL; KAPOOR; GUPTA, 2007)
LPB-CLEA	Sulfato de amônio/ BSA	75 %	Após oito ciclos de reuso (hidrólise de acetato de 4-nitrofenila durante 20 min) o CLEA reteve mais de 75% de atividade.	(CUI; LIU; LI, 2016)
LPB-CLEA	Sulfato de amônio	85 %	O CLEA foi preparado em uma micro-emulsão água/liquido iônico e reteve 50% da atividade inicial depois de 9 ciclos de hidrólise de acetato de 4-nitrofenila durante 20 min a 40°C)	(CUI et al., 2017)

Portanto, uma série de experimentos foram realizados com o objetivo de avaliar parâmetros que poderiam influenciar as etapas de precipitação e entrecruzamento da LPP, tais como tipo de precipitante, tipo e concentração de entrecruzante e presença de uma proteína inerte rica em lisinas (ou proteína espaçadora). Os resultados são apresentados e discutidos nos tópicos seguintes, onde se reporta o efeito dessas variáveis na atividade de hidrólise de tributirina.

4.2.1. Seleção do agente precipitante

A natureza do agente precipitante tem um efeito importante na conformação da estrutura das lipases e conseqüentemente nas propriedades dos CLEAs obtidos. Portanto, é necessário avaliar diferentes precipitantes com o objetivo de produzir agregados enzimáticos na conformação mais favorável e, assim, manter sua atividade enzimática (LÓPEZ-SERRANO et al., 2002).

Três precipitantes comumente usados para a purificação de proteínas por agregação/precipitação foram avaliados na precipitação da LPP, conforme metodologia descrita no item 3.2.3, os resultados são apresentados na Tabela 4-6.

Tabela 4-6: Rendimento de precipitação para a lipase LPP e atividade recuperada do CLEA de LPP após entrecruzamento com glutaraldeído.

Agente precipitante	Rendimento de precipitação (%)	Atividade recuperada (%)
Solução saturada de sulfato de amônio	107,4 ± 4,7	3,0 ± 0,1
Etanol hidratado (96%, v/v)	110,2 ± 0,9	3,5 ± 0,3
Acetona	105,5 ± 5,9	3,0 ± 0,1

Todos os precipitantes permitiram precipitação total da LPP sem perturbação irreversível da sua estrutura terciária, uma vez que a solução de enzima manteve 100% da atividade (rendimentos de precipitação > 100 %; Tabela 4-6) após ser redissolvida em tampão (item 3.2.3). O motivo da alta retenção de atividade pode estar relacionado ao rápido processo de agregação, que previne a desnaturação da proteína (SCHOEVAART et al., 2004). Além disso, no caso das lipases que exibem ativação interfacial, as condições de precipitação podem induzir a aglomeração das moléculas da enzima em uma conformação favorável, que é mantida quando são redissolvidas em tampão (LÓPEZ-SERRANO et al., 2002).

Resultados semelhantes foram publicados por SCHOEVAART et al. (2004), que avaliaram a precipitação de várias enzimas, incluindo lipases de diferentes fontes. A precipitação das soluções enzimáticas com altas concentrações de precipitantes (> 70 % vol.) mostrou 100% de atividade para pelo menos um dos precipitantes avaliados após a re-solvatação.

No entanto, os agregados podem conter a enzima em uma conformação desfavorável, que não é mantida quando são redissolvidas em tampão, mas serão preservadas na etapa de entrecruzamento (SHELDON, 2011a). Por conseguinte, para selecionar o agente precipitante mais adequado, todos os precipitantes foram avaliados na formação de CLEAs usando glutaraldeído como entrecruzante (20 µmol de grupos aldeído/mg de proteínas totais). Para todos os precipitantes avaliados, a atividade recuperada no CLEA de LPP foi menor do que 5,0 % (Tabela 4-6).

Existem poucos estudos que relatam o uso de etanol como precipitante para a formação de CLEAs. KARTAL et al. (2011) avaliou a preparação de CLEAs da lipase de *Candida rugosa* utilizando sulfato de amônio (sol. saturada), etanol, terc-butanol,

acetona e isopropanol como agentes precipitantes. Embora o iso-propanol tenha apresentado melhor rendimento de precipitação (94 %) do que o etanol (71 %), a atividade recuperada após o entrecruzamento com glutaraldeído foi apenas 0,9 % comparada com 8,5 % alcançado com o etanol. Portanto, o etanol foi utilizado como precipitante na formação de CLEAs da lipase de *Candida rugosa* (KARTAL et al., 2011).

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, o etanol foi selecionado como agente precipitante para os estudos posteriores. Esta parece ser uma escolha atrativa do ponto de vista econômico e ambiental, uma vez que o etanol é menos tóxico, renovável e ambientalmente amigável em comparação com outros solventes orgânicos (CAPELLO; FISCHER; HUNGERBÜHLER, 2007).

4.2.2. Avaliação da proteína de soja na atividade recuperada do CLEA de LPP

Os altos rendimentos de precipitação em associação com a baixa atividade recuperada observada nos experimentos anteriores mostram que o glutaraldeído teve um efeito prejudicial sobre a atividade da LPP, como mostrado na Tabela 4-6. Além disso, atividade de hidrólise foi permanentemente detectada no efluente de lavagem dos LPP-CLEAs, indicando que a baixa atividade recuperada também poderia estar associada a um entrecruzamento ineficiente que permitia a lixiviação da lipase do CLEA durante a etapa de lavagem. A lixiviação da LPP devido a um entrecruzamento ineficiente também foi reportada durante os ensaios de reutilização na hidrólise de palmitato de p-nitrofenila do Combi-CLEA formado por LPP, α -amilase e fosfolipase A₂ (DALAL; KAPOOR; GUPTA, 2007).

O entrecruzamento é uma etapa crucial na preparação dos CLEAs, pois uma concentração alta de entrecruzante pode inativar completamente a enzima. Por outro lado, uma concentração muito baixa de entrecruzante pode permitir a lixiviação da enzima (MIGNEAULT et al., 2004; SHELDON, 2011b). É bem documentado que as proteínas espaçadoras (proteínas ricas em lisina) podem facilitar a preparação de CLEAs de enzimas que apresentam baixa concentração de grupos amino superficiais (necessários para um entrecruzamento efetivo), evitando também a inativação de enzimas que são muito vulneráveis a altas concentrações de entrecruzante (CRUZ et al.,

2012; GUAUQUE TORRES; FORESTI; FERREIRA, 2014). Além disso, as proteínas espaçadoras podem reduzir ou evitar problemas difusionais, aumentando a atividade recuperada (MAFRA et al., 2016).

Vários estudos mostraram um entrecruzamento mais eficaz de diferentes enzimas utilizando BSA como proteína espaçadora, o que aumentou a atividade recuperada e a estabilidade operacional de alguns CLEAs (CUI; LIU; LI, 2016; GUAUQUE TORRES; FORESTI; FERREIRA, 2014; MAFRA, 2017; SILVA, 2015). Por exemplo, CLEAs da lipase de *Pseudomonas cepacia* e penicilina G acilase em ausência e presença de BSA foram preparados por SHAH et al, (2006). O CLEA da lipase preparado na presença de BSA manteve 100% de atividade, enquanto que o CLEA preparado sem BSA manteve apenas 0,4% de atividade da preparação de enzima de partida. No caso da penicilina G acilase, o CLEA preparado com BSA manteve 86% da atividade, enquanto o CLEA preparado sem BSA manteve apenas 50% de atividade (SHAH; SHARMA; GUPTA, 2006).

A proteína de soja vem sendo utilizada com sucesso em nosso grupo de pesquisa (MAFRA, 2017; SILVA, 2015) para produzir CLEAs de diferentes enzimas com melhores características, devido à alta concentração de resíduos de lisina (70 mg/g de proteína) e ao seu preço por quilo que é muito menor que o preço da geralmente usada BSA (RHIM et al., 1998).

Por exemplo, SILVA, (2015) reportou o uso de proteínas espaçadoras como BSA e proteína de soja (PS) para aumentar a atividade recuperada do CLEA de β -amilase. O CLEA de β -amilase alcançou uma atividade recuperada de 34 %, quando foi preparado sem proteína espaçadora, enquanto que quando foram usadas as proteínas espaçadoras o CLEA de β -amilase mostrou uma atividade recuperada de 53 % e 83 % com PS e BSA, respectivamente. Com tudo, os CLEAs preparados com a PS foram mais estáveis frente ao pH e a temperatura, além disso, também foram mais facilmente manipulados/separados do que aqueles preparados com BSA (SILVA, 2015). Por outro lado, MAFRA, (2017) reportou o uso da proteína de soja para preparar CLEAs de invertase. O CLEA de invertase preparado em ausência de PS apresentou um rendimento de imobilização menor de 6,0 %, enquanto que o CLEA preparado usando PS alcançou 30,0 % de rendimento de imobilização. Além disso, o CLEA de invertase

pode ser reusado em dez ensaios (bateladas de 4 h) de hidrólise de sacarose a 40°C e pH 6,0, mantendo a conversão da reação acima de 75% (MAFRA, 2017).

Portanto, neste trabalho, a proteína de soja foi avaliada pela primeira vez como alternativa à BSA para a preparação do CLEA da LPP, isso com o objetivo de obter um derivado catalítico de menor custo e favorecer seu uso na síntese de biodiesel. Foram utilizadas diferentes razões mássicas de lipase e proteína de soja para avaliar o efeito na atividade recuperada dos CLEAs de LPP, conforme metodologia descrita no item 3.2.4.2.

A Figura 4-3 mostra que o CLEA da LPP preparado sem proteína de soja (razão mássica 1:0) alcançou uma atividade recuperada de 3,5%, enquanto que com a adição da proteína de soja a atividade recuperada de hidrólise aumentou de 3 a 5 vezes (razões mássicas de 1:1 e 1:5, respectivamente). Entre as razões de 1:3 e 1:7, não se observou aumento significativo nas atividades recuperadas (valor médio de 20%).

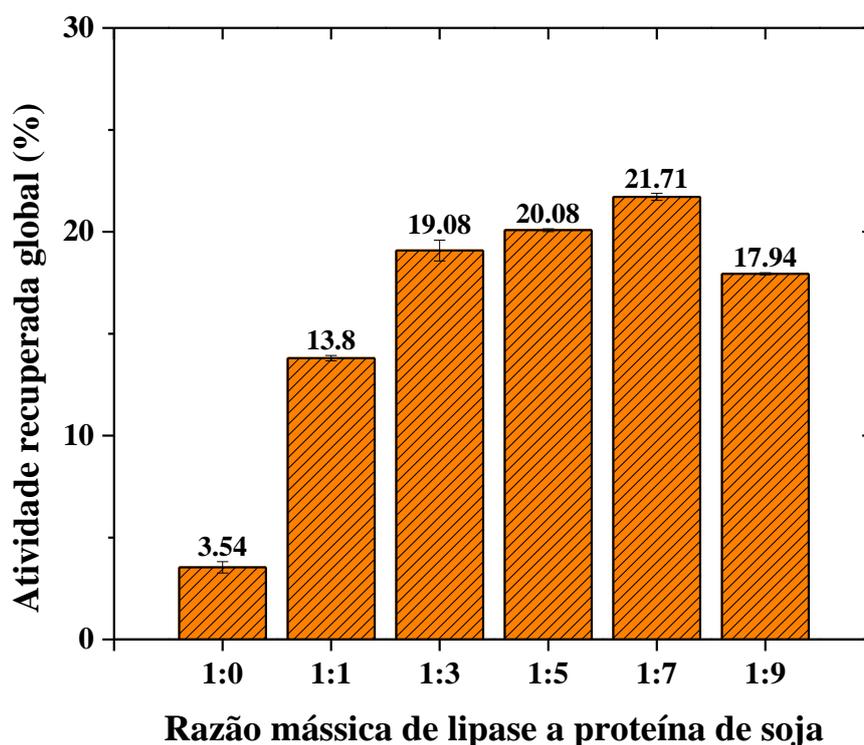


Figura 4-3: Efeito da proteína de soja na atividade recuperada dos CLEAs de LPP

O efeito positivo da proteína de soja pode ser explicado pelo fato de que esta proteína fornece grupos amino livres provenientes dos resíduos de lisinas, que são capazes de aumentar o número de ligações covalentes entre a LPP e a matriz do CLEA (RHIM et al., 1998). Um entrecruzamento mais efetivo alcançado na presença de grupos amino reativos adicionais, diminui a lixiviação da enzima, evita o efeito prejudicial do glutaraldeído na estrutura da LPP que pode causar perda de atividade e também aumenta a estabilidade operacional do CLEA (CUI; LIU; LI, 2016). Contudo, uma razão mássica de LPP/PS maior (1:9) diminuiu a atividade recuperada no LPP-PS-CLEA (Figura 4-3). Neste caso, a lipase pode ter sido aprisionada dentro dos agregados da proteína de soja, impedindo o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (GUAUQUE TORRES; FORESTI; FERREIRA, 2014). Considerando o efeito positivo da proteína de soja no LPP-PS-CLEA, a razão mássica LPP/PS de 1:3 foi selecionada para estudos posteriores, uma vez que uma maior concentração de proteína espaçadora diminui a atividade volumétrica do CLEA, aumentando a carga de material inerte no CLEA (GALVIS et al., 2012; SHELDON, 2007). Além disso a atividade recuperada teve apenas um pequeno incremento quando se aumentou a razão mássica LPP/PS (Figura 4-3).

Tendo em vista que lipases geralmente adotam uma conformação mais ativa na presença de surfactantes (MATEO et al., 2007), a preparação de CLEAs de LPP (com e sem proteína de soja) também foi realizada na presença de Triton X-100 (1,0 % m/v). No entanto, os resultados não mostraram efeito positivo na atividade recuperada dos CLEAs de LPP (dados não apresentados). De fato, concentrações de Triton X-100 entre 0,2 e 1,0 % não mostraram aumento na atividade de hidrólise da LPP.

4.2.3. Efeito do entrecruzante na atividade do LPP-PS-CLEA

Embora o LPP-PS-CLEA tenha apresentado maior atividade recuperada, esse CLEA não se mostrou estável (atividade de hidrólise foi permanentemente detectada no efluente de lavagem), exigindo, dessa forma, um entrecruzamento mais efetivo para evitar a lixiviação. O uso de polialdeídos de maior tamanho como entrecruzante em vez de glutaraldeído tem sido relatado como uma alternativa para obter CLEAs mais ativos e estáveis à lixiviação. ZHEN et al. (2013) relataram que o CLEA de β -mananase preparado com glutaraldeído apresentou uma estrutura compacta com baixa flexibilidade das moléculas da enzima, expressando menor atividade

recuperada (4,68%) em comparação com CLEAs preparados com polialdeído-dextrano (32,01%) e polialdeído-amido (20,98%), que apresentaram uma estrutura porosa.

Neste trabalho, avaliou-se o efeito da concentração de polialdeído-amido e glutaraldeído sobre o rendimento da imobilização e a atividade recuperada dos LPP-PS-CLEA. O rendimento de imobilização do LPP-PS-CLEA aumentou com a concentração de glutaraldeído, como pode ser observado na Figura 4-4. No entanto, a atividade recuperada teve um efeito oposto. Usando concentrações de 5 e 10 μmol de grupos aldeído/mg de proteína total, o rendimento de imobilização e a atividade recuperada foram similares em torno de 57,0 % e 42,5 %, respectivamente. Embora os resultados com 5 e 10 μmol de grupos aldeído/mg de proteína total foram similares, a concentração de 10 μmol de grupos aldeído/mg de proteína total foi escolhida para os experimentos posteriores, pois uma concentração maior de entrecruzante pode conferir maior rigidez e estabilidade à enzima imobilizada.

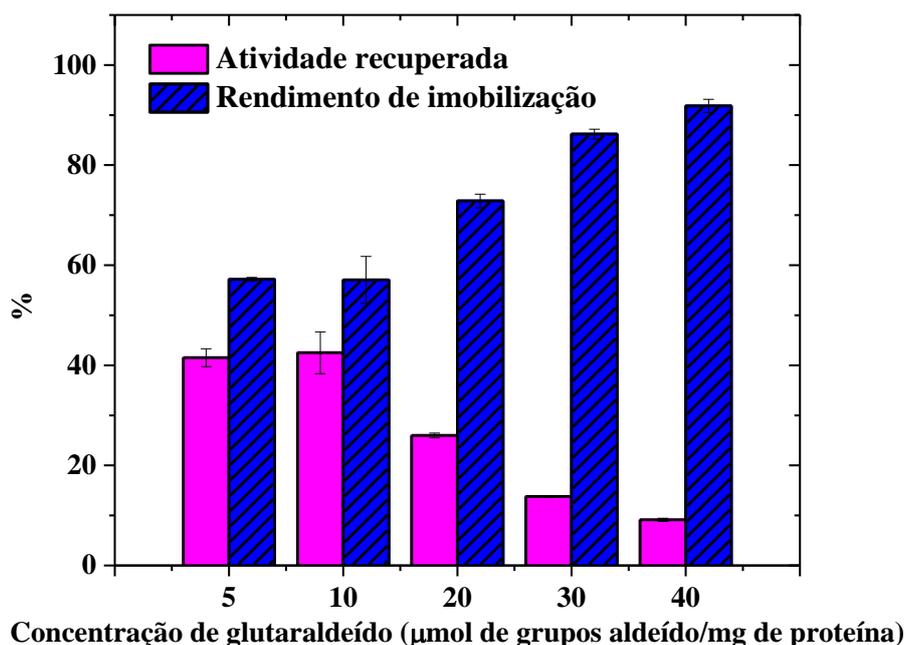


Figura 4-4: Efeito da concentração de glutaraldeído na atividade recuperada e no rendimento de imobilização do LPP-PS-CLEA.

Por outro lado, com o polialdeído-amido foram testadas inicialmente as concentrações de 5 e 10 μmol de grupos aldeído/mg de proteína total, no entanto, estas já rendiam uma baixa atividade recuperada e alto rendimento de imobilização, o que

sugere um entrecruzamento excessivo, portanto foram testadas concentrações de polialdeído-amido menores, 0,5 e 5 μmol de grupos aldeído/mg de proteína total.

Os CLEAs preparados com polialdeído-amido mostraram comportamento semelhante aos preparados com glutaraldeído (Figura 4-5), o rendimento de imobilização do LPP-PS-CLEA aumentou com a concentração de polialdeído-amido. No entanto, aqueles expressaram maior atividade recuperada, usando concentrações mais baixas de grupos aldeído. Tal fato ocorreu, provavelmente, porque mais moléculas enzimáticas podem ter se unido ao longo da estrutura ramificada do polialdeído-amido, do que as moléculas que poderiam se unir ao micro-molecular glutaraldeído (MATEO et al., 2004; ZHEN et al., 2013).

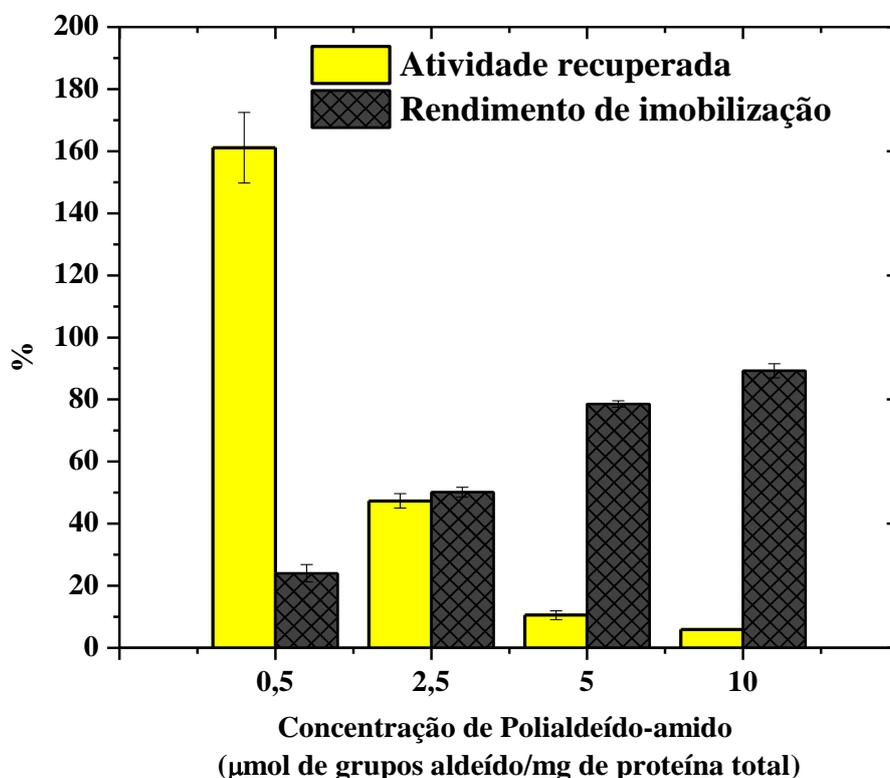


Figura 4-5: Efeito da concentração de polialdeído-amido na atividade recuperada e no rendimento de imobilização do LPP-PS-CLEA

Neste contexto, foi necessária uma baixa concentração de polialdeído-amido para preparar LPP-PS-CLEAs ativos. Com a menor concentração de polialdeído-amido avaliada, 0,5 μmol de grupos aldeído/mg de proteína total, foi observada uma atividade recuperada entorno de 160 %. (Figura 4-5/Figura 4). No entanto, obteve-se apenas

24,0% de rendimento de imobilização. Esse baixo rendimento de imobilização sugere um entrecruzamento ineficiente e por tanto a alta atividade recuperada pode ser consequência da lixiviação da enzima quando o CLEA foi resuspendido para a medida de atividade.

O LPP-PS-CLEA preparado usando 2,5 μmol de grupos aldeído/mg de proteína total apresentou um rendimento de imobilização de $50,1 \pm 1,5 \%$ e uma atividade recuperada de $47,4 \pm 2,4 \%$, resultados similares aos obtidos com glutaraldeído.

Os LPP-PS-CLEA preparados com baixa concentração de agente entrecruzante (glutaraldeído ou polialdeído-amido) não foram efetivamente entrecruzados, permitindo a lixiviação da atividade durante as lavagens (em média, 46% de perda em relação à atividade inicial). Estes resultados mostraram que a baixa concentração de entrecruzante não foi suficiente para estabilizar a estrutura do CLEA (CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000; SHELDON, 2007). Com concentrações mais elevadas, a massa de agregados insolúveis aumentou, mas nenhuma atividade significativa foi expressa no LPP-PS-CLEA, provavelmente porque o entrecruzamento excessivo resultou na perda da flexibilidade da enzima necessária para a sua atividade, ou no bloqueio do sítio ativo da enzima (GUAUQUE TORRES; FORESTI; FERREIRA, 2014; ZHEN et al., 2013). Este comportamento também foi reportado para a lipase no combi-CLEA de LPP, α -amilase e fosfolipase A₂, onde concentrações de glutaraldeído maiores de 20 mM produziram um combi-CLEA com baixa atividade recuperada de LPP (< 10%) (DALAL; KAPOOR; GUPTA, 2007).

Com o intuito de aumentar a atividade recuperada e diminuir a lixiviação da enzima, também foram realizados ensaios com maior tempo de entrecruzamento; a pH 10, onde a reatividade dos nucleófilos da proteína (grupos amino terminais e Lys) pode ser melhorada (MATEO et al., 2007); e com redução das ligações covalentes usando borohidreto de sódio. No entanto, os resultados não mostraram efeito positivo na atividade recuperada e na lixiviação dos LPP-PS-CLEAs (dados não apresentados). Portanto, devido aos resultados semelhantes para o LPP-PS-CLEA com 10 μmol de grupos aldeído/mg de proteína total (usando glutaraldeído) e 2,5 μmol de grupos aldeído/mg de proteína total (usando polialdeído-amido), ambos os CLEAs foram avaliados na transesterificação do óleo de soja.

4.2.4. Transesterificação de óleo de soja

Para utilização dos LPP-PS-CLEAs em meio orgânico, foi necessário retirar a maior quantidade de água da estrutura dos CLEAs, a fim de evitar a reação de hidrólise, não desejada. Assim, nestes experimentos os CLEAs foram lavados com terc-butanol a temperatura ambiente duas vezes, centrifugados, decantados e secos na geladeira durante 10 min. Inicialmente foram estabelecidos 10 min de secagem com o intuito de garantir uma hidratação mínima para não tornar a lipase inativa. Após o tratamento com ATB, o LPP-PS-CLEA preparado com polialdeído-amido exibiu uma atividade 20 vezes menor que o LPP-PS-CLEA preparado com glutaraldeído ($17,85 \pm 2,71$ TBU/mg de CLEA). A redução na atividade pode ter sido causada pela formação de agregados maiores (clusters) após o tratamento com ATB, o que é favorecido pela estrutura muito grande e ramificada do polialdeído-amido que pode bloquear o sítio ativo das enzimas, impedindo o processo catalítico.

Dessa forma, uma quantidade maior do biocatalisador sólido LPP-PS-CLEA preparado com polialdeído-amido tem que ser adicionada ao reator, diminuindo sua utilidade volumétrica. Por conseguinte, o LPP-PS-CLEA preparado com glutaraldeído foi utilizado para os estudos posteriores.

O perfil de concentração mássica de EEAG obtido na transesterificação do óleo de soja com o LPP-PS-CLEA preparado com glutaraldeído é apresentado na Figura 4-6. Também, com o objetivo de observar o efeito da imobilização no desempenho da LPP na transesterificação do óleo de soja, é apresentado de novo, na Figura 4-6, o perfil alcançado pela LPP livre oferecendo uma carga enzimática de 500 TBU/g e o perfil alcançado com uma carga maior de LPP livre, 4400 TBU/g.

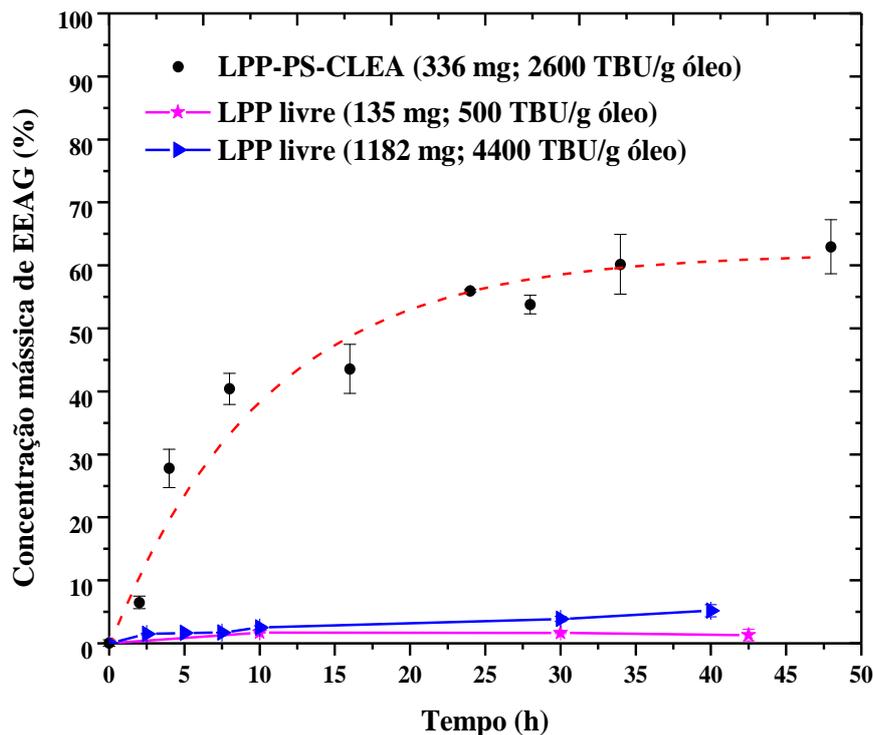


Figura 4-6: Perfil de concentração mássica de EEAG obtido com a LPP solúvel e o LPP-PS-CLEA. Condições de reação: razão molar óleo/etanol de 1:5, oferecendo uma carga enzimática de 2600 TBU/g óleo, 30°C, 300 rpm em shaker.

A reação foi conduzida conforme a metodologia descrita no item 3.2.6. Enquanto a concentração de EEAG atingiu menos de 2,0 % usando LPP livre (oferecendo uma carga enzimática de 500 TBU/g de óleo de soja, 135 mg do extrato bruto de LPP) ou menos de 5,0 % usando 9 vezes mais LPP livre (4400 TBU/g de óleo e 1182 mg, a massa inicialmente utilizada na preparação do LPP-PS-CLEA), aproximadamente 60% de EEAG foi alcançado usando o LPP-PS-CLEA após 24 h de reação. Esse resultado é expressivo porque a LPP é uma lipase 1,3-específica e espera-se que a conversão teórica máxima seja em torno de 66% (CABALLERO et al., 2009; MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012). A concentração de EEAG de 66% não pôde ser alcançada provavelmente devido ao teor de água nas misturas reacionais (aprox. 3,5 %, medido conforme item 3.2.8), o que pode provocar limitação difusiva do substrato ou a hidrólise em vez da transesterificação (CHATTOPADHYAY et al., 2011).

No entanto, as condições de transesterificação ainda precisam ser otimizadas. Trabalhos onde a LPP foi imobilizada em suportes sólidos e as condições de transesterificação foram otimizadas são reportados na literatura. Por exemplo, a síntese de biodiesel a partir da transesterificação do óleo de babaçu com diferentes álcoois foi avaliada utilizando a LPP imobilizada na matriz híbrida de polissiloxano-polivinil álcool; a reação foi conduzida com uma relação molar óleo/álcool 1:10, temperaturas variando de 40 a 50°C, dependendo do sistema de reação e 20 % em massa de lipase com base na massa dos substratos durante 48 h de reação. Os resultados mostraram que a LPP imobilizada poderia converter de forma eficiente os triglicerídeos em ésteres alquílicos de ácidos graxos, obtendo rendimentos de 75 %, 80 % e 95 % com etanol, propanol e butanol, respectivamente (PAULA et al., 2007).

Assim, esses resultados confirmam a baixa estabilidade da LPP livre na transesterificação do óleo de soja com etanol e também mostram como essa baixa estabilidade em etanol foi melhorada pela imobilização da LPP pela técnica CLEA. A imobilização da LPP pela técnica CLEA melhorou o desempenho da enzima, provavelmente como resultado de mudanças conformacionais na estrutura nativa da lipase promovidas pelas ligações intra e/ou intermoleculares, o que conferiu rigidez à estrutura supramolecular do LPP-PS-CLEA. Além disso, permitiu preparar um derivado catalítico de baixo custo, devido à ausência de suporte sólido, com alta atividade volumétrica a partir do extrato bruto da LPP (CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000; CUI; LIU; LI, 2016; SHAH; SHARMA; GUPTA, 2006).

4.2.5. Reuso do LPP-PS-CLEA na transesterificação do óleo de soja

O reuso da enzima imobilizada é uma característica importante para a sua potencial aplicação industrial. Esses estudos foram realizados por quatro ciclos de transesterificação de óleo de soja durante 24 h cada um. Os experimentos foram conduzidos em sistemas com agitação suave, evitando o cisalhamento dos CLEAs. Foram usados frascos fechados agitados a 300 rpm em shaker com agitação horizontal, reator de fluxo em vórtice com razão de raios (η) de 0,24, razão de aspecto (Γ) de 6,32 e rotação do cilindro interno de 900 rpm suficiente para que ocorresse a suspensão total das partículas dos CLEAs, e reator tipo cesto com agitação magnética a 1000 rpm. As dimensões dos dois últimos reatores são apresentadas na Figura 3-1 (item 3.2.7.1)

A Figura 4-7 mostra que a concentração de EEAG foi em torno 60 % em dois ciclos reacionais, diminuindo abruptamente para 33,5 % no terceiro ciclo quando o experimento foi realizado em frascos fechados.

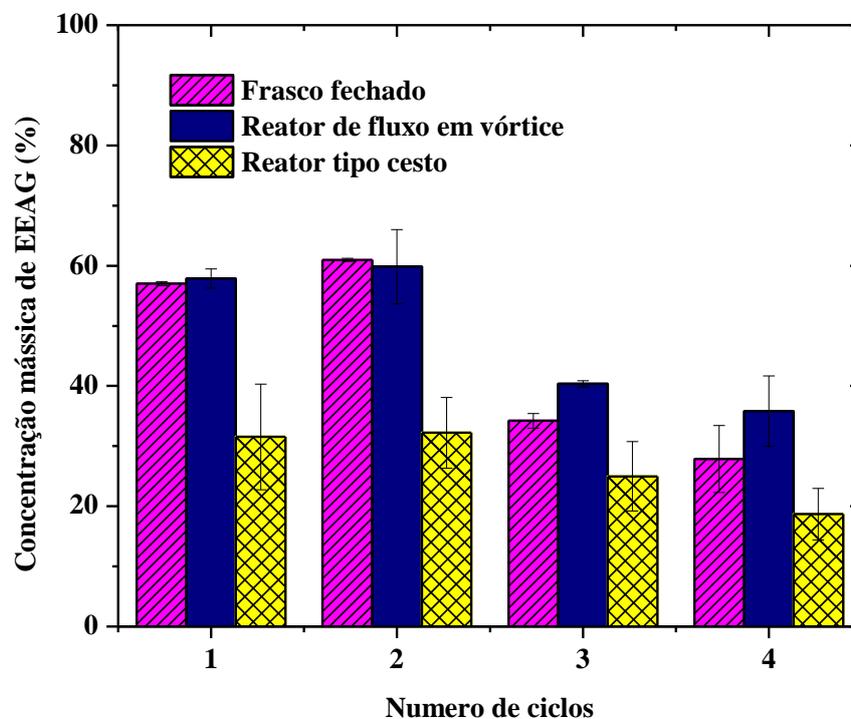


Figura 4-7: Número de ciclos do LPP-PS-CLEA na transesterificação de óleo de soja com etanol em três diferentes sistemas de reação. Condições de reação: razão molar óleo/etanol de 1:5, oferecendo uma carga enzimática de 3500 TBU/g óleo, 30°C, 300 rpm em diferentes

A concentração de EEAG teve um comportamento semelhante no reator de fluxo de vórtice. Essa queda abrupta pode estar relacionada à perda de biocatalisador entre as bateladas, bem como à baixa estabilidade mecânica de CLEAs em sistemas com alta taxa de agitação (SCHOEVAART et al., 2004). Por outro lado, a concentração de EEAG alcançada no reator tipo cesto foi em torno de 32% no primeiro ciclo e não apresentou diferença significativa entre os ciclos de reação (os dados foram tratados com ANOVA e o teste Tukey com 95 % de confiança ($p \leq 0,05$)). Esses resultados confirmaram a baixa estabilidade mecânica do LPP-PS-CLEA, prejudicando seu uso em reatores agitados, um gargalo que ainda precisa ser superado. Os reatores de cesta podem ser considerados como uma alternativa promissora para o uso de CLEAs em aplicações de biotecnologia. No entanto, embora a concentração mássica de EEAG tenha sido mais baixa, quando compara aos outros tipos de reator, o LPP-PS-CLEA se

mostrou mais estável após 4 ciclos nessa configuração de reação (CABANA; JONES; AGATHOS, 2009; GARCIA-GALAN et al., 2011).

A inativação da LPP no combi-CLEA de LPP, α -amilase e fosfolipase A₂ durante sua reutilização (ciclos de 30 min na hidrólise de pNPP a 37 °C) também foi reportada por DALAL et al, (2007). Os autores relataram que o curto período de entrecruzamento e a baixa concentração de glutaraldeído (20 mM) usado para preparar o combi-CLEA poderiam ter causado a inativação devido ao entrecruzamento ineficiente (DALAL; KAPOOR; GUPTA, 2007).

Nesse contexto, com o objetivo de produzir um LPP-PS-CLEA mais estável operacionalmente, o tempo de entrecruzamento também foi avaliado. Os LPP-PS-CLEAs preparados num tempo de entrecruzamento superior, apresentaram uma atividade recuperada menor, embora o rendimento de imobilização aumente com o tempo como se mostra na Tabela 4-7. O aumento no rendimento de imobilização mostra maior entrecruzamento entre a lipase e o glutaraldeído, diminuindo assim a lixiviação da enzima; no entanto, esse maior entrecruzamento pode favorecer a reação do glutaraldeído com resíduos de aminoácidos que podem ser cruciais para atividade catalítica da lipase (CUI; LIU; LI, 2016; YANG et al., 2012).

Tabela 4-7: Resultados de imobilização com diferentes tempos de entrecruzamento

CLEA de LPP	Tempo de entrecruzamento	Atividade recuperada (%)	Rendimento de imobilização (%)
LPP-PS-CLEA - (3 h)	2,5 h	42,5 ± 0,4	57,0 ± 5,0
LPP-PS-CLEA - (6 h)	5,5 h	11,1 ± 1,4	61,4 ± 7,2
LPP-PS-CLEA - (16 h)	15,5 h	13,2 ± 0,9	71,0 ± 3,0

A estabilidade operacional do LPP-PS-CLEA-(6 h) preparado com 5,5 h de entrecruzamento, 6 h de imobilização (0,5 h de precipitação + 5,5 h de entrecruzamento), foi testada no reator de fluxo em vórtice (item 3.2.7.2) durante 4 ciclos de 24 h de reação. O LPP-PS-CLEA-(6h) apresentou um comportamento semelhante ao mostrado pelo LPP-PS-CLEA-(3h) (dados não apresentados). Portanto, um tempo de 3h de imobilização (0,5 h de precipitação + 2,5 h de entrecruzamento) foi estabelecido para a preparação dos LPP-PS-CLEAs.

Apesar da baixa estabilidade mecânica, a LPP é uma enzima de baixo custo (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012) e a preparação de CLEAs é uma técnica barata para imobilizar enzimas em comparação com a imobilização de enzimas em suportes sólidos caros (SHELDON, 2011b). Assim, mesmo apresentando baixo potencial de reuso, o LPP-PS-CLEA pode ser um biocatalisador interessante e promissor para ser usado na transesterificação enzimática de óleo vegetal, o que não se mostrou possível com a enzima solúvel. Somente o fato de poder usar uma enzima em uma reação que até então ela não funcionava pode ser considerado um grande avanço no estado da arte.

De acordo com os resultados da concentração de EEAG (~ 60%), o produto final é composto principalmente por EEAG e acilglicerídeos (principalmente monoacilglicerídeo, Tabela 4-8), que podem ser convertidos em EEAG pela combinação de lipases (combi-CLEAs de lipases com diferentes especificidades) ou podem ser comercializadas como emulsificantes após separação e purificação (BYUN et al., 2007).

Tabela 4-8: Composição do produto final da transesterificação de óleo de soja com o LPP-PS-CLEA em frasco fechado após 24h de reação.

Produto da transesterificação de óleo de soja com etanol	Concentração mássica de cada produto (%)
EEAG (%)	59,08 ± 1,02
MAG (%)	27,58 ± 0,69
DAG (%)	9,90 ± 0,11
TAG (%)	0,52 ± 0,01

Por outro lado, trabalhos recentes reportaram que a mistura de ésteres etílicos e monoglicerídeos de ácidos graxos (EEAG/MAG) em uma relação molar 2/1, poderia ser usada diretamente como biocombustível. CABALLERO et al. (2009) mostraram que a mistura de ésteres etílicos e monoglicerídeos apresentou propriedades físico-químicas semelhantes às do biodiesel convencional e/ou petrodiesel, evitando a produção de glicerina como subproduto (CABALLERO et al., 2009; CALERO et al., 2015; LUNA et al., 2013).

4.3. Preparação de CLEAs de LTL

Neste trabalho, com o objetivo de preparar um combi-CLEA das lipases LPP e LTL, as condições de preparação devem ser condições adequadas para as duas lipases, portanto as condições estabelecidas para preparar o LPP-PS-CLEA foram testadas para preparar os CLEAs de LTL e combi-CLEAs.

CLEAs de LTL foram preparados conforme a metodologia descrita no item 3.2.4.3, com e sem proteína de soja ou BSA na razão mássica lipase/proteína espaçadora de 1:3 e uma concentração de 10 μmol de grupos aldeído/mg proteína total, usando glutaraldeído (LTL-CLEA, LTL-PS-CLEA e LTL-BSA-CLEA na Tabela 4-9). A formação do CLEA da LTL não foi possível sem a presença de uma proteína espaçadora, provavelmente devido aos poucos resíduos de lisinas (6) disponíveis para se ligar ao entrecruzante (DEREWENDA et al., 1994). O efeito positivo da proteína espaçadora pode ser explicado pelo fato de que a proteína espaçadora fornece resíduos de lisina para se ligar ao glutaraldeído, o que pode evitar entrecruzamento excessivo e consequente perda de atividade catalítica da lipase (GUAUQUE TORRES; FORESTI; FERREIRA, 2013, 2014). Embora o rendimento de imobilização tenha sido alto com as duas proteínas espaçadoras, a atividade recuperada foi baixa, apenas 2% e 12% com a PS e BSA, respectivamente, provavelmente devido ao aprisionamento da lipase dentro dos agregados da proteína espaçadora, impedindo o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, ou até mesmo desnaturação da enzima devido ao entrecruzamento excessivo com glutaraldeído (KHANAHMADI et al., 2015).

Tabela 4-9: Experimentos de síntese de CLEAs de LTL e Combi-CLEA

CLEA	Razão mássica lipase a proteína espaçadora	Rendimento de imobilização (%)	Atividade recuperada (%)
LTL-CLEA	1:0	0	0
LTL-PS-CLEA	1:3	75,0 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1
LTL-BSA-CLEA	1:3	78,0 \pm 1,0	15,8 \pm 0,4
LTL/LPP(1)PS-CLEA	1:1	63,0 \pm 1,0	1,9 \pm 0,1
LTL/LPP(3)PS-CLEA	1:3	65,0 \pm 5,0	10,37 \pm 0,03
LTL/LPP(7)PS-CLEA	1:7	64,0 \pm 0,1	11,2 \pm 0,6
LTL/LPP(1)BSA-CLEA	1:1	68,0 \pm 2,0	1,34 \pm 0,08
LTL/LPP(3)BSA-CLEA	1:3	69,0 \pm 1,0	16,3 \pm 4,4
LTL/LPP(7)BSA-CLEA	1:7	88,0 \pm 1,0	15,5 \pm 0,4

Assim, combi-CLEAs das lipases LTL e LPP (50%-50%) foram preparados avaliando diferentes razões de PS e BSA (1:1; 1:3; 1:7). Na Tabela 4-9 se apresentam os resultados obtidos para ambas as proteínas espaçadoras com resultados similares aos obtidos para os CLEAs de LTL. Deste modo, com o objetivo de aumentar a atividade recuperada nos combi-CLEAs foram testadas diferentes estratégias, tais como a preparação de CLEAs em pH 10 e redução das ligações covalentes usando borohidreto de sódio, além do uso de surfactantes como Triton X-100 e SDS; no entanto, não foi observado efeito positivo na atividade recuperada do combi-CLEA.

Segundo os resultados obtidos, as condições de preparação do LPP-PS-CLEA mostraram não ser adequadas para a LTL, conseqüentemente o combi-CLEA das duas lipases obtido sob essas condições apresentou baixa atividade recuperada. Portanto, o CLEA individual da LTL foi estudado para ser usado na síntese de biodiesel usando a mistura dos CLEAs individuais das lipases LPP e LTL.

A avaliação das condições de imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* pela técnica CLEA tem sido amplamente reportada. LÓPEZ-SERRANO et al. (2002) reportaram a precipitação da LTL com sulfato de amônio na presença de SDS, seguida do entrecruzamento com glutaraldeído, a 4°C durante 16 h. Essa metodologia proporcionou CLEAs com três vezes mais atividade na hidrólise de p-nitrofenil propionato que a enzima de partida (LÓPEZ-SERRANO et al., 2002; SCHOEVAART et al., 2004). Resultados similares de hiperativação da LTL também foram reportados por GUPTA et al. (2009) sob as mesmas condições de imobilização e medida de atividade, mencionadas anteriormente, cujo derivado mostrou mais de 90% de atividade residual após 10 ciclos de uso repetido na hidrólise de azeite de oliva.

GUAUQUE TORRES et al. (2013) também reportaram a síntese de CLEAs de LTL usando sulfato de amônio como precipitante e glutaraldeído como agente entrecruzante. Além disso, propuseram uma nova metodologia para preparar CLEAs da LTL em camadas com BSA. CLEAs preparados de forma convencional apresentaram uma atividade recuperada (hidrólise de trioleína) menor de 10 %, que foi melhorada até 25 % com a adição de SDS e PEG. O CLEA preparado com uma camada da LTL sobre a BSA, apresentou uma atividade recuperada de entorno 75 %, porém, a adição de SDS, PEG e aminas apresentou um efeito negativo na atividade recuperada (GUAUQUE TORRES; FORESTI; FERREIRA, 2013).

Por outro lado, YANG et al. (2012) reportaram o CLEA de LTL para a síntese do monoéster sacarose-6-acetato. O CLEA preparado nas melhores condições de imobilização (33,3% (v/v) de PEG600, D-sorbierita como aditivo e concentração de glutaraldeído 1,5% (v/v) a 0°C por 4 h), foi aplicado na produção de monoésteres e rendeu a maior atividade na síntese de sacarose-6-acetato. O CLEA usado em até oito ciclos alcançou 49,31 % de rendimento na síntese de sacarose-6-acetato, enquanto que a preparação comercial, Lipozyme TL IM, apenas alcançou 18,32 % no quinto ciclo (YANG et al., 2012).

CLEAs de LTL também têm sido preparados para a síntese de biodiesel. ZHANG et al. (2015) reportaram o uso de nano partículas magnéticas para incrementar a rigidez do CLEA e permitir assim sua aplicação industrial. O CLEA magnético de LTL preparado usando o surfactante Tween 80, sulfato de amônio como agente precipitante e glutaraldeído para o entrecruzamento, mostrou um rendimento máximo na metanólise do óleo de *Jatropha* em éter isopropílico de 88% após 48 h a 40°C, o que representou uma atividade 3,5 vezes maior do que a exibida pela LTL livre. Além disso, o CLEA magnético de LTL manteve sua atividade durante 10 ciclos de reações de síntese de biodiesel de 48 h a 40°C (ZHANG et al., 2015).

Portanto, neste trabalho foi testada a metodologia descrita por LÓPEZ-SERRANO et al. (2002) para preparar CLEAs de LTL (item 3.2.4.3), empregando como agentes precipitantes sulfato de amônio e etanol hidratado, além de proteína de soja como aditivo em uma razão mássica de LTL/PS de 1:3 (condições usadas para preparar os CLEAs de PPL). Os resultados são apresentados na Tabela 4-10.

Tabela 4-10: CLEAs de LTL preparados conforme metodologia descrita por (LÓPEZ-SERRANO et al., 2002)

CLEA	Agente precipitante	R. I (%)	A. R. (%)	A. R. (%) segundo (SCHOEVAART et al., 2004)
LTL-CLEA	Sol. Sat. (NH ₄) ₂ SO ₄	38,7 ± 9,5	39,3 ± 12,4	147,01 ± 24,24
LTL-SDS-CLEA	Sol. Sat. (NH ₄) ₂ SO ₄	70,0 ± 6,6	48,1 ± 5,0	121,8 ± 22,8
LTL-SDS-CLEA	Etanol (96%)	99,0 ± 0,1	119,0 ± 16,0	95,6 ± 2,8
LTL-SDS-PS-CLEA	Etanol (96%)	99,7 ± 0,2	65,16 ± 5,4	89,7 ± 1,6

LÓPEZ-SERRANO et al. (2002) reportaram CLEAs de LTL com 17% de atividade recuperada na hidrólise de propionato de p-nitrofenila usando sulfato de amônio como agente precipitante e sem adição de surfactantes. Com a adição do surfactante SDS a atividade recuperada foi de 327%. A diferença nos resultados reportados por LÓPEZ-SERRANO et al. (2002) e os obtidos neste estudo, nas mesmas condições (os dois primeiros CLEAs reportados na Tabela 4-10), podem ser explicados pela diferença nos substratos usados para a medida da atividade, além da metodologia usada para determinar a atividade do CLEA resuspendido.

SCHOEVAART et al. (2004) reportaram uma abordagem para determinar a atividade do CLEA sem ter que lavar e resuspende, processo que aumenta a formação de agregados maiores (clusters) e, portanto, as limitações de transferência de massa que ocasionam queda na atividade recuperada aparente. A abordagem consiste em diluir a suspensão resultante da etapa de entrecruzamento com tampão ou solvente orgânico. Uma amostra é retirada da suspensão resultante, que contém CLEA, bem como enzima livre residual para medir sua atividade (passo A). Em seguida, o CLEA é centrifugado e, novamente, uma amostra é retirada do sobrenadante, que agora contém apenas enzima livre (passo B). A diferença de atividade entre os passos A e B é a atividade do CLEA resuspendido. A atividade do CLEA resuspendido determinada segundo essa metodologia (Tabela 4-10) é maior que a atividade determinada após as lavagens e a centrifugação, o que confirma as limitações de transferência de massa dos CLEAs após as lavagens devido à formação de clusters.

Os resultados da Tabela 4-10 mostram o efeito positivo do uso do surfactante na preparação dos CLEAs de LTL, já que o surfactante pode desfazer os agregados bimoleculares (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010) e induzir a lipase a adotar uma conformação mais ativa que permanece após a etapa de entrecruzamento (CUI; JIA, 2013; ZHANG et al., 2015). Por outro lado, a atividade recuperada e o rendimento de imobilização foram maiores quando os CLEAs foram preparados com o etanol (agente precipitante), onde as lavagens foram feitas também com etanol. Isso provavelmente devido a que enzima sem entrecruzar não foi novamente diluída nas soluções de lavagem, o que ocorre quando as lavagens são feitas com o tampão. O CLEA preparado com proteína de soja (LTL-SDS-PS-CLEA) mostrou uma atividade recuperada menor após as lavagens e a centrifugação, o que pode ser explicado pelo

aprisionamento da lipase dentro dos agregados da proteína de soja, aumentando as limitações de transferência de massa no CLEA.

Por outro lado, o uso do surfactante SDS na mesma concentração usada para a preparação do LTL-SDS-CLEA foi testado para a preparação do CLEA de LPP. No entanto, as mesmas condições usadas para imobilizar a LTL não melhoraram os resultados de atividade recuperada e rendimento de imobilização da LPP (dados não apresentados).

Assim, o LTL-SDS-CLEA preparado com etanol (linha 3 da Tabela 4-10) foi escolhido para a síntese de biodiesel com a mistura das lipases LPP e LTL, resultados apresentados a seguir.

4.4. Mistura dos CLEAs de LPP e LTL na síntese de biodiesel

Os CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA preparados neste trabalho foram misturados e usados na transesterificação do óleo de soja. Para a síntese de biodiesel com a mistura de lipases, o LPP-PS-CLEA foi preparado fazendo as lavagens com etanol, procedimento que se mostrou eficiente e viável. Os resultados de atividade recuperada para o LPP-PS-CLEA segundo essa metodologia são apresentados na Tabela 4-11.

Tabela 4-11: CLEAs de LPP lavados com etanol ou tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7.

CLEA	Lavados com	R. I. (%)	A. R. (%)	A. R. (%) segundo (SCHOEVAART et al., 2004)
LPP-PS-CLEA	Etanol (96%)	100,0 ± 0,2	88,8 ± 5,6	81,94 ± 11,8
LPP-PS-CLEA	Tampão fosfato de sódio 5 mM	57,0 ± 5,0	42,5 ± 0,4	143,8 ± 15,2

Além disso, para diminuir a quantidade de água nos CLEAs, as lavagens com terc-butanol foram feitas conforme a metodologia descrita no item 3.2.5. Assim, o teor de água no LPP-PS-CLEA foi reduzido de 25% (teor alcançado quando se deixou secar por apenas 10 min, item 4.2.4) para 15% (teor alcançado quando se deixou secar até massa constante, item 3.2.5). O LTL-SDS-CLEA também apresentou uma umidade final de 15%.

A atividade do LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA após o tratamento com terc-butanol foi $33,40 \pm 2,5$ TBU/mg de CLEA e $78,4 \pm 2,6$ TBU/mg de CLEA, respectivamente. A transesterificação do óleo de soja com os CLEAs individuais e misturados foi realizada conforme a metodologia descrita no item 3.2.6. As reações foram conduzidas com os CLEAs individuais oferecendo uma carga enzimática de 3000 TBU/g de óleo (7,5 % em massa do meio reacional com o LPP-PS-CLEA; 3 % em massa do meio reacional com o LTL-SDS-CLEA) e com os CLEAs misturados oferecendo uma carga enzimática de 6000 TBU/g de óleo (11 % em massa do meio reacional).

Na Figura 4-8 apresentam-se os perfis de concentração mássica de EEAG obtidos pelos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA individuais e misturados na reação de transesterificação de óleo de soja. O LTL-SDS-CLEA alcançou uma concentração de 72,3% de EEAG em 16 h; após esse período o aumento na concentração de EEAG com o tempo foi pequeno, atingindo 77,3% com 48 h. Além de isso, o LPP-PS-CLEA alcançou 74,7% de EEAG com 48 h, porém o perfil de concentração de EEAG não se estabilizou após 48 h. Esses resultados são satisfatórios, já que a imobilização das lipases permitiu alcançar concentrações de EEAG maiores às teóricas para as lipases 1,3 específicas (66%).

Se a migração acil ocorre durante a reação, rendimentos maiores dos teóricos são possíveis (DU et al., 2005; LI et al., 2010). Considerando a ausência de suporte e que a própria enzima não contribui para a migração acil, esta pode ser influenciada pelo teor de água (DU et al., 2005; ODA et al., 2005; WANG; WU; ZONG, 2008). A água é essencial para que a lipase mantenha sua conformação catalítica; no entanto, mais água no sistema de reação pode levar a reação de hidrólise concorrente (TONGBORIBOON; CHEIRSILP; H-KITTIKUN, 2010). Assim, é provável que a redução no teor de água nos CLEAs, devido às lavagens com terc-butanol, tenha contribuído para as concentrações de EEAG alcançadas pelos CLEAs de LPP e LTL.

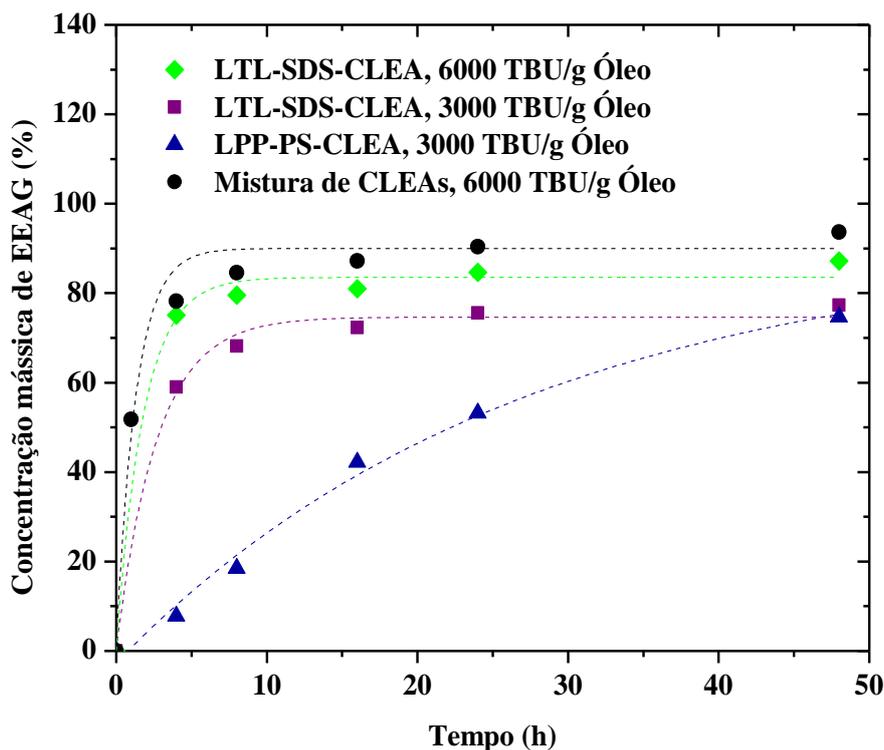


Figura 4-8: Perfil de concentração mássica de EEAG obtido pelos LTL-SDS-CLEA e LPP-PS-CLEA individuais e misturados na transesterificação de óleo de soja. Condições de reação: razão molar óleo/etanol de 1:5, oferecendo uma carga enzimática de 3000 TBU/g óleo com os CLEAs individuais ou 6000 TBU/g de óleo com a mistura dos CLEAs, 30°C, 300 rpm em shaker.

A mistura dos CLEAs (oferecendo uma carga de 6000 TBU/g de óleo) teve um aumento na concentração final de EEAG de aproximadamente 20% com relação aos CLEAs individuais; com 48 h a mistura de CLEAs alcançou 94% de EEAG. Além disso, em quase 10 h a concentração de EEAG começou-se a estabilizar, mostrando que a reação é relativamente rápida.

O Perfil apresentado pela mistura de CLEAs é semelhante ao perfil alcançado com o LTL-SDS-CLEA individual quando foram oferecidos 6000 TBU/g de óleo, o qual confirma a ação sinérgica das lipases aumentado à velocidade de transesterificação de óleo de soja quando na mistura se usa a metade da lipase oferecida. Devido a que a LPP e a LTL são lipases com regioespecificidades semelhantes (1,3 regioespecíficas) os resultados sugerem que a LTL é mais ativa que a LPP frente à maioria dos ácidos graxos, TAG, DAG e MAG presentes na transesterificação do óleo de soja. No entanto, a LPP pode apresentar maior atividade frente alguns deles, desta forma a mistura resulta ser mais eficiente que as lipases individuais. De fato, FREITAS

et al. (2007) reportam que a LPP possui maior especificidade por ácidos linoleico e linolênico, presentes no óleo de soja, do que a LTL. Igualmente, RODRIGUES et al. (2012) reportaram um comportamento similar na mistura de LTL com a lipase *Rhizomucor miehei* (LRM), ambas 1,3 regioespecíficas. Sob as condições ótimas para a etanólise do óleo de soja (razão molar etanol/óleo de soja de 7,5:1; 25% de enzima, em relação à massa de óleo; razão LTL/LRM de 80% e 4% de água em relação à massa de óleo) a mistura apresentou 90% de conversão, em torno de 10% maior que a LTL individual e 50% maior que a LRM individual.

Por outro lado, LEE et al. (2006) reportam o uso da mistura de duas lipases com regioespecificidade diferentes, lipases de *Rhizopus oryzae* (LRO; 1,3 regioespecífica) e de *Candida rugosa* (LCR; não regioespecífica). Em experimentos separados, o rendimento máximo alcançado foi 70% com a LRO em 18 h e 20% com a LCR em 30 h. Entretanto, quando as lipases foram misturadas foi obtido um rendimento superior a 90% em 18 h e 99% em 21 h de reação. A justificativa para a melhoria do processo foi atribuída ao fato da LCR, não regioespecífica, conseguir hidrolisar o ácido graxo na posição *sn*-2 do 1,2-diglicerídeo liberado pela ação da LRO que é 1,3 regioespecífica. Uma vez que o fenômeno da migração acil necessário para a hidrólise total do triglicerídeo usando a LRO é evitado, o rendimento e a velocidade da reação aumentam, melhorando assim o processo (DU et al., 2005; LEE et al., 2006).

4.5. Razão molar entre os substratos

O efeito da razão molar óleo de soja/etanol na concentração mássica de EEAG alcançada pela mistura dos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA também foi avaliado conforme a metodologia descrita no item 3.2.6. As reações de transesterificação foram conduzidas oferecendo uma carga enzimática de 500 TBU/g óleo, avaliando as razões molares de óleo de soja para etanol de 1:3, 1:5, 1:7 e 1:10. Os resultados são apresentados na Figura 4.

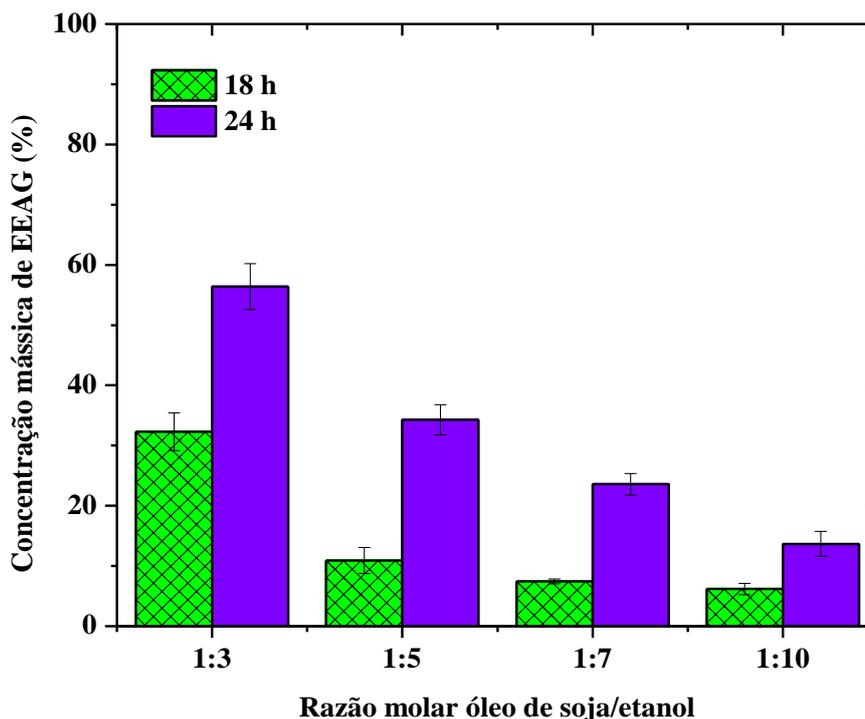


Figura 4-9: Efeito da razão molar de óleo de soja/etanol na concentração mássica de EEAG obtida pela mistura dos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA, oferecendo uma carga enzimática de 500 TBU/g óleo de soja com 18h e 24h.

A maior concentração mássica de EEAG foi obtida com a razão estequiométrica (1:3). Quando as reações foram conduzidas com um excesso de etanol a concentração mássica de EEAG diminuiu. A diminuição na atividade dos CLEAs e na concentração final de EEAG com uma maior concentração de etanol no meio reacional pode ser explicada pela capacidade do excesso de etanol de alterar a conformação da enzima imobilizada, levando à inativação irreversível (KIRAN; SURESH BABU; DIVAKAR, 2001; SALIS et al., 2005; SOUMANOU; BORNSCHEUER, 2003).

O desempenho da mistura dos CLEAs na transesterificação do óleo de soja nas razões molares óleo de soja/etanol de 1:3 e 1:5, oferecendo uma carga enzimática de 6000 TBU/g óleo foi avaliado conforme a metodologia descrita no item 3.2.6. Os resultados são apresentados na Figura 4-10. A mistura apresentou um desempenho similar nas duas razões molares óleo de soja/etanol (1:3 e 1:5) para as condições experimentais, desta forma a razão de 1:3 foi escolhida para conduzir os experimentos no reator de fluxo em vórtice.

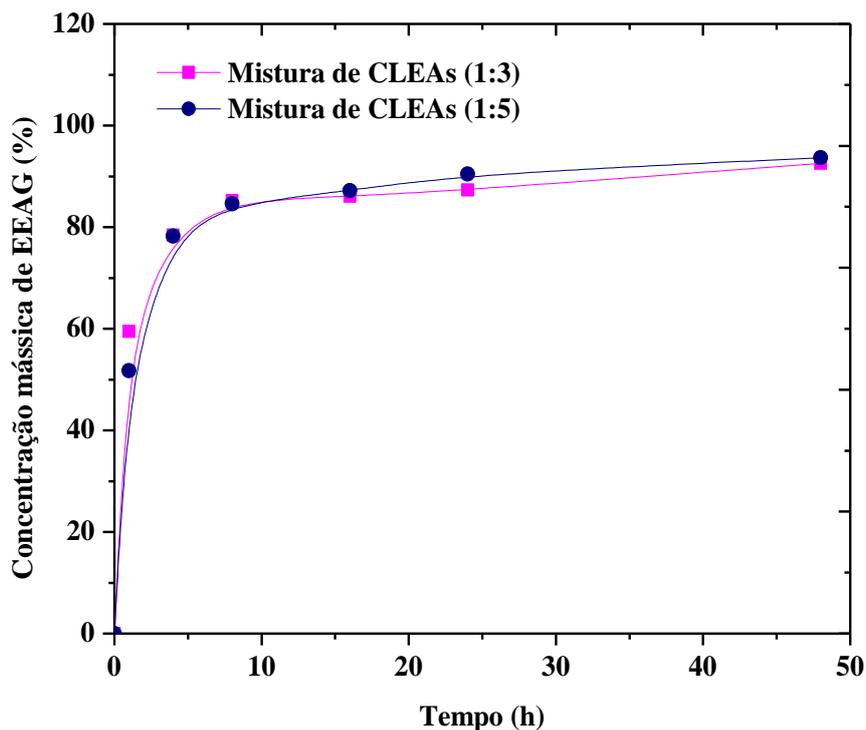


Figura 4-10: Perfis de concentração mássica de EEAG alcançados pela mistura de CLEAs com razões molares óleo de soja/etanol de 1:3 e 1:5.

4.6. Síntese de biodiesel em reator de fluxo em vórtice com a mistura dos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA

Finalmente, a mistura dos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA foi testada no reator de fluxo em vórtice para catalisar a transesterificação do óleo de soja. Os experimentos foram conduzidos sob agitação de 900 rpm do cilindro interno, suficiente para que ocorresse a suspensão total das partículas dos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA numa razão molar óleo de soja/etanol de 1:3 e oferecendo uma carga enzimática de 6000 TBU/g óleo (item 3.2.7.2).

O perfil de concentração mássica de EEAG na transesterificação do óleo de soja catalisada pela mistura dos CLEAs durante 12 h de reação é apresentado na Figura 4-11. A mistura dos CLEAs usada no reator de fluxo em vórtice apresentou um desempenho menor (78,3 %) do que o obtido usando frascos fechados (86,1 %) em shaker (Figura 4) com 12 h de reação.

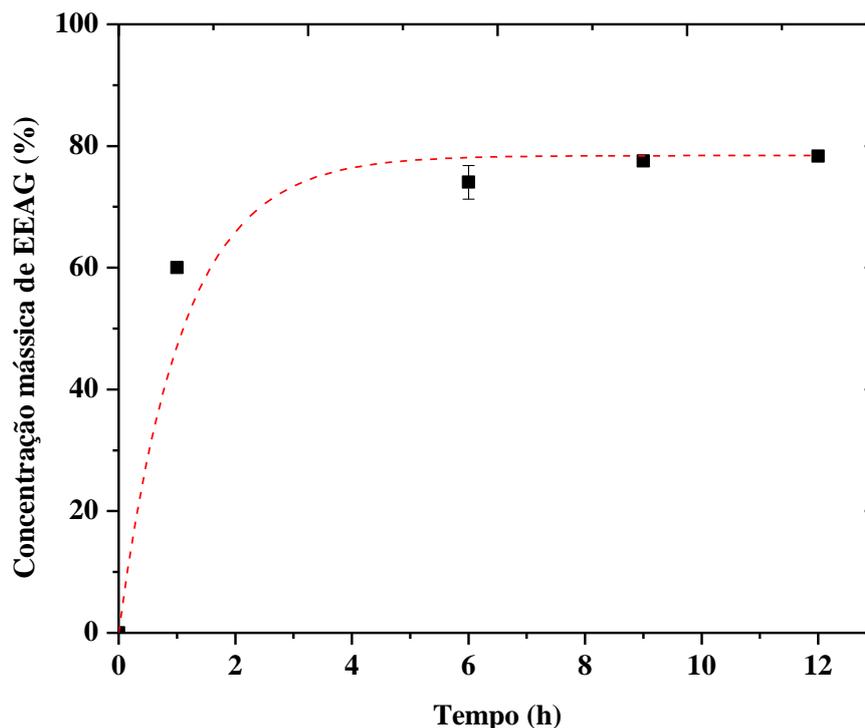


Figura 4-11: Perfil de concentração mássica de EEAG alcançado pela mistura de CLEAs numa razão molar de óleo de soja/etanol de 1:3 oferecendo uma carga enzimática de 6000 TBU/g de óleo no reator de fluxo em vórtice

A partir das 6 h de reação a concentração de EEAG não teve um aumento expressivo. Os experimentos se iniciaram sob agitação de 900 rpm, suficiente para a suspensão total das partículas dos CLEAs; no entanto, com o avanço da reação, as partículas precipitaram, fazendo-se necessário o aumento da agitação a cada 4 h até 2000 rpm para manter as partículas em suspensão durante todo o tempo de reação. Portanto, devido às dificuldades com a agitação do meio reacional a concentração mássica de EEAG foi menor que a obtida em experimentos realizados em frascos fechados e agitados no shaker.

4.7. Reuso da mistura dos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA na síntese de biodiesel em reator de fluxo em vórtice

A estabilidade operacional dos CLEAs foi avaliada pelo reuso no reator de fluxo em vórtice na transesterificação de óleo de soja. Segundo o perfil mostrado na Figura 4-11 os ciclos de reuso foram realizados durante 6 h e a recuperação do biocatalisador foi feita por centrifugação. Os resultados são apresentados na Figura

4-12, onde se observa que entorno 80% da atividade da enzima permaneceu durante 5 ciclos de reação avaliados. A redução na concentração mássica de EEAG do primeiro para o segundo ciclo pode estar associada à perda de biocatalisador entre as bateladas, as conversões se mantiveram aproximadamente constantes para as demais bateladas, com uma concentração mássica de EEAG em torno de 60%. Outra possível causa da redução na concentração de EEAG com o reuso dos CLEAs deve-se, possivelmente, a lixiviação de moléculas de enzima a partir dos CLEAs. Apesar da queda inicial na atividade enzimática, os resultados foram animadores e mostram que a mistura de CLEAs pode ser utilizada em processos de transesterificação.

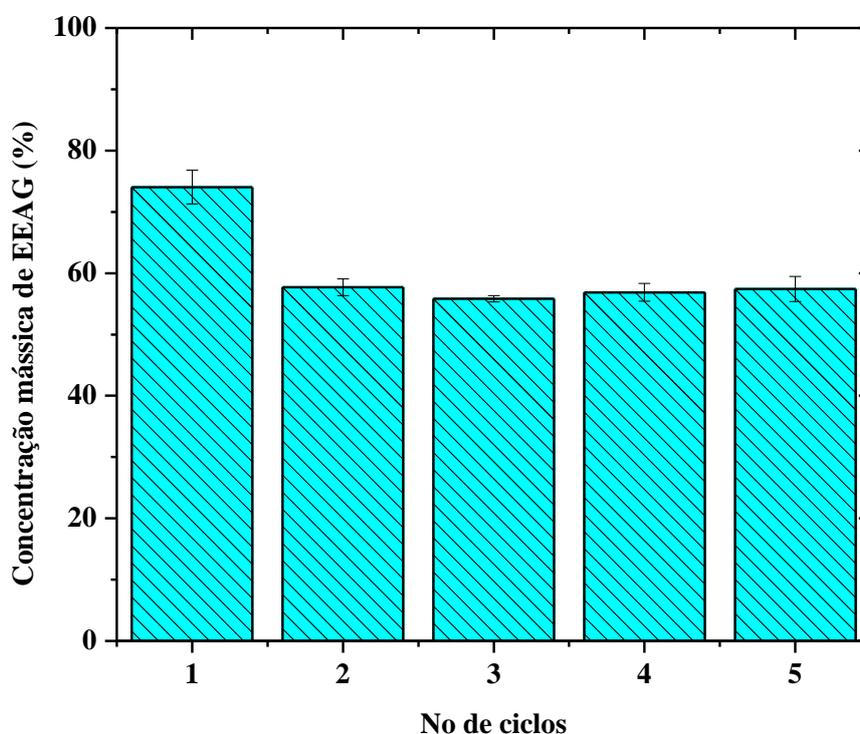


Figura 4-12: Reuso da mistura de CLEAs na transesterificação de óleo de soja com etanol durante 6 h a 30°C, oferecendo uma carga enzimática de 6000 TBU/g óleo no reator de fluxo em vórtice.

A mistura dos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA mostrou ser um biocatalisador de baixo custo, interessante e comparável com outros derivados imobilizados comerciais. Por exemplo, COSTA RODRIGUES et al. (2009) reportaram a otimização da transesterificação de óleo de soja pela LTL imobilizada comercial, Lipozyme TL-IM da Novozymes, em um sistema isento de solventes. Sob as condições otimizadas (26°C; razão molar etanol/óleo, 7,5:1; 25% em relação ao peso do óleo; e

4% de água em relação ao peso do óleo), um rendimento de 69% foi alcançado em 12 h. Na avaliação da estabilidade enzimática da Lipozyme TL-IM cerca de 80% da atividade enzimática permaneceu após sete ciclos de síntese (COSTA RODRIGUES et al., 2009).

Os mesmos autores também reportaram a mistura de duas preparações comerciais de lipases imobilizadas na etanólise de óleo de soja. RODRIGUES et al. (2011) testaram a LTL imobilizada covalentemente em Lewatit VP OC 1600 junto com a Lipozyme RM-IM da Novozymes. As conversões finais considerando o consumo de etanol foram 95% para a mistura nas melhores condições (razão molar etanol/óleo de soja de 7,5:1; 25% de enzima, da massa de óleo; razão LTL/LRM de 80% e 4% de água da massa de óleo) e 83% e 62% para LTL e LRM, respectivamente, quando essas enzimas foram usadas individualmente. A mistura das lipases LTL e LRM conseguiu ser reusada 10 vezes sem perda significativa da atividade quando as lipases imobilizadas foram lavadas com n-hexano. Quando as lipases imobilizadas não foram lavadas com n-hexano, a mistura conseguiu ser usada 3 vezes com mais de 90% de conversão.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1. Conclusões

- A ação conjunta das lipases LPP e LTL na transesterificação de óleo de soja com etanol foi demonstrada, sendo possível aumentar a concentração de EEAG até 52,3%, enquanto que a LTL e LPP individuais alcançaram 9,0% e 1,2% de EEAG, respectivamente.
- A presença ou ausência da proteína de soja, o tipo e concentração de entrecruzante junto com o tempo de entrecruzamento, foram parâmetros-chave na preparação dos LPP-PS-CLEAs ativos e estáveis.
- O melhor CLEA de LPP, denominado LPP-PS-CLEA, reportado neste trabalho foi preparado pela precipitação de uma solução de LPP com proteína de soja (razão mássica LPP/PS de 1:3) com etanol hidratado (numa razão solução enzimática/etanol de 1:3), durante 30 min, seguido do entrecruzamento com glutaraldeído (10 μmol de grupos aldeído/mg proteína total), durante 2,5 h, a 4 °C sob agitação a 150 rpm em shaker.
- As mudanças conformacionais na estrutura nativa da lipase promovidas pelas ligações intra e/ou intermoleculares formadas durante a formação do LPP-PS-CLEA, conferiram rigidez à estrutura supramolecular do CLEA e, portanto, permitiram alcançar aproximadamente 60 % de EEAG após 24 h de reação, o que não foi possível com a lipase livre.
- O LPP-PS-CLEA pode ser um biocatalisador interessante e promissor para ser usado na transesterificação de óleo de soja, devido principalmente ao baixo custo da LPP e ao fato da técnica CLEA ser barata para imobilizar enzimas em comparação com a imobilização de enzimas em suportes sólidos caros.
- O melhor CLEA de LTL, reportado neste trabalho e denominado LTL-SDS-CLEA, foi preparado pela precipitação de uma solução de LTL na presença do surfactante SDS (2,5 % m/v) com etanol hidratado (numa razão solução enzimática/etanol de 1:3) e o entrecruzamento com glutaraldeído (80 μL), durante 16 h, a 4 °C sob agitação a 150 rpm em shaker.
- A mistura dos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA aumentou a velocidade de reação das lipases, na transesterificação de óleo de soja. Assim, a mistura

dos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA mostra-se um biocatalisador promissor para ser usado na transesterificação de óleo de soja.

- A LTL é mais ativa que a LPP frente à maioria dos ácidos graxos, MAG, DAG e TAG presentes na transesterificação do óleo de soja. No entanto, a LPP pode apresentar maior atividade frente a alguns deles.

- A mistura dos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA apresentou boa estabilidade durante a transesterificação de óleo de soja no reator de fluxo em vórtice, uma vez que 80% da atividade da enzima foi mantida durante 5 ciclos de reação avaliados.

- O RFV mostrou ser uma alternativa interessante frente aos reatores agitados convencionais visando o uso de biocatalisadores imobilizados em ausência de suportes.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

Propõem-se algumas questões que não puderam ser abordadas e que podem aperfeiçoar este trabalho, dentre eles:

- Avaliar a mistura das lipases imobilizadas, LTL e LPP, em diferentes relações, que também mostrou ter um efeito positivo na síntese de biodiesel.

- Avaliar o uso de partículas magnéticas na preparação dos CLEAs para melhorar sua estabilidade mecânica.

- Realizar um estudo sistemático para avaliar as condições de precipitação e entrecruzamento das lipases LPP e LTL combinadas para preparar um combi-CLEA de lipases.

- Otimizar as condições de transesterificação de óleo de soja com os CLEAs de LPP e LTL individuais e misturados.

- Avaliar diferentes relações da mistura dos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA.

- Comparação entre o uso do reator de fluxo em vórtice e o uso do reator tipo cesta frente à estabilidade operacional da mistura dos CLEAs LPP-PS-CLEA e LTL-SDS-CLEA.

- Testar os derivados catalíticos na síntese de biodiesel a partir de outros óleos vegetais e óleo usado de fritura.

REFERENCIAS

ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U. T.; BEDNARSKI, W. The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, n. 8, p. 800–813, ago. 2009.

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

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, p. 452–458, 2013.

BAGI, K.; SIMON, L. M.; SZAJÁNI, B. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 531–535, 1997.

BALAT, M.; BALAT, H. Progress in biodiesel processing. **Applied Energy**, v. 87, n. 6, p. 1815–1835, 2010.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392–416, 1 maio 1996.

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. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 102, n. 2, p. 133–153, 2000.

BERGER, M.; SCHNEIDER, M. P. Lipases in Organic Solvents : the Fatty Acid Chain Length Profile. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 9, p. 647–645, 1991.

BORGDORF, R.; WARWEL, S. Substrate selectivity of various lipases in the esterification of cis- and trans-9-octadecenoic acid. **Applied Microbiology and**

Biotechnology, v. 51, n. 4, p. 480–485, 1999.

BORNSCHEUER, U. et al. Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization. **BBA - General Subjects**, v. 1201, n. 1, p. 55–60, 1994.

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, 7 maio 1976.

BYUN, H.-G. et al. Lipase catalyzed production of monoacylglycerols by the esterification of fish oil fatty acids with glycerol. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 12, n. 5, p. 491–496, out. 2007.

CABALLERO, V. et al. Sustainable preparation of a novel glycerol-free biofuel by using pig pancreatic lipase: Partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 334–342, 2009.

CABANA, H.; JONES, J. P.; AGATHOS, S. N. Utilization of cross-linked laccase aggregates in a perfusion basket reactor for the continuous elimination of endocrine-disrupting chemicals. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 6, p. 1582–1592, 2009.

CALERO, J. et al. An overview on glycerol-free processes for the production of renewable liquid biofuels, applicable in diesel engines. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1437–1452, 2015.

CAO, L. et al. Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 665–670, 2001.

CAO, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. **Organic letters**, v. 2, n. 10, p. 1361–4, 18 maio 2000.

CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents.

Green Chemistry, v. 9, p. 927–934, 2007.

CARRASCO-LÓPEZ, C. et al. Activation of bacterial thermo alkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 7, p. 4365–4372, 2009.

ÇETINKAYA, M.; KARAOSMANOĞLU, F. Optimization of Base-Catalyzed Transesterification Reaction of Used Cooking Oil. **Energy & Fuels**, v. 18, n. 6, p. 1888–1895, nov. 2004.

CHATTOPADHYAY, S. et al. Biocatalytic production of biodiesel from cottonseed oil: Standardization of process parameters and comparison of fuel characteristics. **Applied Energy**, v. 88, n. 4, p. 1251–1256, 2011.

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

COSTA RODRIGUES, R. et al. Improved enzyme stability in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, n. 3, p. 394–404, 2009.

CRUZ, J. et al. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, p. 7–14, ago. 2012.

CUI, J. et al. Preparation of spherical cross-linked lipase aggregates with improved activity, stability and reusability characteristic in water-in-ionic liquid microemulsion. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 7, p. 1785–1793, 2017.

CUI, J. D.; JIA, S. R. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges. **Critical reviews in biotechnology**, v. 8551, n. September, p. 1–14, 2013.

CUI, J. D.; LIU, R. L.; LI, L. B. A facile technique to prepare cross-linked enzyme aggregates of bovine pancreatic lipase using bovine serum albumin as an

additive. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 2, p. 610–615, 2016.

CURRAN, S. J.; BLACK, R. A. Quantitative experimental study of shear stresses and mixing in progressive flow regimes within annular-flow bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 59, n. 24, p. 5859–5868, 2004.

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. 5508–16, jul. 2010.

DALAL, S.; KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Preparation and characterization of combi-CLEAs catalyzing multiple non-cascade reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, n. 3–4, p. 128–132, mar. 2007.

DE ARAÚJO, M. E. M. B. et al. Response surface modelling of the production of structured lipids from soybean oil using Rhizomucor miehei lipase. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 28–33, jul. 2011.

DE LIMA, L. N. et al. Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from Pseudomonas fluorescens by multipoint covalent attachment. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 118–123, jan. 2013.

DE LIMA, L. N. et al. Mono- and heterofunctionalized silica magnetic microparticles (SMMPs) as new carriers for immobilization of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, abr. 2017.

DE REZENDE, S. M. et al. Transesterification of vegetable oils promoted by poly(styrene-divinylbenzene) and poly(divinylbenzene). **Applied Catalysis A: General**, v. 349, n. 1–2, p. 198–203, 2008.

DEREWENDA, U. et al. Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi Humicola lanuginosa and Rhizopus delemar. **Journal of Lipid Research**, v. 35, n. 3, p. 524–534, 1994.

DESAI, P. D.; DAVE, A. M.; DEVI, S. Alcoholysis of salicornia oil using

free and covalently bound lipase onto chitosan beads. **Food Chemistry**, v. 95, p. 193–199, 2006.

DU, W. et al. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, n. 1–6, p. 68–71, dez. 2005.

DUMRI, K.; HUNG ANH, D. Immobilization of Lipase on Silver Nanoparticles via Adhesive Polydopamine for Biodiesel Production. **Enzyme Research**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

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

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3–4, p. 197–212, mar. 2010.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1061–1067, out. 2008.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 2, p. 232–237, 2003.

FRANZREB, M. et al. Protein purification using magnetic adsorbent particles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 5, p. 505–16, maio 2006.

FREITAS, L. et al. Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1725–1731, 2007.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405–16, jan. 2001.

GALVIS, M. et al. Chemical amination of lipase B from *Candida antarctica* is an efficient solution for the preparation of crosslinked enzyme aggregates. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2373–2378, dez. 2012.

GAMBA, M.; LAPIS, A. A. M.; DUPONT, J. Supported Ionic Liquid Enzymatic Catalysis for the Production of Biodiesel. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 350, n. 1, p. 160–164, 2008.

GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 7 nov. 2011.

GARNER, C. W.; SMITH, L. C. Porcine pancreatic lipase. A glycoprotein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 2, p. 561–565, 1972.

GHAZALI, H. M.; HAMIDAH, S.; CHE MAN, Y. B. Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 6, p. 633–639, 1995.

GIORDANO, R. C. et al. Analysis of a Taylor – Poiseuille vortex flow reactor — I: Flow patterns and mass transfer characteristics. **Chemical Engineering Science**, v. 53, n. 20, p. 3635–3652, 1998.

GIORDANO, R. L. .; GIORDANO, R. C.; COONEY, C. L. Performance of a continuous Taylor–Couette–Poiseuille vortex flow enzymic reactor with suspended particles. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1093–1101, jul. 2000.

GOGOI, S. et al. Esterification of lauric acid with lauryl alcohol using cross-linked enzyme crystals: Solvent effect and kinetic study. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 24, n. 5, p. 343–351, 2006.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, n. 3–4, p. 111–120, jun. 2006.

GUAUQUE, M. DEL P.; FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of selected lipases: a procedure for the proper calculation

of their recovered activity. **AMB Express**, v. 3, p. 1–11, 2013.

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

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

GULDHE, A. et al. Biocatalytic conversion of lipids from microalgae *Scenedesmus obliquus* to biodiesel using *Pseudomonas fluorescens* lipase. **Fuel**, v. 147, p. 117–124, 2015.

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

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763–781, 2004.

HAAS, M. J. Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: vegetable oil soapstock. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1087–1096, jun. 2005.

HALIM, S. F. A.; KAMARUDDIN, A. H.; FERNANDO, W. J. N. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. **Bioresource technology**, v. 100, n. 2, p. 710–6, jan. 2009.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chem Soc Rev**, v. 38, n. 2, p. 453–468, 2009.

HASAN, F. et al. Enzymes used in detergents : Lipases. **African Journal of**

Biotechnology, v. 9, n. 31, p. 4836–4844, 2010.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology.**, v. 39, n. 2, p. 235–251, jun. 2006.

HERMOSO, J. et al. Lipase Activation by Nonionic Detergents: THE CRYSTAL STRUCTURE OF THE PORCINE LIPASE-COLIPASE-TETRAETHYLENE GLYCOL MONOOCTYL ETHER COMPLEX. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 30, p. 18007–18016, 1996.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, 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, jan. 2008.

HOLCAPEK, M. et al. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. **Journal of Chromatography A**, v. 858, n. 1, p. 13–31, 1999.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, set. 1998.

JEGANNATHAN, K. R. et al. Production of biodiesel using immobilized lipase - A critical review. **Critical reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 253–64, jan. 2008.

JUNG, F.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Impact of enzymatic pre-hydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 21, p. 1797–1802, 2002.

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

KARTAL, F. et al. Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, n. 3–4, p. 85–89, set. 2011.

KHANAHMADI, S. et al. Optimized preparation and characterization of

CLEA-lipase from cocoa pod husk. **Journal of Biotechnology**, v. 202, p. 153–161, 2015.

KHANAHMADI, S. et al. Cocoa pod husk: A new source of CLEA-lipase for preparation of low-cost biodiesel: An optimized process. **Journal of Biotechnology**, v. 231, p. 95–105, 2016.

KIRAN, K. R.; SURESH BABU, C. V; DIVAKAR, S. Thermostability of porcine pancrease lipase in non-aqueous media. **Process Biochem**, v. 36, p. 885–892, 2001.

KIRK, O.; WU, M. Lipases from *Candida antarctica* : Unique Biocatalysts from a Unique Origin Abstract : **Organic Process Research & Development**, v. 6, p. 446–451, 2002.

KOJIMA, Y.; YOKOE, M.; MASE, T. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 58, n. 9, p. 1564–1568, 1994.

KOPP, W. **Síntese e ativação superficial de novos suportes magnéticos para imobilização de enzimas**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, p. 222, 2013.

KOPP, W. et al. Easily handling penicillin G acylase magnetic cross-linked enzymes aggregates: Catalytic and morphological studies. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 38–46, jan. 2014.

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

KUMAR TIWARI, A.; KUMAR, A.; RAHEMAN, H. Biodiesel production from jatropha oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: An optimized process. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 8, p. 569–575, ago. 2007.

KUMARI, V.; SHAH, S.; GUPTA, M. N. Preparation of Biodiesel by Lipase-Catalyzed Transesterification of High Free Fatty Acid Containing Oil from

Madhuca indica. **Energy & Fuels**, v. 21, n. 12, p. 368–372, 2007.

LA ROVERE, E. L.; PEREIRA, A. S.; SIMÕES, A. F. Biofuels and Sustainable Energy Development in Brazil. **World Development**, v. 39, n. 6, p. 1026–1036, 2011.

LADNER, W.; WHITESIDES, G. Lipase-catalyzed hydrolysis as a route to esters of chiral epoxy alcohols. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 23, p. 7250–7251, 1984.

LEE, D. H. et al. Biodiesel Production Using a Mixture of Immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* Lipases. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 11, p. 522–525, 2006.

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, abr. 2010.

LI, W. et al. Acyl migration and kinetics study of 1(3)-positional specific lipase of *Rhizopus oryzae*-catalyzed methanolysis of triglyceride for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 12, p. 1888–1893, 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 and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 523–535, 2015.

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

LUNA, C. et al. Biofuel that keeps glycerol as monoglyceride by 1,3-selective ethanolysis with pig pancreatic lipase covalently immobilized on AlPO₄ support. **Energies**, v. 6, n. 8, p. 3879–3900, 2013.

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

MA, Z.-Y. et al. Synthesis of magnetic silica nanospheres with metal ligands and application in affinity separation of proteins. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 275, n. 1–3, p. 87–91, mar. 2006.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 3, n. 1, p. 193–217, 1985.

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

MAFRA, A. C. O. **Biocatalyst engineering applied to the improvement of cross-linked enzyme aggregates aiming at the multienzymatic conversion of sucrose to gluconic acid and fructose syrup**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, p. 127, 2017.

MARGRETH, M.; SCHLINK, R.; STEINBACH, A. Water Determination By Karl Fischer Titration. In: **Pharmaceutical Sciences Encyclopedia**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p. 82.

MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource technology**, v. 77, n. 2, p. 145–55, abr. 2001.

MATEO, C. et al. A New, Mild Cross-Linking Methodology to Prepare Cross-Linked Enzyme Aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 273–276, 2004.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, maio 2007.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119–134, 2012.

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; DE CASTRO, H. F. Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodigestion. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 185–190, 2006.

MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004.

MIURA, T. et al. Convenient synthesis of Z-monoacetates of 2-alkylidene-1,3-propanediols. **Tetrahedron**, v. 64, n. 39, p. 9305–9308, 2008.

MOORE, C. M. V. **Characterization of a Taylor-Couette vortex flow reactor**. [s.l.] Massachusetts Institute of Technology, 1994.

MOREIRA, A. B. R. et al. Biodiesel Synthesis by Enzymatic Transesterification of Palm Oil with Ethanol Using Lipases from Several Sources Immobilized on Silica–PVA Composite. **Energy & Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3689–3694, nov. 2007.

MUSTRANTA, A; FORSSELL, P.; POUTANEN, K. Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. **Enzyme and microbial technology**, v. 15, n. 2, p. 133–9, fev. 1993.

NEVELL, T. Methods in carbohydrate chemistry. In: WHISTLER, B. (Ed.). . New York: Academic Press, 1963. v. 3p. 210–225.

NGUYEN, H. C. et al. Lipase-catalyzed synthesis of biodiesel from black soldier fly (*Hermetica illucens*): Optimization by using response surface methodology. **Energy Conversion and Management**, v. 145, p. 335–342, ago. 2017.

NIE, K. et al. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1–4, p. 142–147, dez. 2006.

ODA, M. et al. Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 1, p. 45–51, mar. 2005.

OZYILMAZ, G.; GEZER, E. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, n. 3–4, p. 140–145, jul. 2010.

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. 20, p. 279–286, dez. 2002.

PALOMO, J. M. et al. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447–454, mar. 2005.

PAULA, A. V et al. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane–polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 281–288, mar. 2007.

PCHELINTSEV, N. A.; YOUSHKO, M. I.; ŠVEDAS, V. K. Quantitative characteristic of the catalytic properties and microstructure of cross-linked enzyme aggregates of penicillin acylase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 4, p. 202–207, abr. 2009.

PLOU, F. J. et al. High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 1, p. 66–71, jan. 1996.

PRADO, R. G. et al. Multivariate Method for Transesterification Reaction of Soybean Oil Using Calcined Mg–Al Layered Double Hydroxide as Catalyst. **Catalysis Letters**, v. 144, n. 6, p. 1062–1073, 18 jun. 2014.

RAMADHAS, A. S.; JAYARAJ, S.; MURALEEDHARAN, C. Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. **Fuel**, v. 84, n. 4, p. 335–340, mar. 2005.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource technology**, v. 99, n. 10, p. 3975–81, jul. 2008.

RANGHEARD, M.-S. et al. Multi-competitive enzymatic reactions in organic media: a simple test for the determination of lipase fatty acid specificity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1004, n. 1, p. 20–28, jul. 1989.

RESENDE, M. M. et al. Distribution of suspended particles in a Taylor–Poiseuille vortex flow reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 56, n. 3, p. 755–761, fev. 2001.

RESENDE, M. M. et al. Enzymatic tailor-made proteolysis of whey in a vortex flow reactor. **AIChE Journal**, v. 51, n. 1, p. 314–322, jan. 2005.

RHIM, J.-W. et al. Soy protein isolate–dialdehyde starch films. **Industrial Crops and Products**, v. 8, n. 3, p. 195–203, set. 1998.

RODIONOVA, M. V. et al. Biofuel production: Challenges and opportunities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 12, p. 8450–8461, mar. 2017.

RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, out. 2013.

RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 682–688, mar. 2011.

ROGALSKA, E. et al. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. **Chirality**, v. 5, n. 1, p. 24–30, out. 1993.

RUIZ TORAL, A. et al. Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1095–1099, abr. 2007.

SALIS, A. et al. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of biotechnology.**, v. 119, n. 3, p. 291–299, 29 set. 2005.

SCHOEVAART, R. et al. Preparation, optimization, and structures of cross-

linked enzyme aggregates (CLEAs). **Biotechnology and bioengineering**, v. 87, n. 6, p. 754–62, 20 set. 2004.

SCHRAG, J. D. et al. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**, v. 5, n. 2, p. 187–202, fev. 1997.

SEBASTIAN, J.; MURALEEDHARAN, C.; SANTHIAGU, A. Enzyme catalyzed biodiesel production from rubber seed oil containing high free fatty acid. **International Journal of Green Energy**, v. 14, n. 8, p. 687–693, 21 jun. 2017.

SÉVERAC, E. et al. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: analysis of the economical impact. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 1, p. 61–70, 5 jan. 2011.

SHAH, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. **Analytical biochemistry**, v. 351, n. 2, p. 207–13, 15 abr. 2006.

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of *Jatropha* Oil. **Energy & Fuels**, v. 18, n. 1, p. 154–159, jan. 2004.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627–662, dez. 2001.

SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. **Biochemical Society transactions**, v. 35, n. 6, p. 1583–7, dez. 2007.

SHELDON, R. A. Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 1, p. 213–223, 21 jan. 2011a.

SHELDON, R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 467–77, nov. 2011b.

SHELDON, R. A.; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L. M. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 23, n. 3–4, p. 141–147, jan. 2005.

SHIMADA, Y. et al. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 3–5, p. 133–142, jun. 2002.

SILVA, R. A. **Aplicação de CLEA de beta-amilase de cevada na produção de maltose a partir de amido residual do bagaço de mandioca em reator de fluxo em vórtices**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, p. 100, 2015.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 1, p. 97–103, jul. 2003.

SOUZA, L. T. A.; MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. DE. Selection of Lipases for the Synthesis of Biodiesel from Jatropha Oil and the Potential of Microwave Irradiation to Enhance the Reaction Rate. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–13, out. 2016.

TAN, T. et al. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 459–465, dez. 2003.

TAN, Z. et al. Optimized microemulsion production of biodiesel over lipase-catalyzed transesterification of soybean oil by response surface methodology. **Green Processing and Synthesis**, v. 3, n. 6, p. 471–478, 2014.

TARTAJ, P. et al. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 290–291, p. 28–34, abr. 2005.

TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a

solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 1–2, p. 52–59, nov. 2010.

UPPENBERG, J. et al. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293–308, 15 abr. 1994.

VERGER, R. “Interfacial activation” of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32–38, jan. 1997.

VESCOVI, V. et al. Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino- glutaraldehyde spacer arms. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 2055–2066, dez. 2016a.

VESCOVI, V. et al. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel by Hydrolysis of Waste Cooking Oil Followed by Esterification of Free Fatty Acids. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v. 93, n. 12, p. 1615–1624, 23 dez. 2016b.

VESCOVI, V. et al. Immobilized Lipases on Functionalized Silica Particles as Potential Biocatalysts for the Synthesis of Fructose Oleate in an Organic Solvent/Water System. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 212, 30 jan. 2017.

VESCOVI, V.; DOS SANTOS, J. B. C.; TARDIOLI, P. W. Porcine pancreatic lipase hydrophobically adsorbed on octyl-silica: A robust biocatalyst for syntheses of xylose fatty acid esters. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2017.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4–6, p. 113–148, abr. 2000.

WANG, Y.; WU, H.; ZONG, M. H. Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 7232–7237, out. 2008.

WATANABE, Y. et al. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 7, p. 703–707, jul. 2001.

WILSON, L. et al. Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in lentikats: evaluation of a novel biocatalyst in organic media. **Biotechnology and bioengineering**, v. 86, n. 5, p. 558–62, 5 jun. 2004.

www.anp.gov.br/wwwanp/biocombustiveis/biodiesel. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/biocombustiveis/biodiesel>>.

YANG, X. et al. Highly efficient biosynthesis of sucrose-6-acetate with cross-linked aggregates of Lipozyme TL 100 L. **Journal of Biotechnology**, v. 161, n. 1, p. 27–33, set. 2012.

YESILOGLU, Y. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 2, p. 157–160, fev. 2004.

YU, J.; CHANG, P. R.; MA, X. The preparation and properties of dialdehyde starch and thermoplastic dialdehyde starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 296–300, jan. 2010.

ZHANG, W.-W. et al. Surfactant-activated magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of *Thermomyces lanuginosus* lipase for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 83–89, maio 2015.

ZHANG, Y. et al. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 1–16, ago. 2003.

ZHAO, X. et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182–197, abr. 2015.

ZHEN, Q. et al. Preparation of β -mannanase CLEAs using macromolecular

cross-linkers. **Catalysis Science & Technology**, v. 3, n. 8, p. 1937, mar. 2013.

ZHENG, C.-Z. et al. Regioselective synthesis of amphiphilic metoprolol–saccharide conjugates by enzymatic strategy in organic media. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 123–127, jan. 2011.