

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS – PEP

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS E EMULSIFICANTES
UTILIZANDO LIPASE IMOBILIZADA EM MATRIZES
HIDROFÓBICAS**

Autora: Nayara Bezerra Carvalho

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Cleide Mara Faria Soares

Prof. Dr. Álvaro Silva Lima

ARACAJU, SE – BRASIL

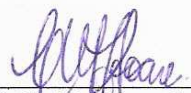
AGOSTO DE 2011

PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS E EMULSIFICANTES UTILIZANDO LIPASE
IMOBILIZADA EM MATRIZES HIDROFÓBICAS.

Nayara Bezerra Carvalho

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS.

Aprovada por:



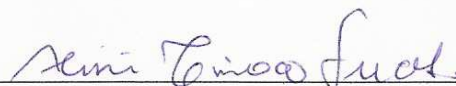
Drª Cleide Mara Faria Soares



Dr Álvaro Silva Lima



Drª Gisella Maria Zanin



Drª Alini Tinoco Fricks



Dr Daniel Pereira da Silva

ARACAJU, SE – BRASIL

AGOSTO DE 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

C331p Carvalho, Nayara Bezerra
 Produção de ésteres etílicos e emulsificantes utilizando lipase imobilizada em
 matrizes hidrofóbicas / Nayara Bezerra Carvalho; orientação [de] Cleide Mara
 Faria Soares, Álvaro Silva Lima. – Aracaju: 2011.
 119 f.: il.

 Inclui bibliografias
 Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade
 Tiradentes (UNIT).

 1. Lipase. 2.Imobilização de enzima. 3. Esterificação I. Soares, Cleide Mara
 Faria, (orient.). II Lima, Álvaro Silva (orient.). III. Universidade Tiradentes
 (UNIT). VI. Título.

CDU: 662.767.2

*“Gosto daquilo que me desafia. O fácil nunca me interessou,
já o obviamente impossível sempre me atraiu.”*
Clarice Lispector

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela vida, amor e presença em todos os momentos dessa conquista, protegendo-me e renovando a minha fé a cada dia.

Aos meus amados pais pelos valores morais, amor incondicional e por toda valorização que deram à minha formação e educação, obrigada pela oportunidade de ser parte de vocês. A minha querida mãe que sempre acreditou no meu sonho e de mão dada comigo percorreu esse caminho me fazendo acreditar, através do seu amor, compreensão e paciência, que se tornaria realidade. Ao meu pai que apesar da distancia sempre tão atencioso e dedicado, me impulsionou, através do seu amor e exemplo de responsabilidade, a busca pelo meu crescimento profissional e pessoal.

À minha única irmã, Taynara, pelo amor, apoio e amizade. Apesar das nossas adversidades nunca duvide do meu amor incondicional e da certeza de que ainda me orgulharei muito mais de você também e que estarei sempre do seu lado.

Ao Flávio pelo amor, carinho, incentivo, principalmente pela paciência nas horas mais difíceis nessa reta final e sorrisos capazes de fazer esquecer qualquer problema, a sua determinação é contagiante. Obrigada pela oportunidade de aprender tanto ao seu lado e pelos momentos felizes.

A todos os meus familiares, bisavó, avó, tios, tias, dindo, dinda, primos e primas, por sempre torcerem por mim e pelos momentos de alegria e fraternidade.

Aos meus queridos orientadores Cleide Mara Faria Soares e Álvaro Silva Lima pelos ensinamentos, enriquecimento profissional, dedicação, paciência, amizade, carinho, disponibilidade, apoio constante em cada etapa deste trabalho e confiança em me acolher na volta ao caminho da ciência. Obrigada especial à Cleide por ter sido a grande responsável por meu ingresso nessa carreira e me fazer enxergar o caminho que realmente queria seguir. Muito obrigada pela oportunidade que vocês me proporcionaram em fazer parte desse grupo de pesquisa. Espero não desapontá-los jamais. Serei imensuravelmente grata pelo incentivo e por serem exemplos de dedicação e seriedade na pesquisa científica.

À Universidade Tiradentes, Instituto de Tecnologia e Pesquisa e em especial à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Processo, buscando sempre a melhoria deste curso. Aos professores pelos ensinamentos concebidos e disponibilidade. Estendo os meus agradecimentos aos funcionários, professores, doutorandos, mestrands e estagiários de laboratórios onde também foram realizadas parcerias para o sucesso dessa pesquisa.

O resultado desse estudo só foi possível pela dedicação e pelo esforço de todo o grupo. Sendo assim, quero expressar aqui minha gratidão a todos que passaram e aos que ainda fazem parte. Muito obrigada aos que estiveram do meu lado nesses momentos me ensinando e

me ajudando seja, nos experimentos ou com críticas construtivas, palavras de carinho e conforto, em especial aos meus amigos que sempre me incentivaram e participaram da realização desse sonho. Cada um de vocês sabe da real importância e reciprocidade, pois se fosse descrever tal sentimento de gratidão e momentos juntos, não terminaria tão cedo. Obrigada à Emanuelle que nessa trajetória se tornou uma grande amiga, compartilhando reações e emoções, fazendo da sua presença em minha vida uma fortaleza. À Ranyere que junto comigo iniciou essa jornada, nunca vou esquecer-me das manhãs no laboratório quando ele queria me matar por tê-lo acordado cedo. À Murillo um grande amigo e exemplo profissional. À Máira que foi a primeira que conheci quando cheguei a Aracaju e tive o prazer em ter novamente ao meu lado durante o mestrado. A Meirielly pelo carinho que só tem a crescer desde ao nosso primeiro congresso juntas. Aos amigos do laboratório que fizeram parte do meu dia, muitas vezes até mais do que minha família: Acenini, Alisson, Bruno, Flávia, Igor, Kelvis, Matheus, Milena, Monalisa, Otávio, Rebeca, Roneval, Samuel e Wagner. Aos amigos que não fazem parte diretamente desse mundo acadêmico, mas foram também essenciais para que eu estivesse aqui hoje feliz e realizada: Patty, Marília, Juliana, Deborah, Henrique, Michelle e Paula.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que contribuíram para que este trabalho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos e forte abraço.

Nayara Bezerra Carvalho

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS E EMULSIFICANTES UTILIZANDO LIPASE IMOBILIZADA EM MATRIZES HIDROFÓBICAS

Nayara Bezerra Carvalho

O objetivo desta pesquisa foi produzir ésteres etílicos e emulsificantes utilizando lipase do novo isolado de *Bacillus* sp. ITP-001 (ITP-001) e da comercial de *Candida rugosa* (LCR) imobilizada em matrizes hidrofóbicas pela técnica sol-gel, bem como realizar a caracterização bioquímica, a determinação dos parâmetros da reação de esterificação e estabilidade enzimática na presença de fluido supercrítico. Os resultados para a caracterização bioquímica da ITP-001 imobilizada apresentaram maior atividade de hidrólise do azeite de oliva em pH 5, a 80°C. A atividade enzimática foi estimulada pelos íons EDTA, FeCl₃, MnCl₂, ZnCl₂ e na maioria dos solventes orgânicos, com exceção do álcool etílico e isopropílico. Os valores de V_{max} e K_m foram respectivamente 0,102mmol/min.g e 14,62mmol. Os melhores resultados para a produção de laurato de isopropila foram obtidos pela ITP-001 a 52,5°C e pela LCR a 62,5°C. A maior conversão de ácido láurico foi a 3000mM para ITP-001 livre e LCR livre e imobilizada; e 2340mM para a ITP-001 imobilizada. O percentual de massa de enzima oferecida foi de 0,75% (m/m) para lipase livre e 5,25% (m/m) para a imobilizada. A estabilidade operacional da ITP-001 imobilizada, na atividade de esterificação do ácido láurico com álcool isopropílico foi baixa após o segundo uso. Na reação de transesterificação a condição ótima foi alcançada com 500U de LCR livre que atingiu 32,68% de conversão na razão molar de 1:18 (óleo de soja:etanol), a 40°C por 96h. Para a LCR imobilizada o maior rendimento foi de 34,81%, na razão molar 1:6 (óleo de soja:etanol), a 40°C após 120h. Quanto à influência do solvente hexano no meio reacional com a LCR livre obteve-se 61,9; 21,4; 0,0 e 16,73%, mono-, di-, trigliceróis e ésteres etílicos, respectivamente. Foi observado ganho na atividade residual para as enzimas livres após submetidas ao fluido supercrítico e utilizadas na hidrólise e esterificação. E na forma imobilizada a LCR alcançou ganho de atividade de esterificação superior a 1000%.

Palavras-Chave: lipase imobilizada, esterificação, transesterificação, fluido supercrítico.

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of University Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

PRODUCTION OF ETHYL ESTER AND EMULSIFIERS USING LIPASE IMMOBILIZED IN HYDROPHOBIC MATRIX

Nayara Bezerra Carvalho

The aim of this research was to produce ethylic esters and emulsifiers using the lipase from the new isolate *Bacillus* sp. ITP-001 (ITP-001) and from the commercial immobilized *Candida rugosa* (LCR) in hydrophobic matrices by sol-gel technique, as well as carry on the biochemical characterization, parameters determination of the esterification reaction and enzymatic stability in the presence of a supercritical fluid. The results for the biochemical characterization of immobilized ITP-001 showed a higher hydrolysis activity of the olive oil in pH 5 at 80°C. The enzymatic activity was stimulated by EDTA, FeCl₃, MnCl₂, ZnCl₂ ions and in most of the organic solvents, apart from the ethylic and isopropyl alcohol. The $V_{\max}$ and K_m values were respectively, 0,102mmol/min.g and 14.62mmol, determined by the Lineweaver-Burk method. The best results for the production of isopropyl laurate were obtained for ITP-001 at 52.5°C and by LCR at 62.5°C. The highest conversion of lauric acid was at 3000mM for free ITP-001 and for free and immobilized LCR, and 2340mM for immobilized ITP-001. The percentage enzyme mass offered was of 0.75% (m/m) for free lipase and 5.25% (m/m) for immobilized. The operational stability of immobilized ITP-001, in the esterification of the lauric acid activity with isopropyl alcohol was low after the second use. In the transesterification reaction the optimum condition was achieved with 500U of free LCR that reached 32,68% of conversion at the molar ratio of 1:18 (soy oil: ethanol), at 40°C after 120h. As for the influence of hexane solvent in the reaction medium with the free LCR achieving 61.9; 21.4; 0.0 e 16.73%, mono-, di-, triglycerides and esters ethylic, respectively. A gain in the residual activity was noticed for the free enzymes after submitted to the supercritical fluid and used in hydrolysis and esterification. In the form of immobilized the LCR reached an esterification activity gain superior to 100%.

Key-words: immobilized lipase, esterification, transesterification, supercritical fluid.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 .OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. ENZIMAS	4
3.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	13
3.2.1. Métodos de Imobilização de Enzimas.....	14
3.3. APLICAÇÃO INDUSTRIAL.....	19
3.4. PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS (BIODIESEL) E EMULSIFICANTES	22
3.4.1. Meio Reacional Não Convencional:Fluido Supercrítico	29
4. METODOLOGIA	33
4.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	33
4.1.1. Enzima	33
4.1.2. Micro-organismo	33
4.1.3. Produção e Purificação da Lipase de <i>Bacillus sp. ITP-001</i>	34
4.1.4.. Imobilização em Matrizes Hidrofóbicas pela Técnica Sol-Gel.....	35
4.1.5. Obtenção de Ésteres Etílicos e Emulsificantes	36
4.1.6. Atividade Enzimática da Lipase em Fluidos Supercríticos.....	37
4.2 METODOLOGIA ANALÍTICA	38
4.2.1. Atividade de Hidrólise	38
4.2.2. Recuperação de Atividade	39
4.2.3. Caracterização da Lipase de <i>Bacillus sp. ITP-001</i> Imobilizada.....	39
4.2.4. Atividade de Esterificação	41
4.2.5. Parâmetros Reacionais de Esterificação	41
4.2.6. Análise Cromatográfica.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 RECUPERAÇÃO DE ATIVIDADE	48
5.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA LIPASE IMOBILIZADA.....	48
5.2.1. Efeito do pH e Temperatura	49
5.2.2. Estabilidade Térmica	51
5.2.3. Parâmetros Cinéticos	52
5.2.4. Influência de Íons e Solventes Orgânicos	53
5.3 PRODUÇÃO DE EMULSIFICANTES A PARTIR DA LIPASE	56
5.3.1.Procedimento ExperimentalUnivariável para Lipase de <i>Bacillus sp. ITP-001</i> Livre e Imobilizada.....	56
5.3.1.1. Efeito da Temperatura	56
5.3.1.2. Efeito da Concentração de Ácido	58
5.3.1.3. Efeito de Massa de Enzima.....	59
5.3.1.4. Estabilidade Operacional da Lipase Imobilizada.....	61
5.3.2. Planejamento Experimental Fatorial para Lipase de <i>Candida rugosa</i> Livre e Imobilizada.....	62
5.4 PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS.....	64
5.5 ESTABILIDADE EM SUPERCRTICO.....	67
5.5.1. Estabilidade da Lipase de <i>Bacillus sp. ITP-001</i> e de <i>Candida rugosa</i> Livre	68
5.5.2. Estabilidade da Lipase de <i>Bacillus sp. ITP-001</i> e de <i>Candida rugosa</i> Imobilizada	72
6. CONCLUSÃO	75
7. TRABALHOS FUTUROS.....	77
8. LISTA DE DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS	78
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	80
ANEXO	95

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1. Reações catalisadas pela lipase (PAQUES e MACEDO, 2006).....	8
FIGURA 3.2. Diagrama de fitas da lipase de <i>Candida rugosa</i> (a) e da <i>BACILLUS</i> sp. (b) (GUNCHEVA e HIRYAKOVA, 2011; CYGLER e SCHRAG, 1999).	9
FIGURA 3.3. Mecanismo de ação enzimática segundo o modelo “chave-fechadura” (a) e a teoria do encaixe induzido (b) (MARTINS, 2006).	10
FIGURA 3.4. Mecanismo cinético de ping-pong bi-bi para uma reação enzimática (PAIVA et al., 2000).	11
FIGURA 3.5. Classificação dos métodos de imobilização (ZANIN e MORAES, 2004)..	14
FIGURA 3.6. Característica física e composição química da lipase imobilizada em matriz sol-gel (adaptado de REETZ et al., 1996)..	17
FIGURA 3.7. Reação química do sol-gel (PAULA et al., 2008).....	18
FIGURA 3.8. Evolução de artigos e patentes sobre biocatálise (a,b) e a razão anual no brasil e no mundo (c) (adaptado de QUINTELLA et al., 2009).....	21
FIGURA 3.9. Esquema da transesterificação de um triglicerídeo para produção de biodiesel (SUAREZ et al., 2007).....	23
FIGURA 3.10. Esquema da transesterificação detalhado para produção de biodiesel (a) e o perfil cinético da transesterificação metílica de um triglicerídeo (b) (SUAREZ et al., 2007).....	23
FIGURA 3.11. Esquema da esterificação (MARKLEY, 1961).....	28
FIGURA 4.1. Aspecto do <i>BACILLUS</i> sp. ITP-001 obtida em microscopia de varredura eletrônica. .	34
FIGURA 4.2. Fluxograma da produção de ésteres etílicos usando lipases.....	36
FIGURA 4.3. Diagrama esquemático da unidade de testes de atividade enzimática em fluidos supercríticos.....	37
FIGURA 5.1. Efeito do pH na atividade hidrolítica da lipase de <i>BACILLUS</i> sp. ITP-001 imobilizada (■) nesse estudo e livre (○) conforme Barbosa et al. (2010).....	49
FIGURA 5.2. Efeito da temperatura na atividade hidrolítica da lipase de <i>BACILLUS</i> sp. ITP-001 imobilizada (■) nesse estudo e livre (○) conforme Barbosa et al. (2010).....	50
FIGURA 5.3. Estabilidade enzimática da lipase de <i>BACILLUS</i> sp. ITP-001 imobilizada em função da temperatura, em pH 5, tempo reacional de 10min, à 37°C.....	51
FIGURA 5.4. Comparação dos dados experimentais com modelos cinéticos de Lineaweaver-Burk e o não-linear na reação de hidrólise do azeite de oliva em pH 5 e 37°C.....	53
FIGURA 5.5. Influência dos íons na atividade hidrolítica da lipase de <i>BACILLUS</i> sp. ITP-001 imobilizada, pH 5 e 37°C	54

FIGURA 5.6. Influência dos solventes na atividade hidrolítica da lipase de <i>BACILLUS</i> sp. ITP-001 imobilizada, pH 5 e 37°C.	55
FIGURA 5.7. Efeito da temperatura sobre a atividade de esterificação da lipase de <i>BACILLUS</i> sp. ITP-001 livre (●) com massa de enzima de 0,75% (m/m) e imobilizada (○) com massa de enzima de 5,25% (m/m) e razão molar de 1:3 (álcool:ácido) ou 3000mM de ácido láurico..	57
FIGURA 5.8. Efeito da concentração de ácido na atividade de esterificação da lipase de <i>BACILLUS</i> sp. ITP-001 livre (●) com massa de enzima de 0,75% (m/m) e imobilizada (○) com massa de enzima de 5,25% (m/m), à 52,5°C	59
FIGURA 5.9. Efeito do percentual da massa da lipase de <i>BACILLUS</i> sp. ITP-001 livre para reação de esterificação com razão molar de 1:3 (álcool:ácido) ou 3000mM de ácido láurico, à 52,5°C (a) e imobilizada para reação de esterificação com razão molar de 1:2,34 (álcool:ácido) ou 2340mM de ácido láurico, à 52,5°C 2340mM (B).....	59
FIGURA 5.10. Superfície de resposta para a produção de laurato de isopropila utilizando lipase de <i>Candida rugosa</i> livre (a) e imobilizada (b).....	63
FIGURA 5.11. Conversão em ésteres etílicos utilizando a lipase de <i>Candida rugosa</i> livre, 96h, 40°C, sem solvente.	65
FIGURA 5.12. Conversão em ésteres etílicos utilizando a lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada, 120h, 40°C, sem solvente.....	65
FIGURA 5.13. Conversão em ésteres etílicos utilizando LCR livre (a) e imobilizada (b), 96h, 40°C, na presença de terc-butanol.....	66
FIGURA 5.14. Perda ou ganho da atividade de hidrólise da lipase de <i>BACILLUS</i> sp. ITP-001 livre depois de submetida ao propano supercrítico.	68
FIGURA 5.15. Perda ou ganho da atividade de hidrólise da lipase de <i>Candida rugosa</i> livre depois de submetida ao propano supercrítico.....	69
FIGURA 5.16. Perda ou ganho da atividade de esterificação da lipase de <i>BACILLUS</i> sp. ITP-001 livre depois de submetida ao propano supercrítico.....	70
FIGURA 5.17 Perda ou ganho da atividade de esterificação da lipase de <i>Candida rugosa</i> livre depois de submetida ao propano supercrítico.....	71
FIGURA 5.18. Perda ou ganho da atividade de hidrólise (○) e esterificação (■) para lipase de <i>BACILLUS</i> sp. ITP-001 imobilizada, depois de submetido a propano supercrítico (60°C E 200bar).....	73
FIGURA 5.19. Perda ou ganho da atividade de hidrólise (○) e esterificação (■) para lipase imobilizada de <i>Candida rugosa</i> , depois de submetido a propano supercrítico (45°C E 200bar).....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1. Micro-organismos produtores de lipases e suas respectivas empresas comercializadoras (JAEGER e REETZ, 1998).....	3
TABELA 3.2. Comparação de atividade hidrolítica (SOARES et al., 2006).	19
TABELA 3.3. Distribuição de ácidos graxos nos principais óleos e gorduras utilizados para produção de biodiesel (RINALDI et al., 2007).	25
TABELA 3.4. Estudos da produção de biodiesel utilizando lipase livre e imobilizada.....	27
TABELA 3.5. Fluidos frequentemente utilizados, temperatura e pressão crítica (ILLANES, 1994)...	31
TABELA 4.1. Composição do meio de cultura	34
TABELA 4.2. Condições de pressão e temperatura utilizadas para testes de estabilidade.....	37
TABELA 4.3. Matriz de planejamento de experimento para avaliação da temperatura e massa de enzima da enzima lipase de <i>Candida rugosa</i> livre e imobilizada (níveis e valores reais).....	43
TABELA 4.4. Condições para dosagem dos ésteres de etila produzidos a partir da reação de transesterificação utilizando enzima em cromatografia gasosa.....	44
TABELA 5.1. Disposição geral dos ensaios realizados.....	47
TABELA 5.2. Recuperação de atividade da lipase de <i>BACILLUS</i> sp. ITP-001 e <i>Candida rugosa</i> imobilizada em matriz hidrofóbica obtidas pela técnica sol-gel.....	48
TABELA 5.3. Parâmetros cinéticos (V_{MAX} e K_M) e erros calculados (P e SE).....	52
TABELA 5.4. Estabilidade operacional da enzima imobilizada na reação de esterificação de 3000mM de ácido láurico com álcool isopropílico e massa de lipase de <i>BACILLUS</i> sp. ITP-001 de 5,25% (M/M), em 10min, à 52,5°C.....	61
TABELA 5.5. Matriz de planejamento de experimento e conversão do ácido láurico pela lipase de <i>Candida rugosa</i> livre e imobilizada.....	63
TABELA 5.6. Estimativa de efeito na produção de laurato isopropílico a partir da conversão de ácido láurico usando lipase livre e imobilizada	64
TABELA 5.7. Produção de ésteres, mono, di e triglicerídeos utilizando LCR.	67

LISTA DE SIGLAS

(NFA)⁰: Quantidade inicial de ácidos graxos (mmol)
(Xac)_t: Conversão de ácidos graxos em um determinado tempo
μL: Microlitro
A e B: Reagentes
ABS: Albumina
Ac: Ácido
Acil-E: Enzima acilada
AE: Atividade enzimática
AEE: Atividade enzimática específica
Água Milli-Q: Água deionizada
Al: Álcool
C₀: Concentração inicial do ácido
C_t: Concentração final do ácido em um determinado tempo
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência
CO₂: Dióxido de carbono
EA e EB: Complexos enzima-substrato
E_A: Energia de ativação
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
Es: Éster;
EtOH: Etanol
F: sentido direto (hidrólise) das reações,
FES: Fermentação em estado sólido
FID: Detector de ionização de chama
FS: Fermentação submersa
FSC: Fluido supercrítico
GLR: Modelo de graus de liberdade
h: Hora
HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência
Ile: Isoleucina
K_{eq}: constante de equilíbrio
K_{i,Es} e **K_{i,Ac}**: constantes de inibição
K_{m,Ac}; **K_{m,Es}**; **K_{m,W}**; **K_{m,Al}**: constantes de Michaelis-Menten
K_{m,Es}[W]/(K_{m,W} + [W]): constante de Michaelis-Menten aparente

K_m: Constante de Michaelis Menten
LCR: Lipase de *Candida rugosa*
LPP: Lipase pancreática de porco
m/m: Massa de soluto por massa da solução
Met: Metionina
m_{exp}: Unidades experimentais
min: minuto
mL: Mililitro
mM: milimol
MPa: Megapascal
mPa: Milipascal
m_{pre}: Unidades previstas
MTMS: metiltrimetoxissilano
N: Normalidade
N: Número de observações
°C: Graus Celsius
P e Q: Produtos
p: significância estatística
P: Erro médio relativo
P: Produtividade
P_c: Pressão crítica
PDMS: Propildimetoxissilano
PEG: Polietilenoglicol
pH: Potencial de hidrogênio iônico
PTMS: propiltrimetoxissilano
PVA: Álcool polivinílico
r: Coeficiente de correlação
r: Sentido reverso (síntese) das reações
R: Rendimento por grama de catalisador oferecido
RA: Recuperação de atividade
rpm: Rotação por minuto
RV: Razão volumétrica
SAB: Sistema aquoso bifásico
SE : Erro médio relativo e estimado
STY-DVB: Mesoporo estireno-divinilbenzeno
T_c: Temperatura crítica

TMOS: tetrametoxissilano

U: Unidade de atividade

U_o: Unidade de atividade lipolítica oferecidas para imobilização

U_s: Unidade de atividade lipolítica presente no suporte imobilizado

UV: Radiação ultravioleta

v/v: Volume de soluto por volume da solução

V_{max,f} e V_{max,r}: parâmetros globais relativos às velocidades máximas

V_{max,f}[W]/(K_{m,W} + [W]): velocidade máxima aparente da reação no sentido direto (hidrólise)

V_{max}: Velocidade máxima da reação

w: água

w₀: Massa total de biocatalisador oferecida

Y: Valores observados experimentalmente

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

O uso de enzimas como catalisadores nos processos industriais é de fundamental importância para obtenção de produtos derivados da tecnologia limpa. Este fato está em sintonia com as demandas de caráter tecnológico, de mercado e preservação ambiental, que norteiam os processos produtivos internacionais. Os processos de bioconversão enzimática têm sido bastante utilizados na produção, transformação e valorização de matérias-primas na biotecnologia.

As enzimas de origem microbiana produzidas por fermentação possuem diversas vantagens quando aplicadas industrialmente, destacando-se fácil produção em escala, atuação em condições suaves (temperaturas próximas à ambiente, pH neutro e meio aquoso), grande afinidade por diferentes substratos, catalisa diferentes reações, versátil quanto às características do meio reacional (aquoso, orgânico ou supercrítico), atividade elevada em meio reacional livre de solventes e disponibilidade comercial, tornando-se alternativa de processos de biotransformação viáveis para as sínteses químicas (DEMIR e TÜKEL, 2010).

Portanto, diversos estudos são realizados no sentido de aprimorar e avaliar o potencial catalítico de enzimas, dentre eles os processos de produção de lipase, purificação, imobilização de enzima, estudos cinéticos, estabilidade enzimática e meio reacional. Desta forma, faz-se necessário a utilização de enzimas na forma imobilizada visando melhorar os processos enzimáticos pela facilidade de recuperação do biocatalisador e produtos, possibilidade de operações contínuas, prevenção da formação de agregados em meio orgânico, minimização de efeitos desnaturantes e maior proteção, manutenção de micro-ambiente com alta atividade de água, alteração favorável das suas propriedades enzimáticas (como atividade e termoestabilidade) e redução de custos (GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011; GUIBAN *et al.*, 2006).

Dentre as técnicas de imobilização de enzimas, o encapsulamento obtido pela técnica sol gel tem sido bastante explorada e é indiscutivelmente a técnica mais utilizada para preparo de uma matriz híbrida, na qual a enzima fica retida no interior da matriz formando um

reticulado tridimensional (gel), podendo estar localizada na superfície do suporte, no seu interstício e totalmente encapsulada, de forma a torná-las insolúveis em água (KIM *et al.*, 2006; JOSE e PRADO, 2005; SOARES *et al.*, 2004).

Enzimas livres e imobilizadas podem ser utilizadas em meios reacionais convencionais e não convencionais. A aplicação dos meios não convencionais como fluidos supercríticos (FSC), tem crescido aceleradamente visando resultados que forneçam a estabilidade e/ou aumento da atividade enzimática (KNEZ, 2009; EISENMENGER e CORCUERA, 2009).

As enzimas lipolíticas são atrativas devido à sua capacidade de conversão em diversos meios reacionais. Além da hidrólise, a lipase catalisa a reação de transesterificação enzimática que tem despertado crescente interesse sobre o potencial de utilização dos bicomcombustíveis como substitutos dos combustíveis derivados do petróleo, apresentando grandes vantagens como biodegradabilidade e diminuição da emissão de poluentes. As condições de reações de transesterificação enzimática quando comparadas com as de síntese química são muito mais amenas e seletivas, além do potencial existente nas diversas fontes vegetais no Brasil para a produção do biodiesel, as quais são consideradas aptas para o desenvolvimento econômico e sustentável (DABDOUB *et al.*, 2009; AKOH *et al.*, 2007; SUAREZ *et al.*, 2007). A aplicação da lipase a reação de esterificação que forma ésteres, a partir de um álcool e ácido carboxílico, é promissora na produção de ésteres de interesse comercial na área de solventes, diluentes, plastificantes, surfactantes, indústria farmacêutica, herbicidas e pesticidas (TREICHEL *et al.*, 2010; JOSEPH *et al.*, 2008).

A fim de ampliar a aplicação das lipases, há alguns problemas que precisam ser resolvidos a respeito da atividade catalítica favorável e do equilíbrio termodinâmico, sendo assim, diversos estudos para caracterização bioquímica são desenvolvidos para melhorar o desempenho das enzimas em meios reacionais, como o estudo das condições de pH, temperatura e influência da presença de compostos químicos, razão molar de reagentes, massa de enzimas e estabilidade na presença de fluidos supercríticos.

Com base no desenvolvimento de novas técnicas conclui-se a necessidade da proteção do meio ambiente, mediante o uso racional dos recursos naturais, a preservação e a recuperação do meio ambiente e o controle da poluição. Consequentemente, as exigências para que as indústrias operem em condições de desenvolvimento sustentável, química-verde ou química sustentável (*green chemistry*) ou em sistemas de tecnologia limpa, são cada vez mais importantes em várias partes do mundo, e tornam-se um estímulo para a biocatálise.

Capítulo 2

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a produção de ésteres etílicos e emulsificantes utilizando as lipases de *Bacillus* sp. ITP-001 e de *Candida rugosa*, livre e imobilizada em matrizes hidrofóbicas obtidas pela técnica sol-gel.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Imobilização da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 e de *Candida rugosa* em matrizes hidrofóbicas pela técnica sol-gel em condições pré-estabelecidas;
- Caracterização bioquímica da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada na reação de hidrólise;
- Caracterização da reação de esterificação na presença da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 e *Candida rugosa* livre e imobilizada para obtenção de emulsificante;
- Estudo das reações de transesterificação para obtenção de ésteres etílicos;
- Estudo da estabilidade enzimática da lipase em propano supercrítico;
- Determinação da conversão da reação de transesterificação em batelada em termos do teor de ésteres produzidos, mono, di e triglicerídeos.

Capítulo 3

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentado um breve estado da arte referente às enzimas obtidas a partir do processo fermentativo, purificação e imobilização, bem como o uso de biocatalisadores livres e imobilizados para produção de ésteres etílicos e emulsificantes em condições ambientais amenas, além do estudo da estabilidade da lipase na presença de fluido supercrítico, procurando assim, evidenciar a relevância do tema em questão para a literatura.

3.1. ENZIMAS LIPOLÍTICAS

As enzimas estão presentes em todas as células vivas, nas quais exercem a função de biocatalisadores das reações que compõem as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo celular e apresentam funções vitais de controle dos processos de transformação dos nutrientes em energia e material celular. Esses biocatalisadores aceleram as reações químicas e funcionam em soluções aquosas sob condições muito suaves de temperatura e pH, e dependem da força iônica do meio para que não ocorra a desnaturação e perda da sua atividade catalítica (BON *et al.*, 2008; LEHNINGER *et al.*, 2000).

Plantas, animais e micro-organismos são responsáveis pela produção de enzimas. Segundo Neidleman (1991), as enzimas têm sido utilizadas há milhares de anos pelo ser humano de forma direta, pelo emprego de extratos enzimáticos brutos de origem animal ou vegetal, e também de forma indireta pelo aproveitamento da ação de enzimas decorrentes do crescimento microbiano em determinados substratos.

Estima-se que, das milhares de enzimas encontradas na natureza, aproximadamente 2.800 já estão classificadas, e; destas, 400 são comercializadas (FABER, 2004). As enzimas microbianas são mais utilizadas do que as derivadas de plantas ou animais devido à sua grande variedade de atividade catalítica, estabilidade, rendimento, facilidade de manipulação genética, fonte regular sem flutuações sazonais e rápido crescimento dos micro-organismos em meios possivelmente baratos (HASAN *et al.*, 2006).

A partir de 1856, Claude Bernard se interessou por lipases (glicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3) microbianas devido à dificuldade de extração de lipase de animais. As lipases são encontradas em todos os organismos vivos e classificadas como intracelulares ou extracelulares podendo ser obtidas também de micro-organismos, animais ou plantas, e são produzidas com elevados rendimentos quando utilizando bactérias, fungos filamentosos ou leveduras. As lipases microbianas são em geral bastante utilizadas pela indústria, devido às suas propriedades e fácil produção em escala. Os micro-organismos para produção de lipase sofrem influência do tipo de cultura, concentração de fonte de carbono, nitrogênio, pH, temperatura e concentração do oxigênio dissolvido, sendo a fonte de carbono a variável mais importante devido às suas fontes lipídicas (AKOH *et al.*, 2007; SHARMA *et al.*, 2001)

As lipases podem ser produzidas por diversos micro-organismos como as bactérias *Bacillus* sp., *Candida rugosa*, *Candida antartica*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, fungos *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor*, *Geotrichum* sp., e leveduras *Tulopsis* sp. e *Candida* sp. (BON *et al.*, 2008; FERNANDES, 2007; LIU *et al.*, 2006). O aumento de sua comercialização deve-se, dentre outros motivos, ao interesse de muitas indústrias e instituições de pesquisa ou unidades experimentais. A Tabela 3.1 apresenta diversos micro-organismos produtores de enzimas e as respectivas empresas comercializadoras.

Tabela 3.1. Micro-organismos produtores de lipases e suas respectivas empresas comercializadoras (JAEGER e REETZ, 1998).

Micro-organismos produtores	Empresas comercializadoras
<i>Burkholderia cepacia</i>	Fluka, Biocatalysts, Amano, Boehringer Mannheim
<i>Candida antartica</i> A/B	Novozymes, Boehringer Mannheim
<i>Candida rugosa</i>	Amano, Biocatalysts, Sigma, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Asahi, Biocatalysts
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Genencor
<i>Rhizomucor miehei</i>	Amano, Biocatalysts, Novozymes
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Novozymes

A produção de enzimas pode ocorrer por meio de fermentação submersa (FS) onde o substrato é líquido, ou fermentação em estado sólido (FES) onde o substrato contém baixa quantidade de água (DIAZ *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2004 e 2005; SHARMA *et al.*, 2001).

A FES apresenta grande vantagem devido à possível utilização de resíduos agro-industriais como substrato, fornecendo uma alternativa para melhoria e economia na produção. Existem diversas opções de substratos como, por exemplo, resíduo da semente de palma, trigo, bagaço de cana, casca da banana entre outros resíduos com baixo valor agregado, porém apresenta desvantagens como difícil manutenção dos parâmetros e difícil recuperação do produto (KARTHIKEYAN e SIVAKUMARB, 2010; WANG *et al.*, 2009; KRISHNA, 2002; SABU *et al.*, 2005).

Entretanto a FS é mais indicada para crescimento de bactérias e leveduras, onde são frequentemente utilizados os agitadores orbitais. A escolha da forma de cultivo na fermentação submersa se dá devido à maior transferência de oxigênio, que é um fator importante para produção de lipase e maior controle de suas condições quando comparado à fermentação em estado sólido (CARVALHO *et al.*, 2008; COUTO e SANROMAN *et al.*, 2006; TAN, 2003).

O meio de cultura é um fator determinante, pois a sua composição poderá resultar em rendimentos positivos ou negativos em relação à produção da enzima. A fonte de carbono, principal característica do meio de cultura, é derivada de carboidratos, óleos ou gorduras, triacilglicerídios puros, ácidos graxos, glicerol e surfactantes (LI *et al.*, 2004 e 2005). Os óleos vegetais (oliva, soja, girassol, gergelim, semente de algodão, milho e amendoim), quando usados como fonte de carbono, resultam, geralmente, em altos níveis de atividade lipolítica, ao contrário dos óleos animais que inibem a produção de lipases (FEITOSA *et al.*, 2009; BURKERT *et al.*, 2004). Carvalho *et al.* (2008) utilizaram diferentes óleos para a indução da produção de lipase, por fermentação submersa, e identificaram que o óleo de coco apresentou melhores resultados quando utilizado como agente biológico o *Bacillus* sp. ITP-001.

Feitosa (2009) estudou a produção de enzimas lipolíticas de *Bacillus* sp. em fermentação submersa, avaliando o efeito da concentração do indutor (óleo de coco), pH e temperatura, tipo e concentração de surfactante (Tween 80, Triton X-100 e PEG 1500). Na obtenção da enzima lipolítica a concentração de 4% (m/v) do óleo de coco promoveu a maior atividade hidrolítica (3.455U/mL), a faixa entre pH 5,0 e 7,0 e temperaturas entre 30° e 37°C alcançou a maior atividade hidrolítica (4.617U/mL). Dentre os surfactantes utilizados, Tween

80 e Triton X-100 foram os mais efetivos na produção de enzima com a melhor concentração de 1,0% (Triton X-100 de 7.185U/mL e Tween 80 de 6.882U/mL). Esse estudo ressalta que o aperfeiçoamento das condições do meio de cultura são fundamentais para obtenção de uma maior produção de enzimas, tornando-se mais atrativo quando comparado ao estudo realizado por Corzo e Revah (1999), que na produção e caracterização da lipase de *Yarrowia lipolytica*, utilizaram como fonte de carbono 0,5mg/mL de Tween 80, a 34°C e pH 6,0, obtendo uma atividade lipolítica de apenas 7,4U/mL em 48 horas de fermentação.

O bioproduto resultante de uma fermentação pode ser submetido a etapas de separação e purificação para recuperação da biomolécula de interesse em níveis de concentração e pureza desejadas. De acordo com Pessoa Júnior e Kilikian (2005) os produtos da indústria biotecnológica são altamente diversificados, bem como sua localização em relação à célula (intracelular ou extracelular), necessitando assim de purificação. A purificação pode ser dividida em quatro etapas principais: separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo (clarificação); concentração e/ou purificação de baixa resolução (precipitação fracionada com adição de sais ou solventes orgânicos); purificação de alta resolução (cromatografias) e finalmente, operações para acondicionamento final do produto (cristalização e liofilização). O grau de pureza necessário da enzima depende de sua aplicação final e será determinado pelas características físico-químicas, propriedades biológicas, fonte da qual a enzima está sendo purificada e tecnologia de purificação disponível.

Souza *et al.* (2010) realizaram estudos de purificação da enzima lipase pancreática de suíno por meio da extração em SAB, utilizando mistura de um polímero com um sal em solução aquosa, avaliando a influência da massa molecular e concentração de polietilenoglicol (PEG), concentração do fosfato do potássio (KH_2PO_4), cloreto de sódio (NaCl) e a temperatura. A maior purificação foi obtida com PEG 8.000 a 14,5°C, mantendo a concentração de NaCl pois a sua adição não promoveu maior purificação da enzima, demonstrando assim a eficiência do sistema aquoso bifásico para purificação de lipase com o fator de purificação de 3,89, uma vez que estudos como o de Liu *et al.* (2008) alcançaram um fator de purificação de apenas 1,5 de lipase extracelular.

O potencial tecnológico aliado à comercialização e aplicação da lipase devem-se a característica dessa classe de enzima em atuar na interface orgânica-aquosa e sobre a ligação éster de vários compostos, catalisando reações de hidrólise. Além da hidrólise, as lipases também catalisam reações como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolises

e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (Figura 3.1). A atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação e entre os processos químicos de maior interesse industrial estão as reações catalisadas pelas lipases, as quais representam aproximadamente 20% das biotransformações realizadas (TREICHEL *et al.*, 2010; PAQUES e MACEDO, 2006).

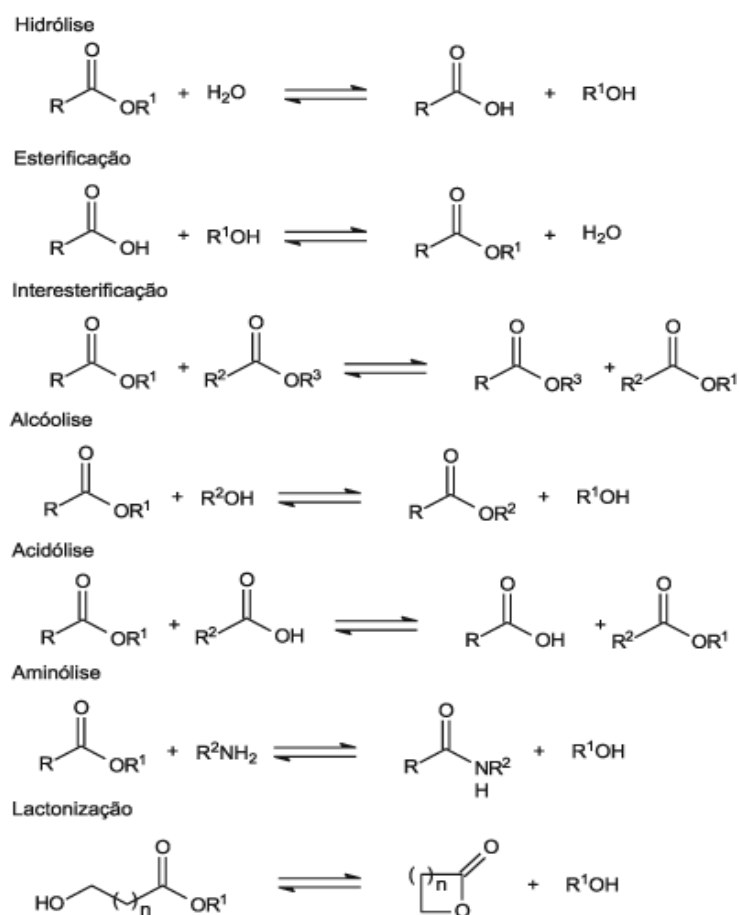


Figura 3.1. Reações catalisadas pela lipase (PAQUES e MACEDO, 2006).

As enzimas apresentam estruturas primária, secundária, terciária ou quaternária. A estrutura primária dessas macromoléculas corresponde à sequência de aminoácidos; a estrutura secundária, por sua vez, tem a presença de cadeias polipeptídicas, as quais adotam configurações espaciais interagindo com aminoácidos e formando arranjos tipo α -hélice ou folha tipo β ; a estrutura terciária resulta das interações entre aminoácidos que provocam torções e dobramentos de regiões das macromoléculas configurando o sítio ativo catalítico da enzima, o que é determinante para sua atividade biológica; a estrutura quaternária refere-se à

interação entre as cadeias polipeptídicas e subunidades distintas e ocorre em algumas enzimas complexas de regulação (BORZANI *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2001). Portanto, para melhor entendimento da ação lipolítica e do fenômeno da ativação interfacial faz-se necessário a descrição da sua estrutura, como mostrado o diagrama de fitas da lipase de *Candida rugosa* e da *Bacillus* sp. na Figura 3.2.

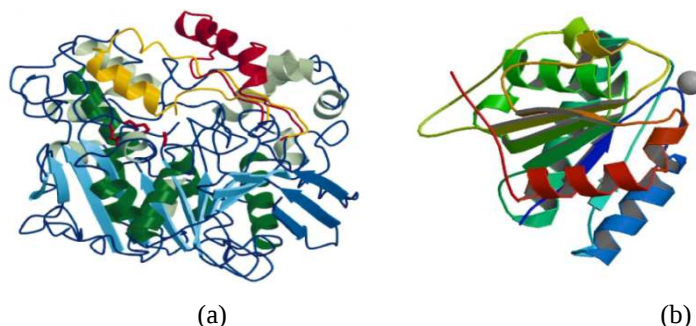


Figura 3.2. Diagrama de fitas da lipase de *Candida rugosa* (a) e da *Bacillus* sp. (b) (GUNCHEVA e HIRYAKOVA, 2011; CYGLER e SCHRAG, 1999).

A lipase de *Candida rugosa* (LCR), Figura 3.2.a, apresenta um sítio ativo formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina. O resíduo nucleofílico serina está localizado no C-terminal da fita $\beta 5$ de um pentapeptídeo altamente conservado, formando uma característica principal “ β em torno de α ”, designada como o canto nucleofílico. O mecanismo de catálise da lipase LCR leva a postular que no sítio ativo da lipase intervêm resíduos de serina, histidina e glutamina (CYGLER e SCHRAG, 1999). A lipase de *Bacillus* sp., Figura 3.2.b, possui conformações gerais de uma proteína, com tríade catalítica também formada por serina, ácido aspártico e histidina e os resíduos de aminoácidos (isoleucina e metionina). Neste caso, após a exposição ao solvente, após do ataque nucleofílico, será produzida a carga negativa sobre o oxigênio e assim estabilizada por meio de ligações de hidrogênio pelos resíduos Ile12 e Met78, que formam o bolsão do oxiânion na lipase *Bacillus* sp. O bolsão oxiânion desta enzima é ativado na presença de solvente, este mecanismo catalítico é diferente de forma geral das diferentes lipases onde a mecânica de formação catalítica é ajustada na etapa de transição da enzima na conformação da tampa aberta ou fechada de acordo com a afinidade ao substrato. E devido a estas informações, sugere-se que lipase *Bacillus* sp. tenha uma estrutura ternária flexível a

qual determina sua propriedade bioquímica (variação de pH e temperatura) (GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011).

De acordo com Jaeger e Eggert (2002) as lipases possuem alta especificidade, estereoespecificidade, regiosseletividade e quimiosseletividade, sendo a carga e características hidrofílicas/hidrofóbicas responsáveis por esta especificidade. Portanto, as atividades podem ser facilmente influenciadas por sua natureza, com propriedades e áreas de interface em que a ativação da enzima por adsorção pode facilitar a chegada ao sítio ativo, que é a superfície da enzima constituída de resíduos de aminoácidos da cadeia protéica e um grupo não-protéico, geralmente complementar à molécula do substrato, sendo então responsável pela atividade biológica da enzima por meio dessa área de “ativação interfacial”.

O sítio ativo é responsável pela alta especificidade da lipase. O modelo mais comum do sítio ativo é o modelo chave fechadura (Figura 3.3.a), proposto por Fischer em 1894, porém necessitou-se explicar a estabilização da enzima nos estados de transição. Sendo assim em 1958, Daniel Koshland modificou o modelo anterior, criando o modelo de encaixe induzido (Figura 3.3.b), que explica a interação do substrato com a enzima pela da reorganização da estrutura da enzima, onde o sítio ativo é induzido a uma alteração conformacional até que o substrato acesse completamente o sítio ativo da enzima e forme o produto (FISCHER, 1894; KOSHLAND, 1958; COPELAND, 2000).

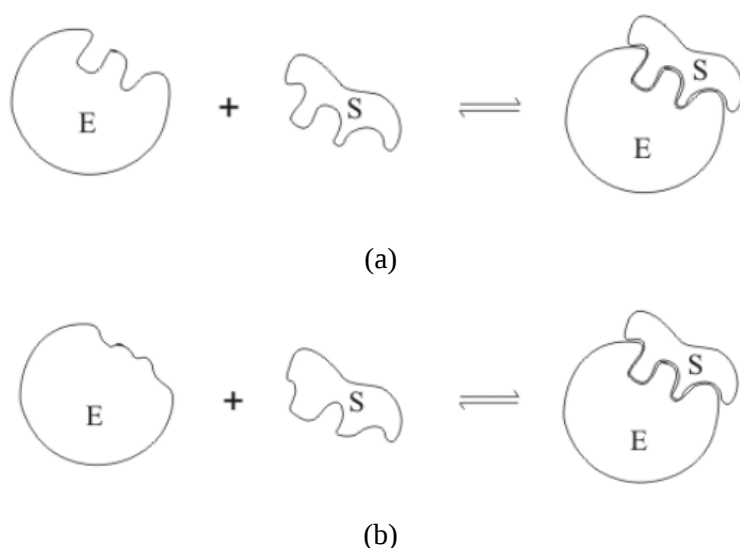


Figura 3.3. Mecanismo de ação enzimática segundo o modelo “chave-fechadura” (a) e a teoria do encaixe induzido (b) (MARTINS, 2006).

O mecanismo cinético da lipase é descrito pelo modelo Ping-pong bi bi., o qual aplica-se aos mecanismos em que um ou mais produtos são liberados da enzima antes que todos os substratos sejam adicionados. Assim, esse mecanismo ocorre conforme descrito na Figura 3.4 onde A e B representam os substratos (reagente), P e Q os produtos, E a enzima, EA e EB complexos enzima substrato formados com os reagentes A e B respectivamente e Acil-E representa a enzima acilada. O grupo a ser transferido é primeiro deslocado do substrato A pela enzima para formar o produto P e uma forma modificada da enzima (EA), isso ocorre devido ao ataque nucleofílico na ligação éster do substrato pelo átomo de oxigênio do grupo hidroxil do resíduo serina do sítio ativo após a abertura da tampa, resultando na formação de complexo enzimático acilado e desprendimento de espécie álcool do substrato original. Em seguida ocorre a transferência de EA para o segundo substrato B, formando-se o produto Q e regenerando-se (E), por meio da hidrólise do complexo enzimático acilado (VOET e VOET, 2004; HEDSTROM, 2002; DAGGETT *et al.*, 1991). Entre as enzimas com este tipo de mecanismo encontram-se algumas oxirredutases, transferases, hidrolases e proteases de serina (KRAUT, 1977).

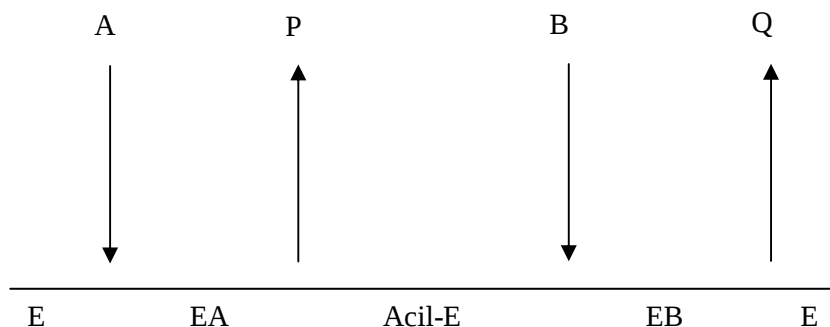


Figura 3.4. Mecanismo cinético de ping-pong bi-bi para uma reação enzimática (PAIVA *et al.*, 2000).

A quantidade de água no meio influencia fortemente na atividade catalítica da enzima, para baixos teores de água, a atividade enzimática é geralmente baixa, a qual aumenta proporcionalmente com a da camada de hidratação da enzima, o que é devido à ação lubrificante, aumentando a flexibilidade interna da enzima. Por outro lado, a diminuição de atividade pode ser devida as limitações à transferência de massa devido ao transporte do substrato pela fase aquosa, ou agregação das partículas de catalisador. (AIRES-BARROS,

2002). Segundo Paiva *et al* (2000) a influência da água no mecanismo ping pong bi bi pode ser descrita pela equação genérica, Equação 3.1., por meio da velocidade de hidrólise gerando um ácido e um álcool a partir de um éster, considerando a inibição pelo substrato e pelo produto. Na presença da água em excesso no meio reacional a equação é simplificada tornando-se semelhante à reação de Michaelis-Menten, conforme descrita na Equação 3.2.

$$r = \frac{v_{\max,f} v_{\max,r} \left([Es][W] - \frac{[Al][Ac]}{K_{eq}} \right)}{\left(v_{\max,r} K_{m,W} [Es] + v_{\max,r} K_{m,Es} [W] + \frac{K_{m,Ac} v_{\max,f}}{K_{eq}} [Al] + \frac{K_{m,Al} v_{\max,f}}{K_{eq}} [Ac] + \right.} \quad (3.1)$$

$$\left. + v_{\max,r} [Es][W] + \frac{K_{m,Ac} v_{\max,f}}{K_{eq} K_{i,Es}} [Es][Al] + \frac{K_{m,Es} v_{\max,r}}{K_{i,Ac}} [W][Ac] + \frac{v_{\max,f}}{K_{eq}} [Al][Ac] \right)$$

Em que: Ac: ácido; Al: álcool; Es: éster; W: água; os subscritos f e r denotam o sentido direto (hidrólise) e reverso (síntese) das reações, respectivamente; e $V_{\max,f}$; $V_{\max,r}$; K_{eq} ; $K_{m,Ac}$; $K_{m,Es}$; $K_{i,Es}$; $K_{m,W}$; $K_{m,Al}$ e $K_{i,Ac}$ são parâmetros globais relativos às velocidades máximas, constante de equilíbrio, constantes de Michaelis-Menten e constantes de inibição, respectivamente, que podem ser ajustados independentemente a partir de dados de concentração de produtos e reagentes.

$$r = \frac{v_{\max,aparente} [Es]}{K_{m,aparente} + [Es]} \quad (3.2)$$

Em que: $V_{\max,aparente}$ definida como $V_{\max,f}[W]/(K_{m,W} + [W])$ denota a velocidade máxima aparente da reação no sentido direto (hidrólise) e $K_{m,aparente}$ definido como $K_{m,Es}[W]/(K_{m,W} + [W])$ denota uma constante de Michaelis-Menten aparente.

O estudo dos parâmetros reacionais para síntese enzimática como, por exemplo, pH, pressão e temperatura têm contribuído para melhor entendimento do mecanismo de reações enzimáticas, processos de desdobramento de proteínas e moleculares, determinantes da estabilidade em condições extremas. A temperatura é uma das variáveis mais relevantes em qualquer sistema biológico e no caso dos processos enzimáticos, a variação da temperatura

pode causar impacto não só na atividade enzimática, mas também na estabilidade da enzima (RATHI *et al.*, 2000).

A elevação da temperatura acima da condição ótima da enzima, além de aumentar a velocidade da reação pode promover a inativação da enzima. Este fato provavelmente ocorre porque na presença de água e alta temperatura, a mobilidade das moléculas aumentam e isso causa a instabilidade na enzima e possível desnaturação. A inativação térmica de enzimas pode ser também consequência do enfraquecimento das forças intermoleculares responsáveis pela preservação de suas três dimensões levando a uma redução na sua capacidade catalítica (DALAL *et al.*, 2008; MISSET, 1993). A inativação pode envolver a interrupção da ligação covalente ou não covalente molecular, com subsequente agregação ou dobramento. Um dos requisitos para avaliar as condições do processo enzimático é o conhecimento sobre cinética para avaliar corretamente o desempenho da enzima e encontrar os parâmetros ideais do processo (BOMMARIUS e BROERING, 2005).

Portanto, diversos estudos são feitos no sentido de melhorar os processos de produção de lipase e tornar o seu uso atrativo para biotransformações, como por exemplo, desenvolvimentos recentes em enzimologia, principalmente engenharia de proteínas e reações enzimáticas em meios não-aquosos, imobilização de enzimas, estudos cinéticos e avaliação da estabilidade enzimática e desenvolvimento de biorreatores.

3.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

As enzimas livres têm sido utilizadas por séculos nas indústrias, porém a sua valorização torna a aplicação industrial inviável. Para que a biotransformação possa competir com a produção química, alguns pontos de natureza técnica devem ser considerados, como por exemplo, a possibilidade de desnaturação da enzima livre, durante o uso ou estocagem, por fatores químicos, físicos ou biológicos, o que torna necessário a proteção da enzima contra ataques de solventes durante a reação de catálise. Com esse intuito recentes avanços em nanotecnologia resultam em materiais nanoestruturados acessíveis a uma ampla gama de aplicações na biocatálise e novas técnicas de imobilização são desenvolvidas para fornecer a estabilidade da enzima e facilitar a sua recuperação e reutilização sem perda significativa da sua atividade (KIM *et al.*, 2006; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

3.2.1. Métodos de Imobilização de Enzimas

Na literatura especializada existem diversas formas de classificação dos métodos de imobilização de enzimas, o que pode ser resultado também pela combinação de métodos básicos, dentre eles os métodos baseados no tipo de interação responsável pela imobilização: métodos químicos envolvendo a formação de, no mínimo, uma ligação covalente entre os resíduos terminais de uma enzima e um grupo funcional do suporte, ou entre duas ou mais moléculas de enzima; métodos físicos que envolvem as forças físicas como adsorção, interações eletrostáticas; a encapsulação ou microencapsulação em matrizes poliméricas; a natureza do suporte: porosos ou não-porosos, orgânicos ou inorgânicos (BON *et al.*, 2008; ZANIN e MORAES, 2004; ZABORSKI 1973). Na Figura 3.5 apresenta-se a classificação dos métodos de imobilização proposta por Kennedy e Roig (1995) que combina a natureza da interação responsável pela imobilização e o tipo de suporte utilizado.

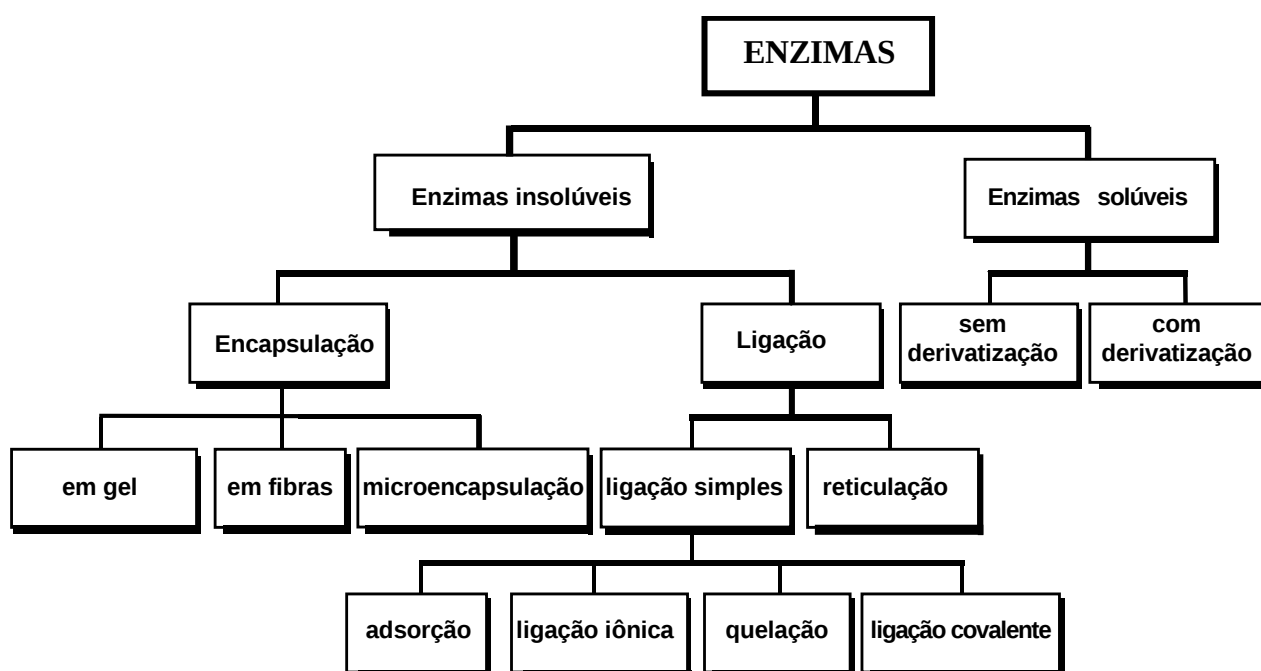


Figura 3.5. Classificação dos métodos de imobilização (ZANIN e MORAES, 2004).

As nanopartículas enzimáticas, moléculas de enzima cercada por uma rede de escala nanométrica, resulta em estabilização da atividade enzimática proporcionando um sistema imobilizado estável para diversas aplicações, tais como bioconversão, biorremediação, e

biossensores (KIM *et al.*, 2006). De acordo com Villeneuve *et al.* (2000) a afinidade do suporte com a água também é fundamental, pois em suportes hidrofóbicos a quantidade de enzimas adsorvidas é maior, preservando assim a sua atividade. Já os suportes hidrofílicos tendem a concorrer com a enzima durante a reação. Portanto, a imobilização de lipase em suportes adequados se constitui numa área de interesse e em constante desenvolvimento. O suporte será considerado ideal se fixar a enzima de maneira irreversível enquanto utilizado, sem afetar sua atividade e sem interferir na reação onde esteja sendo aplicado (MALCATA *et al.*, 1990).

A adsorção física pode ser definida como o enriquecimento de um ou mais componentes em uma camada interfacial, por meio da fisissorção (na qual não há formação da ligação química) ou da quimissorção (na qual há formação da ligação química), isto pode ocorrer de acordo com as forças que unem as espécies envolvidas nessa camada. Assim esse processo ocorre quando o adsorbato se fixa a uma superfície com função adsorvente. Diferentes tipos de interações são responsáveis pelas ligações que mantêm junto o adsorvente e o adsorbato (ARAKAKI e AIROLDI, 1999). Essa é uma técnica simples e antiga, na qual a atração da enzima pelo suporte é feita por meio das forças de van der Waals permitindo, durante o seu uso, a adsorção. A adsorção da enzima ao suporte pode também ser realizada por meio de procedimentos diversos, tais como: estático, eletrodeposição, processo reator-carga, mistura ou agitação da carga. Dessas técnicas, a mais frequentemente empregada em escala de laboratório, é a mistura ou agitação da carga. Para esse método são utilizados suportes como alumina, carvão ativo, argila, terra, colágeno (AQUARONE *et al.*, 2001). Segundo Balcão *et al.* (1996), esse procedimento é o mais simples e menos oneroso.

A imobilização por ligação covalente baseia-se na formação de uma ligação forte entre a enzima e o suporte, é o método mais difundido, estudado e mais complexo devido à utilização de condições brandas, porém neste método a enzima imobilizada é estável. Os materiais utilizados comumente para imobilização são: cerâmica, vidro, cívica e metais. Na técnica de ligação iônica a atração da enzima é pelo suporte sólido com íons residuais. A interação íon-íon é mais forte do que as forças de van der Walls, porém mais fracas que a ligação covalente (FERNANDES e CABRAL, 2006).

O método de quelação resulta em uma enzima imobilizada na superfície do suporte com metais de transição formando um quelato entre a enzima e o suporte. O método apesar de simples possui baixa estabilidade operacional quando em presença de substratos de alta massa

molecular. Os principais suportes utilizados no método de quelação são: vidro, quitina, celite, gelatina e celulose (BON *et al.*, 2008).

A reticulação ou cross-linking é a imobilização por ligação cruzada que ocorre pela ligação entre as moléculas por meio de um reagente bifuncional ligando os grupos não envolvidos na catálise e com concentração suficiente para a imobilização, como por exemplo, o glutaraldeído (FERNANDES e CABRAL, 2006). Kiliça *et al.* (2002) imobilizaram a lipase pancreática de porco (LPP) em matriz obtida por ligações cruzadas entre o álcool polivinílico (PVA) e o dicloreto de adipoila e utilizaram este sistema no estudo da reação de hidrólise da tributirina. Foram avaliados parâmetros, como: atividade da enzima (em diferentes valores de pH e temperaturas) e estabilidade (térmica, operacional e estocagem). Foi verificado que a atividade específica original da lipase foi mantida em 63%. Porém, o pH ótimo foi modificado de 8,5 para 9,0 e a temperatura de 30 para 37°C após a imobilização.

A imobilização no interior de fibras pode ser realizada pela dissolução de um polímero como o acetato de celulose em um solvente orgânico e imiscível em água seguida da emulsificação da solução com enzima logo após adiciona-se a solução em um líquido coagulante que precipita o polímero na forma de filamentos contendo enzimas em micro gotas (FERNANDES e CABRAL, 2006).

O microencapsulamento é um tipo de imobilização versátil, pois permite a inclusão no mesmo sistema de várias enzimas, bem como de cofatores desde que estes estejam ligados a polímeros hidrossolúveis. A imobilização ocorre em micro cápsulas formadas por membranas poliméricas permeáveis a substâncias de baixa massa molar e impermeáveis à enzima (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Um dos métodos mais recentes de imobilização é o de encapsulação, a enzima fica localizada dentro de uma matriz polimérica ou membrana, sendo este processo uma mera retenção física da proteína, impedindo o ataque durante a partição do substrato. A encapsulação pode ser subclassificada em: fibras, microencapsulação e encapsulação em gel (WISEMAN, 1995).

Dentre as enzimas mais utilizadas na encapsulação em gel, a lipase imobilizada possui uma ampla utilização comercial. Segundo Jose e Prado (2005) durante muito tempo pouca atenção foi dirigida aos métodos de imobilização. Os métodos tradicionais baseavam-se em maior parte na adsorção em polímeros hidrofóbicos e somente recentemente uma das técnicas mais promissoras tem sido explorada como, por exemplo, a técnica sol-gel, que é a técnica

mais utilizada para preparo de uma matriz híbrida. Na técnica sol-gel a enzima é retida no interior de uma matriz de polímero insolúvel no meio da reação, o biocatalisador é misturado com um fluido precursor do gel seguido de gelificação por polimerização ou precipitação (BON *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2008).

O processamento de tais reações leva ao surgimento de cadeias poliméricas inorgânicas, que interagem entre si, formando um reticulado tridimensional (gel), onde a lipase ou outras enzimas podem estar localizadas na superfície do suporte, no seu interstício e totalmente encapsulada (Figura 3.6), nesta abordagem, poros e canais diferentes são formados variando de 0,1 a 500 nm de tamanho, exigindo assim um processo cuidadoso de otimização para evitar a lixiviação das enzimas (KIM *et al.*, 2006; REETZ *et al.*, 1996). No entanto, uma vez que a lixiviação da enzima é impedida, a técnica sol-gel resulta em uma forma relativamente estável de imobilização de enzimas, uma vez que o bom ajuste da molécula de enzima dentro dos poros sol-gel impede o desdobramento e desnaturação de enzimas encapsuladas. Nesta técnica, os materiais orgânicos parecem estar envolvidos com polímeros coloidais durante a solidificação por resfriamento natural. Estes materiais podem ser os responsáveis pelas características da estrutura superficial do catalisador sólido, como tamanho dos poros e área superficial. A utilização do método sol-gel na encapsulação das enzimas permite a estabilização da estrutura terciária da proteína devido ao aprisionamento pelo gel (SANTOS, 1999).

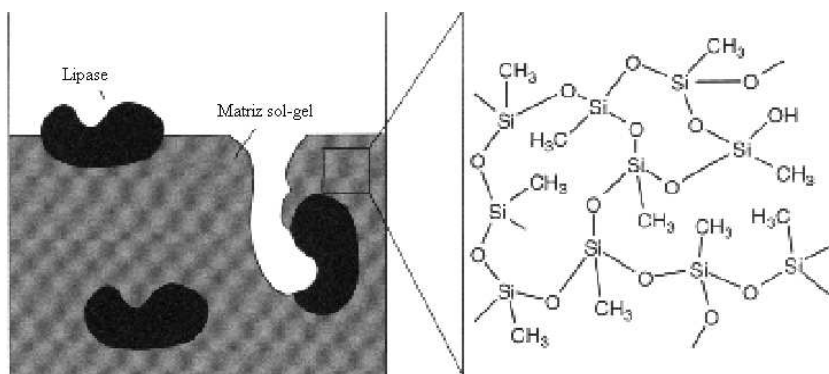


Figura 3.6. Característica física e composição química da lipase imobilizada em matriz sol-gel (adaptado de REETZ *et al.*, 1996).

A Figura 3.7 mostra a reação química do processo sol-gel convencional. A primeira etapa corresponde à hidrólise enquanto a segunda etapa corresponde à policondensação do silano (PAULA *et al.*, 2008).

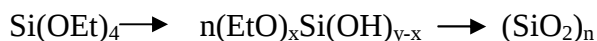


Figura 3.7. Reação química do sol-gel (PAULA *et al.*, 2008).

O processo sol-gel envolve diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, entre outros. Estas variáveis determinam as características finais dos materiais, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação e homogeneidade do produto. Além disso, aditivos químicos podem ser usados para melhorar o processo e obter materiais com melhores propriedades, o que possibilita modificações nas propriedades mecânicas, controle de porosidade e ajuste no balanço hidrofílico/hidrofóbico (PAULA *et al.*, 2008).

No intuito de superar as limitações dos métodos de imobilização, diversas tentativas são feitas para controle das condições do processo, tais como: adição de solventes orgânicos ao substrato e aditivos para aumentar a estabilidade. Além da influência da secagem, resultados surpreendentes com o uso de aditivos (polietilenoglicol – PEG, polivinilálcool – PVA, albumina – ABS, gelatina e outros) no processo de imobilização utilizando a técnica sol-gel (SOARES *et al.*, 2006). Estudos têm apresentado resultados quanto à encapsulação da enzima em sol-géis, onde desenvolveram técnicas semelhantes na preparação de biocatalisadores, envolvendo diferentes precursores (tetrametoxissilano – TMOS, metiltrimetoxissilano – MTMS, propildimetoxissilano – PDMS, propiltrimetoxissilano – PTMS e outros), enzimas, solventes e formas de secagem. Os autores ressaltam diferentes desempenhos dos biocatalisadores imobilizados devido à forma de secagem, no caso da sílica xerogel por evaporação e aerogel em meio supercrítico (REETZ *et al.*, 1996, PIERRE e BUISSON, 2001).

A influência do aditivo PEG foi observada nos resultados obtidos pelo estudo comparativo da atividade hidrolítica da LCR livre e imobilizada pelo método sol gel utilizando o substrato a emulsão de azeite de oliva, no âmbito do mecanismo de Michaelis-Menten, os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Comparação de atividade hidrolítica (SOARES *et al.*, 2006).

Experimento	Atividade Hidrolítica(U/mg)
Lipase livre	152,77
Lipase encapsulada	66,38
Lipase encapsulada na presença de PEG	128,92

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que a lipase *Candida rugosa* imobilizada pela técnica sol-gel na presença do aditivo PEG apresentou atividade hidrolítica similar à enzima livre. No estudo realizado por PAULA *et al.* (2008) foi comparada a eficiência da imobilização de lipase *Candida rugosa* utilizando os métodos de imobilização por adsorção física, ligação covalente e encapsulação, juntamente com o composto híbrido de POS-PVA e solução aquosa de polietilenoglicol. O POS-PVA na imobilização por adsorção física, mostrou atividade hidrolítica média de 480U/mg (96,5% de rendimento de imobilização), para a imobilização em POS-PVA ativado com glutaraldeído a atividade média da imobilização foi de 407U/mg (81,5% de rendimento de imobilização), o que poderia ter resultado esse decréscimo é uma modificação conformacional da enzima durante a fixação ao suporte, alterando a estrutura tridimensional do sítio ativo da enzima, tornando partes da molécula enzimática inacessíveis ao substrato. Para técnica de encapsulação não houve expressão de atividade do sistema resultante, o que pode estar associado à rigidez da estrutura da matriz conferida pelo PVA, que promoveu limitações relacionadas à transferência de massa e impedimento estérico da enzima, devido ao aspecto quebradiço do sistema imobilizado, podendo assim ser uma boa oportunidade para estudos de aditivos e diferentes técnicas para preparação do sistema imobilizado.

3.3. APLICAÇÃO INDUSTRIAL

O uso de enzimas livres ou imobilizadas como catalisadores de processos industriais é de fundamental importância para obtenção de produtos de maior valor agregado em sintonia com as demandas de caráter tecnológico, de mercado e preservação ambiental, que norteiam os processos produtivos internacionalmente (BON *et al.*, 2008; AQUARONE *et al.*, 2001). Devido ao potencial biotecnológico da lipase e facilidade de produção a sua comercialização e

aplicação industrial vem crescendo aceleradamente e tornando-se alternativas viáveis para as sínteses químicas, dentre as principais pode-se citar a indústria de alimentos, bebidas, têxtil, papel e celulose, detergente, medicamentos, bioinseticidas, oleoquímica, farmacêutica, cosméticos e fragrâncias, roupas, couro, tratamento de efluentes e resíduos e produção de etanol e biodiesel. As lipases são consideradas o terceiro maior grupo de enzimas comercializadas, rendendo um negócio de bilhões de dólares (JAEGER e EGGERT, 2002; HASAN *et al.*, 2006).

Os setores de alimentos, bebidas e produtos de limpeza respondem por 80% da demanda de lipase para uso industrial, segundo o estudo feito pela Word Enzimas. A indústria de detergente é o campo que mais utiliza a lipase no seu processo de hidrólise de gordura representando a venda de 1000 toneladas de lipases por ano para esse fim ou cerca de 30% das vendas totais de lipase (BON *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2001).

Devido ao seu poder de hidrólise de gordura as lipases são aplicadas amplamente na indústria oleoquímica resultando assim na redução de gastos com energia e minimização da degradação térmica dos compostos para a produção de óleos comestíveis e gorduras, manteigas e margarinas (HASAN *et al.*, 2006).

As lipases são empregadas na hidrólise de triglicerídeos para obtenção de monoacilglicerídeos como emulsificantes para produção de produtos para pele e cabelo, óleos de banho. Os emulsificantes também representam ésteres de interesse comercial na área de solventes, diluentes, plastificantes, surfactantes, indústria farmacêutica, herbicidas e pesticidas (BON *et al.*, 2008; HASAN *et al.*, 2006). Além da produção de emulsificantes, destaca-se a produção de biodiesel pela síntese de ésteres em ambientes aquo-restritos utilizando lipase (LU *et al.*, 2009; SALIS *et al.*, 2005).

Na literatura mundial o meio acadêmico e o industrial tem reunido esforços na produção de artigos e patentes na área da biocatálise. QUINTELLA *et al.* (2009) avaliaram a evolução e razão anual de artigos e patentes (Figura 3.8) e verificaram uma curva exponencial com padrão de tecnologia emergente, o que indica que a biocatálise constitui uma área ainda competitiva em termos de pesquisa científica e da apropriação do conhecimento por patentes. As Figuras 3.8.a e 3.8.b mostram que o potencial de artigos e patentes brasileiras foi mais expressivo a partir de 2005, quando o Brasil começou a apropriar com mais continuidade o pedido de patentes, mas ainda é pouco e assim é necessário que as agências de fomento brasileira bem como o Estado Brasileiro aumentem o incentivo.

A razão anual entre o número de patentes e de artigos do mundo, Figura 3.8.c, manteve-se baixa de 1998 a 2002. De acordo com Quintella *et al.* (2009) este quinquênio compreendeu a etapa de acúmulo de conhecimento, ainda sem consciência do que poderia e de como deveria ser apropriado sob a forma de patentes. E após este período verificou-se a fase de elevação de depósitos de patentes, correspondendo à maturação da visão de desenvolvimento tecnológico, típica de uma tecnologia emergente e com potencial futuro, sendo ainda reforçada pelo grande interesse internacional em bicomcombustíveis e pelo crescimento da consciência de preservação.

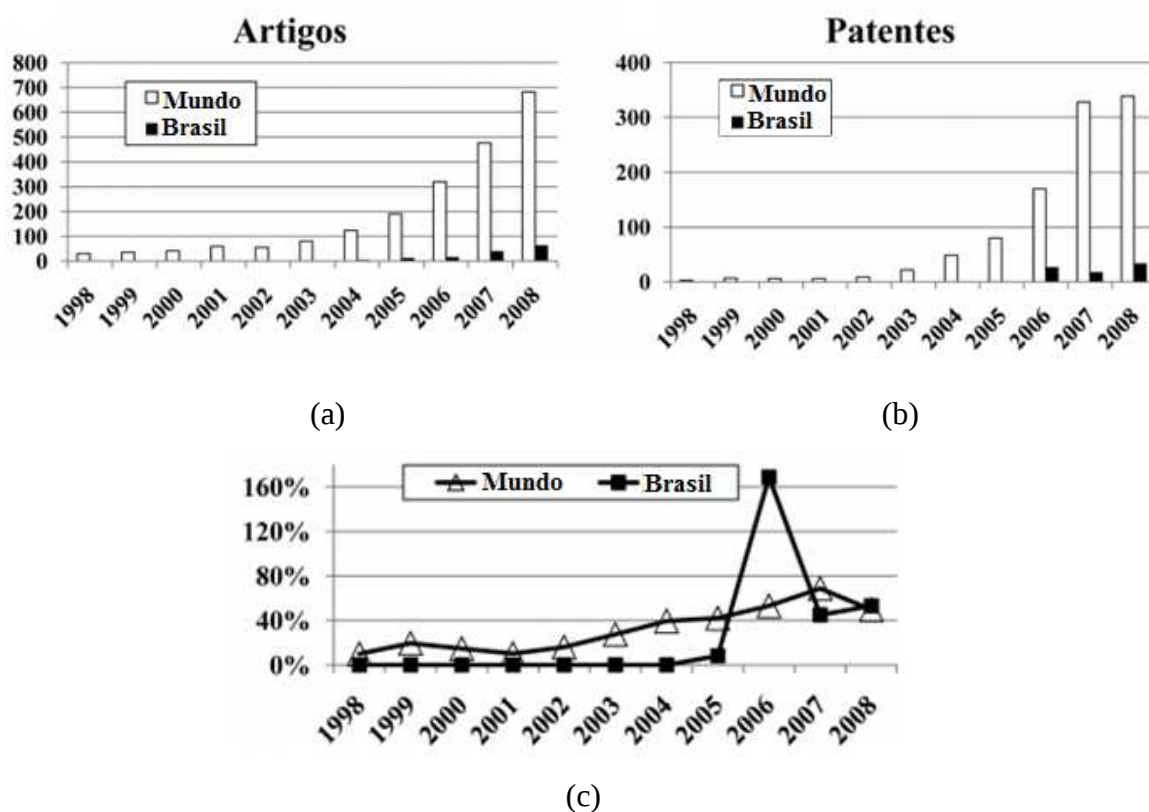


Figura 3.8. Evolução de artigos e patentes sobre biocatálise (a,b) e a razão anual no Brasil e no mundo (c) (adaptado de QUINTELLA *et al.*, 2009).

Na avaliação do percentual de artigos utilizando a biocatálise para produção de biodiesel, tem-se que desde 2000 a participação brasileira tem crescido sensivelmente a cada ano. Desta forma é importante salientar que a participação brasileira neste tema tem se firmado em nível internacional. Entretanto para a viabilização econômica e ambiental da biocatálise, é necessário o reaproveitamento de coprodutos (efluentes e subprodutos), seja

com alto ou baixo custo preparativo, o que requer mais estudos. Além disso, torna-se promissor o desenvolvimento de novas rotas bem como o melhoramento da qualidade, eficiência e relação custo/benefício daquelas já existentes.

3.4. PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS (BIODIESEL) E EMULSIFICANTES

Óleos e gorduras, de origem vegetal ou animal, e seus derivados como combustíveis foram utilizados no século XIX quando Rudolph Diesel, inventor do motor a combustão interna, utilizou em seus ensaios petróleo cru e óleo de amendoim, devido ao baixo custo e alta disponibilidade do petróleo à época. Contudo, o uso direto de óleos vegetais como combustível para motores é problemático devido à sua alta viscosidade, maior densidade e baixa volatilidade e geram vários problemas. Desta forma, a transformação de óleos e gorduras de origem vegetal ou animal em ésteres de alcoóis de cadeia curta tem importância estratégica para o setor energético, pois possibilita a obtenção de um produto, o biodiesel, com características físico-químicas semelhantes ao óleo diesel e a combustão leva a uma redução substancial nas emissões de poluentes (KEGL, 2008; POLAINA e MACABE, 2007).

Para a obtenção do biodiesel pode-se usar diferentes vias, tais como pirólise, microemulsões e transesterificação. Na reação de pirólise, apesar do produto obtido ser quimicamente semelhante ao diesel proveniente do petróleo, a remoção do oxigênio durante o processo térmico elimina parcialmente o benefício ambiental do produto (MA e HANNA, 1999). Na produção por microemulsões o processo tem o objetivo de resolver o problema da viscosidade dos óleos vegetais, mas nem sempre isso ocorre, pois estudos em laboratório demonstram que houve depósito de carbono e aumento da viscosidade do produto (LEUNG e GUO, 2006).

Segundo Suarez *et al.* (2007) a principal tecnologia para obtenção de biodiesel no Brasil e no mundo é a transesterificação (ou alcoólise) alcalina homogênea de óleos e gorduras. A transesterificação é um processo de troca de grupos acila entre moléculas de ésteres e ácidos (acidólise), entre ésteres e outros ésteres (interesterificação) e outros ésteres e alcoóis (alcoólise). O catalisador é adicionado à reação para tornar este processo possível (PINTO *et al.*, 2005). Na transesterificação de diferentes óleos e gorduras, triacilgliceróis reagem com moléculas de álcool de cadeia curta, geralmente metanol ou etanol, e produzem ésteres e glicerol, Figura 3.9.

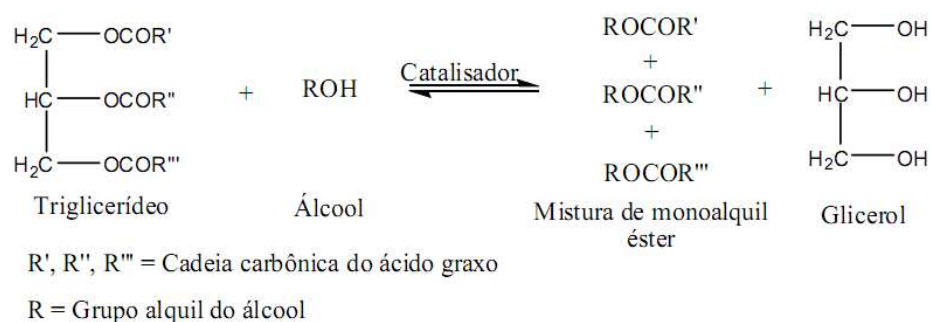


Figura 3.9. Esquema da transesterificação de um triglicerídeo para produção de biodiesel (SUAREZ *et al.*, 2007).

De acordo com Suarez *et al.* (2007) a reação de transesterificação é composta de três reações consecutivas e reversíveis, nas quais são formados diglicerídeos e monoglicerídeos, como pode ser vista na Figura 3.10.

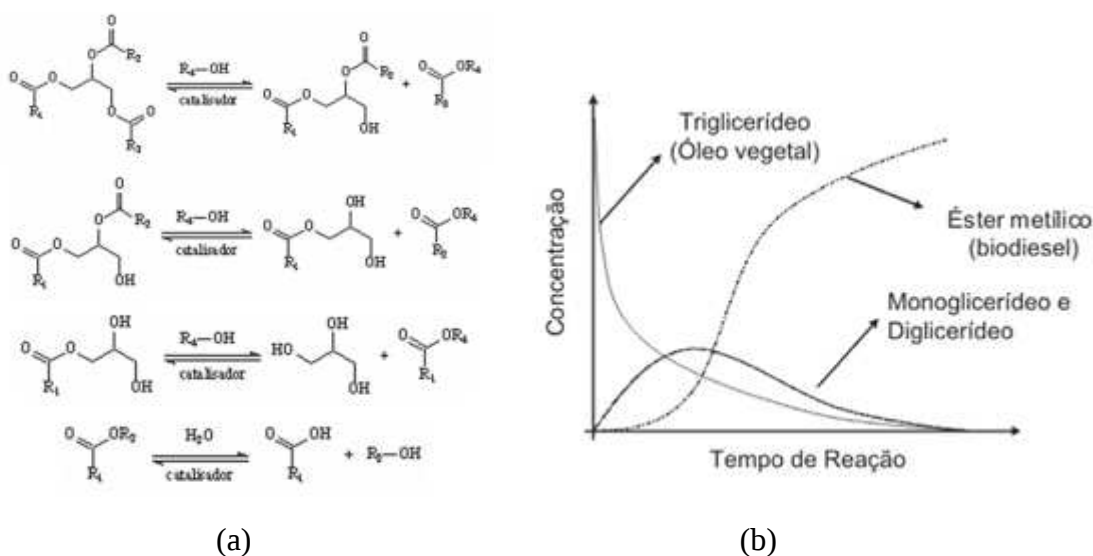


Figura 3.10. Esquema da transesterificação detalhado para produção de biodiesel (a) e o perfil cinético da transesterificação metílica de um triglicerídeo (b) (SUAREZ *et al.*, 2007).

Apesar da estequiometria geral da equação requerer três mol do mono-álcool para cada mol de triglicerídeo, a reversibilidade das três primeiras reações exige um excesso de álcool no meio reacional para promover um aumento no rendimento em monoálcoois e facilitar a recuperação da glicerina. Sabe-se, ainda, que na presença de água é também verificado o

equilíbrio entre os diferentes ésteres e seus respectivos ácidos graxos e alcoóis (glicerina e/ou monoálcoois), conforme Figura 3.10.a. Outro aspecto interessante da transesterificação de óleos vegetais é seu perfil cinético. A transesterificação de triglicerídeos não ocorre em uma única etapa, a conversão do monoglicerídeo em éster metílico ou etílico constitui uma etapa lenta da reação. A Figura 3.10.b ilustra o perfil cinético típico da transesterificação de um triglicerídeo em termos das concentrações de tri-, di-, monoglicerídeos e biodiesel.

As matérias-primas para a produção de biodiesel são: óleos vegetais, gordura animal, óleos e gorduras residuais. Entre as gorduras animais, destacam-se o sebo bovino, os óleos de peixes, o óleo de mocotó, a banha de porco, entre outros. Os óleos e gorduras residuais, resultantes de processamento doméstico, comercial e industrial também podem ser utilizados como matéria-prima (VOET e VOET, 2006).

Tratando-se de óleos vegetais, atualmente conhece-se aproximadamente 350 tipos de leguminosas de óleo identificadas, entre elas acredita-se que o girassol, canola, soja, palma, dendê, mamona, e óleo de amendoim são considerados potenciais como fontes de combustíveis alternativos. Os óleos vegetais são produtos naturais constituídos por uma mistura de ésteres derivados do glicerol (triacilgliceróis ou triglicerídeos), cujos ácidos graxos contêm cadeias de 8 a 24 átomos de carbono com diferentes graus de insaturação, conforme Tabela 3.3 (RINALDI 2007).

É importante ressaltar que vários tipos de óleos, com diferentes composições em ácidos graxos podem ser usados para preparação de monogliceróis, sendo que os mais utilizados apresentam alto teor de óleo na semente das oleaginosas de soja, amendoim, girassol, babaçu, e palma. O óleo de soja apresenta uma composição média centrada em cinco ácidos graxos principais: palmítico (15:0), esteárico (18:0), oléico (18:1), linoléico (18:2) e linolênico (18:3). Estes ácidos graxos, cuja proporção relativa é mantida constante após a reação de transesterificação, compõem mais de 95% do teor de ácidos graxos do óleo e tal característica é relativamente constante para a grande maioria dos óleos comerciais disponíveis no mercado (FERRARI *et al.*, 2005; NETO *et al.*, 2000).

Tabela 3.3. Distribuição de ácidos graxos nos principais óleos e gorduras utilizados para produção de biodiesel (RINALDI *et al.*, 2007).

Óleo ou Gordura	Composição em ácidos graxos (% em massa)						
	Láurico	Mirístico	Palmítico	Estearico	Oléico	Linoléico	Linolênico
	$C_{12}H_{24}O_2$	$C_{14}H_{28}O_2$	$C_{16}H_{32}O_2$	$C_{18}H_{34}O_2$	$C_{18}H_{32}O_2$	$C_{18}H_{30}O_2$	$C_{18}H_{28}O_2$
Algodão	-	1,5	22	5	19	50	-
Amendoim	-	0,5	22	5	19	50	-
Babaçu	44-45	15-166,5	5,8-8,5	2,5-5,5	12-16	1,2-2,8	-
Coco	44-51	13-18,5	7,5-11	1-3	5-8,2	1,0-2,6	-
Dendê	-	0,6-2,4	32-45	4,0-6,3	38-53	6-12	-
Girassol	-	-	3,6-6,5	1,3-3	14-43	44-68	-
Linhaça	-	-	6	4	13-37	5-23	26-58
Milho	-	-	7	3	43	39	-
Oliva	-	1,3	7-16	1,4-3,3	64-84	4-15	-
Soja	-	-	2,3-11	2,4-6	23,5-31	49-51,5	2-10,5
Sebo	-	3-6	25-37	14-29	26-50	1-2,5	-

O Brasil possui em sua geografia grandes vantagens agronômicas, por se situar-se em uma região tropical, com altas taxas de luminosidade e temperaturas médias anuais. Associada a disponibilidade hídrica e regularidade de chuvas, torna-se o país com maior potencial para produção de energia renovável. Portanto, o Brasil possui grande potencial na produção de bicombustíveis com o cultivo de oleaginosas e de cana-de-açúcar. Em algumas regiões, como o Nordeste Brasileiro, podem ser cultivadas algumas oleaginosas como: mamona, amendoim, gergelim, babaçu e outras (PERES *et al.*, 2005).

A distinção dos óleos com base no seu grau de insaturação, no tamanho das moléculas e pela presença ou não de grupos químicos reflete diretamente nas qualidades do bicombustível produzido, sendo de uma forma geral, um biodiesel com predominância de ácidos graxos combinados e mono-insaturados (oléico, ricinoléico) os que apresentam os melhores resultados (SUAREZ *et al.*, 2007).

Para a produção de biodiesel pode-se utilizar diversos alcoóis, segundo Ramos *et al.* (2006) o biodiesel é obtido industrialmente por transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com alcoóis de cadeia curta. No caso do uso do metanol, o biodiesel

resultante é uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos, outros alcoóis como o etanol, iso-propanol podem ser usados. Embora metanol seja o mais barato dos alcoóis, o Brasil e o Estados Unidos são os maiores produtores de etanol no mundo, portanto novos estudos estão sendo realizados com essa matriz energética para produção de biodiesel de ésteres etílicos, apresentando vantagens sobre o metanol por ser totalmente renovável quando originado da cana-de açúcar, baixa toxidez e risco de à segurança, maior número de cetano e um ponto de névoa menor do que o éster metílico (ENCINAR *et al.*, 2002).

A transesterificação dos triacilgliceróis é conduzida em presença de catalisadores em condições que podem ser homogêneas (ácidos ou bases fortes) ou heterogêneas (químicos ou bioquímicos) (DABDOUB *et al.*, 2009; QUINTELLA *et al.*, 2009). Na catálise alcalina, as bases mais utilizadas são os hidróxidos e os metóxidos de sódio e potássio (PINTO *et al.*, 2005). Os catalisadores básicos são os mais utilizados na produção de biodiesel por aumentar a velocidade da reação e permitir que o processo seja conduzido em condições moderadas de temperatura e pressão, embora isto exija o uso de óleos neutros, com baixo teor de ácidos graxos livres e com baixo teor de água. (SUAREZ *et al.*, 2007; DABDOUB *et al.*, 2009). Segundo Vicente *et al.*, (2004) a vantagem dos catalisadores ácidos (ácidos de Bronsted, tais como ácido sulfúrico, fosfórico, sulfônico e clorídrico) é esterificar os ácidos graxos livres e não formar sabões, aumentando o rendimento da reação e facilitando a separação e purificação das fases de biodiesel e glicerol, porém os seus resíduos podem causar problemas de corrosão no motor, além de ocasionar a degradação de ésteres graxos insaturados, promovendo adições eletrofílicas sobre as ligações duplas.

Industrialmente na catálise homogênea, a separação do catalisador e do produto é uma tarefa bem difícil, logo assim os catalisadores heterogêneos vêm sendo largamente utilizados devido à facilidade de separação do catalisador da reação e sua reutilização. Os biocatalisadores, como as lipases, têm sido bastante empregados, uma vez que alcançam altos valores de conversão em condições amenas, apresentam fácil recuperação do glicerol e menor formação de resíduos (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009; MACEDO e MACEDO, 2004).

Em função das vantagens oferecidas, a via enzimática tem sido empregada em trabalhos de pesquisa nos últimos anos. Com base nestes estudos, a composição do sistema afeta diretamente a composição das reações. Portanto, deve-se levar em consideração o suporte, o álcool, o óleo, solvente e o tempo de reação (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Estudos da produção de biodiesel utilizando lipase livre e imobilizada.

Fonte da Lipase	Suporte	Álcool	Solvente	Óleo	Conversão (%)	Tempo reacional (h)	Referência
<i>Burkholderia cepacia</i>	Terra diatomácea	n-butanol	Ausente	Trioleína	100	4	SALIS <i>et al.</i> , 2005
<i>Burkholderia cepacia</i>	Gel Hidrofóbico	Etanol	Ausente	Soja	67	1	NOUREDDINI <i>et al.</i> , 2005
<i>Burkholderia cepacia</i>	Matriz filossilicato sol-gel	Metanol	Ausente	Gordura	98	48	HSU <i>et al.</i> , 2000
<i>Candida Antarctica</i>	Resina acrílica	Etanol	Propano supercrítico	Oliva	60	1	ESMELINDRO <i>et al.</i> , 2008
<i>Candida antarctica</i>	Resina acrílica	Metanol	terc-butanol	Semente de Algodão	97	24	ROYON <i>et al.</i> , 2007
<i>Candida antarctica</i>	Matriz filossilicato sol-gel	Metanol	Ausente	Gordura	60	48	HSU <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Caulinita	n-propanol	Ausente	Trioleína	100	10	ISO <i>et al.</i> , 2001
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Matriz de silicato	Etanol	Ausente	Oliva	77	24	HSU <i>et al.</i> , 2004

Embora a função natural da lipase seja de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ésteres a partir de álcoois e ácidos carboxílicos. Um grande número de trabalhos nesta área pode ser encontrado na literatura especializada, tendo em vista o interesse científico demonstrado por diversos grupos de pesquisa, no sentido de elucidar as propriedades e o comportamento de enzimas em meios não aquosos, como por exemplo, a esterificação para produção de emulsificantes (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

A produção de emulsificantes ocorre por meio da esterificação entre um ácido carboxílico e um álcool, produzindo éster e água, Figura 3.11.

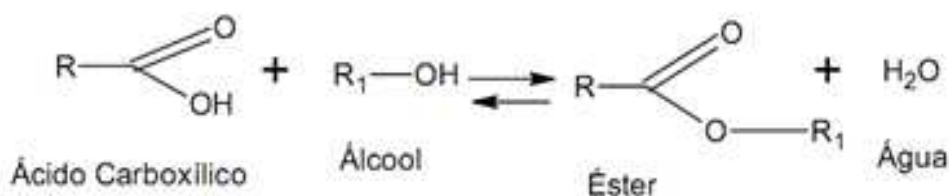


Figura 3.11. Esquema da esterificação (MARKLEY, 1961).

A otimização dos resultados das reações de esterificação é em função do equilíbrio entre as reações de hidrólise e esterificação para diferentes aplicações. No entanto, isso nem sempre é fácil, porque, quando há presença de água em excesso provoca um deslocamento favorável para a hidrólise. Por outro lado, a reação global é deslocada para a esterificação quando na presença de uma pequena quantidade de água no meio (CAO *et al.*, 2009; UJANG e VAIDYA, 1998). Na esterificação em sistemas não-aquosos são usadas geralmente peneiras moleculares para o controle da água que está em excesso (CASTRO *et al.*, 1997).

Rafiee *et al.* (2008) realizaram a esterificação do ácido mandélico catalisada por 98%. Nandhini *et al.* (2006) utilizaram também um catalisador químico na esterificação do ácido succínico com etanol e obtiveram o rendimento de 100% após 3h de reação.

Entretanto, estudos utilizam biocatalisadores como alternativa à rota química, como o descrito por Freitas *et al.* (2007) e Sekeroglu *et al.* (2004) para a produção de ésteres. Em ambos os casos foi utilizada a lipase imobilizada, alcançando 94,36% de conversão em laurato de glicerila por 4h (FREITAS *et al.*, 2007) e 179μmol de laurato isopropílico a 60°C após 50min de reação (SEKEROGU *et al.*, 2004). Em outro estudo foi avaliada a síntese de etil-

oleato pela lipase isolados de *Burkholderia cepacia* linhagem LTEB11 imobilizado em três sistemas com diferentes suportes: hidrofóbico (Accurel EP 100 ®), encapsulamento em micelas reversas, e adição direta de enzima livre em pó ao meio reacional. O melhor desempenho foi obtido para micelas invertidas com 100% de rendimento após 3h de reação, o catalisador foi reutilizado por 11 vezes, mantendo a sua atividade, com redução de 50% somente após 24 vezes de reutilização (SALUM *et al.*, 2008). Scroccaro (2009) estudou uma reação homogênea de esterificação do ácido esteárico, formando o estearato de metila ou etila, bem como desenvolveu um catalisador heterogêneo para realizar a mesma reação para aplicar futuramente para a petroquímica de produção do biodiesel.

3.4.1 Meio Reacional Não Convencional: Fluido Supercrítico

Enzimas livres e imobilizadas podem ser utilizadas em meios reacionais não convencionais, que possuem uma quantidade restrita de água e são compostos por diversos solventes, fluidos supercríticos (FSC), fases gasosas ou sólidas e líquidos iônicos. Entre os meios não-convencionais, as aplicações em fluidos supercríticos tem crescido aceleradamente visando resultados que forneçam a estabilidade e/ou aumento da atividade enzimática (KNEZ, 2009; EISENMENGER E CORCUERA, 2009; OLIVEIRA, 2000; OLIVEIRA E VIEIRA, 2006).

O solvente empregado em reações de transesterificação enzimática tem efeito direto sobre o mecanismo da reação. A atividade enzimática depende do tipo de solvente utilizado, provavelmente como resultado de diferentes interações proteína-solvente. As interações proteína-meio pressurizado que podem afetar a atividade enzimática incluem a partição do substrato, produto e água entre a enzima e o solvente, e interações diretas entre o fluido e a enzima, as quais podem inibir ou inativar a enzima por quebra das ligações de hidrogênio e iônicas. Os solventes menos nocivos às enzimas são aqueles mais hidrofóbicos, pois interagem menos com a água necessária para boa atividade da enzima. Por outro lado solventes hidrofílicos, ou seja, solventes que contêm maior quantidade de grupos polares ou centros capazes de formar ligações de hidrogênio, tendem a retirar a água essencial das proximidades da enzima, acarretando a perda da atividade enzimática (KNEZ e HABULIM, 2001).

Os solventes orgânicos protegem as enzimas da desnaturação por meio de altas concentrações de álcoois, como o metanol e o etanol, que presente exercem essa função. Entretanto, solventes orgânicos hidrofílicos costumam interagir fortemente com a camada essencial de água que envolve a enzima, desnaturando-a. Considerando que a mobilidade molecular é essencial para a atividade catalítica da enzima, uma redução na sua flexibilidade é normalmente acompanhada por uma diminuição da atividade enzimática. (ANTCZAK *et al.*, 2009; MONOT, 1994).

Um estudo comparativo a respeito da utilização e não utilização de solvente foi realizado por Dossat e Combes (2002) utilizando um sistema contendo o solvente n-hexano e um sistema sem solvente. Os autores utilizaram óleo de girassol como substrato e lipase imobilizada (Lipozyme IM) como catalisador. O meio reacional sem solvente foi caracterizado por uma conversão de 60% em éster do ácido oleico, enquanto 95% de conversão foi obtida na presença de solvente, o que confirma a viabilidade de utilizar solventes na reação.

O uso de gases como solventes nas reações de transesterificação enzimática pode se constituir em alternativa para diversos inconvenientes apresentados nos meios convencionais. Os fluidos em reatores supercríticos são substâncias que se encontram acima de sua pressão e temperatura críticas, onde suas propriedades físico-químicas assumem valores intermediários àqueles dos estados líquido e gasoso, apresentando densidade próxima à dos líquidos e viscosidade próxima à dos gases, difusividade duas vezes maior que a típica dos líquidos, alta compressibilidade e baixa tensão superficial (MOURA *et al.*, 2007; KING *et al.*, 1992).

Os fluidos supercríticos possuem diversas vantagens sobre os solventes líquidos como a alta difusividade, que pode acelerar a transferência de massa em reações enzimáticas. A aplicação de solventes em condições supercríticas ou próximas ao seu ponto crítico é baseada na observação experimental da característica que muitos gases apresentam de melhorar significativamente o seu poder de solubilização quando submetidos a altas pressões (KNEZ, 2009; TEMELLI, 2009; MCHUGH e KRUKONIS, 1994).

De acordo com Temelli (2009) a motivação para a realização de reações em FSC é devido às propriedades ajustáveis dos fluidos pela variação de temperatura, pressão e a facilidade de recuperação do produto, bem como o aumento das velocidades de reação quando comparada aos meios convencionais. Pressão e temperatura podem ser utilizados para influenciar a densidade e propriedades de transporte de FSC, pela viscosidade, condutividade

térmica e difusividade. O FSC, por sua vez afeta a solubilidade e transporte de reagentes e/ou produtos para enzima, dependendo da sua forma, livre ou imobilizada (RANDOLPH *et al.*, 1991).

O dióxido de carbono é o fluido supercrítico freqüentemente mais usado, porém este possui algumas desvantagens como a não polaridade, resultando em problemas de dissolução de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos afetando negativamente a atividade das enzimas (HABULIN e KRMELJ, 1999; ANDRADE *et al.*, 2008). Apesar da existência de diferentes fluidos, apenas alguns apresentam valores de exposição de P_c e T_c (pressão crítica e temperatura crítica) compatíveis com a atividade enzimática, conforme mostrado na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Fluidos frequentemente utilizados, temperatura e pressão crítica (TAYLOR, 1996).

Solvente	T_c (°C)	P_c (Bar)
Amônia	133	111
Argônio	-122	48
Dióxido de carbono	-31	73
Cloro-trifluorometano	29	39
Etano	33	48
Etileno	9	51
Fluoroforme	26	48
Hélio	-268	2
Sulfeto de Hidrogênio	100	89
Metanol	239	81
Nitrogênio	-147	34
Propano	96,7	42,5
Oxigênio	-127	50
Trióxido de enxofre	218	84
Água	374	221

O fluido supercrítico propano está ganhando popularidade devido suas propriedades e razões econômicas. Observa-se na Tabela 3.5 que o propano tem uma pressão crítica de 42,5bar, de modo que se é possível trabalhar a pressões mais baixas que a do CO₂, o que resulta em menores gastos de pressurização, além da sua baixa toxicidade tornando-se um fluido competitivo nas muitas aplicações supercríticas com o dióxido de carbono (ESPINOSA, 2001).

Oliveira e Vieira (2006) realizaram estudos de atividade de esterificação em lipases imobilizadas, *Yarrowia lipolytica*, *Lipozyme IM* e *Novozym 435*, utilizando três fluidos, dióxido de carbono, propano e n-butano, e somente no propano e n-butano as lipases apresentaram o mesmo perfil e atividade satisfatória da *Novozym 435*, porém na presença de CO₂ nenhuma das lipases apresenta atividade, o que reforça os estudos de lipases em gases diferente de CO₂ devido à dissolução de compostos hidrofóbicos.

Yin *et al.* 2008 avaliaram a transesterificação do óleo de soja com metanol em condições supercríticas e em condições subcríticas. Os resultados indicaram que a produção de biodiesel, na reação utilizando 350°C e sob pressão de 20mPa durante 10 min na ausência de catalisador obteve 95% de biodiesel, atingindo 98% após 60min de reação

Vários estudos tem sido realizados analisando a perda ou ganho de atividade da enzima em diferentes reações em reator com FSC (VARMA E MADRAS, 2006; MADRAS *et al.*, 2004; HABULIN *et al.*, 2007; MATSUDA e WATANABE, 2004). Giebauf *et al.* (1993) mostraram que o tratamento de lipase de *Pseudomonas* com CO₂ como FSC a 150 bar e 45°C por 1h levou a um aumento de atividade de 20%, e a incubação a 150 bar e 75°C por 24 h causou um aumento da atividade de 100%. Com base nesses estudos pode-se observar o quanto é primordial o estudo da estabilidade da enzima frente às condições de incubação em fluido supercrítico para posteriormente analisar a reação em condições a alta pressão.

4. METODOLOGIA

4.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1.1 Enzimas

Neste trabalho foram utilizadas a lipase origem microbiana *LCR* (*Candida rugosa*, tipo VII) adquirida comercialmente da Sigma Co, St. Louis, MO, EUA, e a lipase obtida por meio de fermentação do micro-organismos *Bacillus* sp. ITP-001 conforme descrito no item 4.1.2.

4.1.2 Micro-organismo

A bactéria *Bacillus* sp. ITP 001, utilizada neste trabalho pertence à coleção de micro-organismos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e foi isolado de um solo contaminado por petróleo na região do campo de exploração de petróleo de Carmópolis no Estado de Sergipe. Esta bactéria (Figura 4.1) foi pré-selecionada a partir de estudos, anteriormente desenvolvidos pelo grupo de pesquisa em Engenharia de Bioprocessos do ITP, por meio dos quais constatou-se que a bactéria apresentava o maior potencial produtor de enzimas lipolíticas dentre as estudadas (CARVALHO *et al.*, 2008). O micro-organismo foi preservado em tubos com ágar nutriente inclinado e estocados a 4°C, no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP).

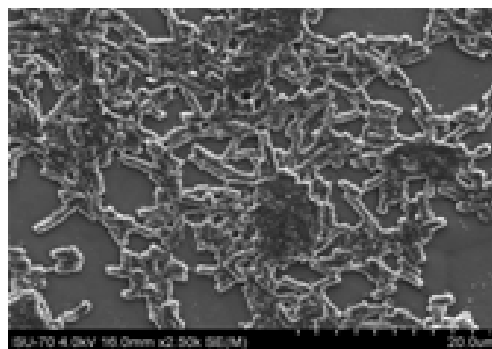


Figura 4.1. Aspecto de *Bacillus* sp. ITP-001 obtida em microscopia de varredura eletrônica.

4.1.3 Produção e Purificação da Lipase de *Bacillus* sp. ITP-001

A obtenção do caldo fermentado foi realizada a partir da metodologia anteriormente estabelecida (FEITOSA *et al.*, 2009), com algumas modificações conforme a seguir descrito: a fermentação foi conduzida em frascos agitados a 170rpm, pH 7,0 e mantidas a 37°C em agitador orbital durante 144h. O meio de cultura (Tabela 4.1) foi esterilizado em autoclave por 15min a 121°C. Os frascos foram inoculados com 10% de volume de inóculo após 48h e 4% de óleo de coco como indutor, o qual foi acrescido após 48h de fermentação.

Tabela 4.1. Composição do meio de cultura.

Composição	Concentração (% m/v)
Amido (Synth, USA)	10,0
Extrato de Levedura (Himedia, Índia)	3,0
Peptona Bacteriológica (Himedia, Índia)	0,65
KH ₂ PO ₄ (Synth, USA)	0,5
NaNO ₃ (Dinâmica, Brasil)	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O (Synth, USA)	0,25
Triton X- 100	1,0*

* Concentração em % (v/v)

A enzima foi purificada utilizando o método de precipitação por *salting-out*. O caldo fermentado foi centrifugado para a separação das células bacterianas e do óleo de coco residual. Neste caldo livre de célula e óleo foi acrescido de sulfato de amônia em percentual de saturação de 80%. O meio precipitado foi novamente centrifugado por 20min a 1200rpm e

separado o meio sobrenadante do precipitado. A fase aquosa foi dialisada em membrana com massa de corte de 12.000Da contra água Milli-Q durante 12h a 4°C, e purificada em sistema aquoso bifásico (SAB) formado por 20% de polietilenoglicol 8000, 18% de tampão fosfato de potássio, 6% de NaCl em pH 6 e temperatura de 4°C. A fase de fundo do SAB, que continha a enzima foi dialisada novamente. Após esta etapa o caldo purificado foi liofilizado por 72h em liofilizador Labconco Freezone 4.5 (BARBOSA, 2010).

4.1.4 Imobilização em Matrizes Hidrofóbicas pela Técnica Sol-Gel

As matrizes foram preparadas empregando a metodologia anteriormente estabelecida (SOARES *et al.*, 2004) com algumas modificações: a solução etanólica, foi preparada dissolvendo 36mL de Tetraetilortosilicato (TEOS) em 30mL etanol absoluto (99%) em atmosfera inerte de nitrogênio e foi transferida para um balão de três bocas de 250mL. A solução etanólica foi mantida sob agitação durante aproximadamente 5min à temperatura ambiente. A esta solução adicionou-se lentamente (gota a gota), por meio de funil de adição, 0,11mL de ácido clorídrico (36%) diluído em 5mL de água ultra pura (solução pré-hidrolisante). Após a lenta adição da solução pré-hidrolisante, a temperatura foi mantida a 35°C sob agitação, durante 90min. Adicionou-se 2,70g de lipase de *Bacillus* sp ITP-001 ou *Candida rugosa* dissolvida em 10mL de água ultra pura, e simultaneamente foi adicionado 1 mL de hidróxido de amônio dissolvido em 6 mL de etanol (solução hidrolisante), obtendo-se uma solução homogênea, e em seguida a mistura foi mantida em repouso à temperatura de 35°C durante 60min. O material foi lacrado no balão por 24h para permitir a policondensação completa. Após este período, o gel foi retirado do balão de três bocas, após 24h de gelação. O material foi transferido para um funil de Büchner e lavado com heptano 3x60mL e acetona (20mL), para eliminar o excesso de água. Após a lavagem o material foi succionado por 60min para remover água residual e solvente, e em seguida mantido em dessecador sob vácuo por 72h.

4.1.5 Obtenção de Ésteres Etílicos e Emulsificantes

As reações de síntese de ésteres etílicos foram realizadas em frascos com tampas autoclaváveis hermeticamente fechados, utilizando agitador orbital (160rpm). As reações foram conduzidas com diferentes óleos separadamente (soja, girassol, coco, nhandiroba, canola ou palma) e etanol em diferentes razões molares (1:6, 1:9, 1:12 e 1:18), temperatura (40-50°C) e a quantidade de enzima foi determinada pela atividade hidrolítica (50, 250 e 500U/g) na presença ou não de solventes (terc-butanol e hexano). A cinética de reação foi obtida por um período máximo de 120 horas. Para a purificação foram recolhidos 2mL da amostra, acrescentou-se 1mL de solução saturada de NaCl no intuito de acelerar a separação de fases (orgânica e não orgânica). A fase orgânica foi retirada e acrescentou-se hexano ao líquido restante, por três vezes, para realização da lavagem e retirada da fase orgânica remanescente. Em seguida adicionou-se sulfato de sódio anidro para extração de água remanescente e obtenção dos ésteres etílicos puro. Após processo de purificação a amostra foi levada para estufa em temperatura de 50°C para remoção do hexano, conforme Figura 4.2.

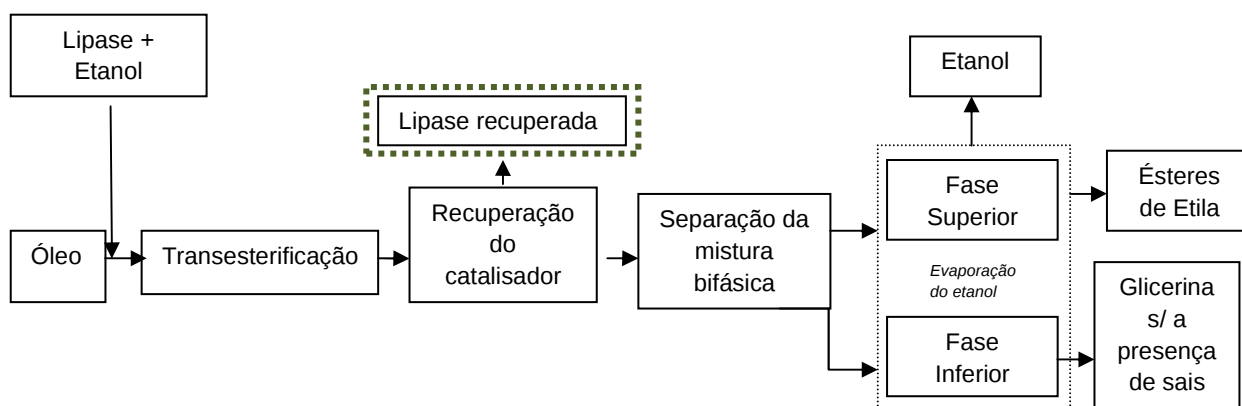


Figura 4.2. Fluxograma da produção de ésteres etílicos usando lipases.

As reações de esterificação foram conduzidas em reatores fechados de 100mL e agitador orbital, contendo cerca de 5mL de substrato numa concentração variada de ácido láurico (840-4200mM), enzima (0,25-7,88% m/v) e 10% (m/m) de peneira molecular como agente dessecante. A faixa de temperatura estudada foi de 45 a 62,5°C e o tempo máximo de reação foi de 180 minutos.

4.1.6 Atividade Enzimática da Lipase em Fluidos Supercríticos

Para a avaliação da estabilidade enzimática as enzimas livres e imobilizadas foram submetidas às condições definidas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Condições de pressão e temperatura utilizadas para testes de estabilidade.

Condições	1	2	3	4	5
Temperatura (°C)	45	60	52	45	60
Pressão (bar)	50	50	115	200	200

Os experimentos envolvendo os extratos enzimáticos livres ou imobilizados foram realizados em uma unidade de bancada apresentada na Figura 4.3.

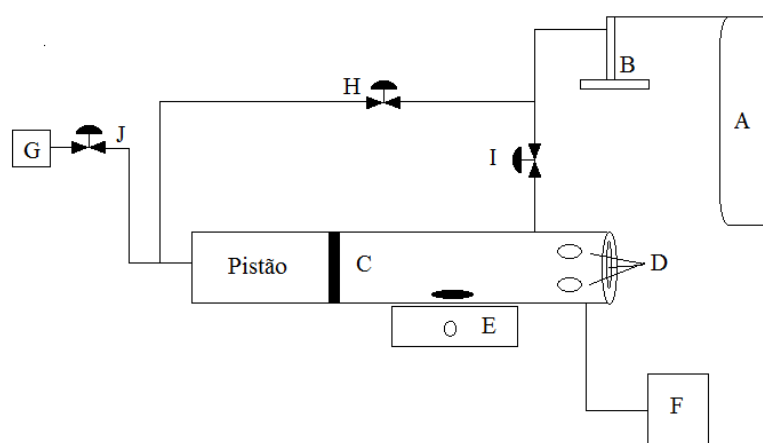


Figura 4.3. Diagrama esquemático da unidade de testes de atividade enzimática em fluidos supercríticos. A – cilindro de gás, B – bomba de seringa, C – célula de equilíbrio, D – janelas de safira, E – agitador magnético, F – fonte de luz, G – transdutor de pressão, H – válvula de esfera, I – válvula micrométrica, J – válvula de alívio.

O procedimento experimental foi realizado conforme metodologia anteriormente estabelecida (FRICKS *et al.*, 2006) e algumas modificações. Foi adicionado ao sistema a massa de enzima (0,1g) e o solvente (9mL) com o auxílio de uma bomba do tipo seringa (ISCO, modelo 260D) para uma célula de volume variável equipada com duas janelas de

safira (uma lateral para entrada de luz e outra frontal para visualização). Após o procedimento de carga do reator, a temperatura é aumentada para o valor desejado com auxílio de um banho termostático. Após a estabilização da temperatura, a pressão do sistema era aumentada até o valor desejado com o auxílio da bomba de seringa e um pistão móvel inserido no interior da célula. A pressão no interior da célula foi monitorada por meio de um transdutor de pressão de volume zero (NOVUS). A partir do momento em que a pressão e temperatura estivessem estabilizadas, o sistema foi mantido por 60min sob agitação com o auxílio de uma barra magnética. Após esta etapa, o tempo de pressurização e despressurização foi de 30min, totalizando 90min de experimento, a enzima coletada para posterior determinação da atividade enzimática conforme descrito a seguir. A perda ou ganho de atividade para cada enzima após ser submetida ao processamento a alta pressão, nas condições experimentais, foi determinada por meio da Equação 4.1.

$$Perda\ ou\ Ganho\ (\%) = \left(100 \times \frac{Atividade\ (U / g)\ após\ pressurização}{Atividade\ (U / g)\ antes\ da\ pressurização} \right) - 100 \quad (4.1)$$

4.2 METODOLOGIA ANALÍTICA

4.2.1 Atividade de Hidrólise

A atividade lipolítica foi determinada pelo método descrito por Soares *et al.* (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 50mL de azeite de oliva e 50mL de goma arábica a 7% em água. A reação enzimática é formada por 5mL de substrato, 2mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e 1mL de solução de enzima livre (0,1g/ml) ou 0,1g de enzima imobilizada. A temperatura da reação foi mantida a 37°C em banho termostático por 5min para a enzima livre ou 10min para o biocatalisador imobilizado em matriz hidrofóbica, sob agitação constante (82rpm). A reação foi interrompida pela adição de 2mL de uma solução de acetona, etanol e água (1:1:1). Os ácidos graxos liberados eram titulados com solução padronizada de KOH 0,04N, utilizando fenolftaleína como indicador.

Os cálculos foram realizados pela equação 4.2 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em mmol/g.min.

$$Atividade\ enzimática\ (U/g) = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 1000}{t \times m} \quad (4.2)$$

Em que: AE: atividade enzimática (U/g); Va: volume da amostra titulada (mL); Vb: volume do branco titulado (mL); m: massa da amostra utilizada na reação (g); N: normalidade da solução de KOH (mol/L); t: tempo de reação em minutos.

4.2.2 Recuperação de Atividade

A recuperação de atividade da enzima após imobilização (RA) é determinado pela unidade de atividade lipolítica total presente no suporte (U_s) e unidades de atividade lipolítica oferecidas para imobilização (U_o), como pode ser visto na Equação 4.3.

$$RA\ (\%) = \frac{U_s}{U_o} \times 100 \quad (4.3)$$

4.2.3 Caracterização da Lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 Imobilizada

Foram avaliadas as características bioquímicas na reação de hidrólise do azeite de oliva em meio aquoso da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada em matriz hidrofóbica pela técnica sol gel, quanto ao pH. Os tampões utilizados foram ácido cítrico-citrato de sódio 0,1 M (pH 2,0-5,0), fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,0-8,0) e bicarbonato-carbonato 0,1 M (pH 8,0-10,5). Avaliou-se também quanto à temperatura reacional (25-100°C), estabilidade térmica (37-70°C), estabilidade na presença de íons (EDTA, $CoCl_2$, $FeCl_3$, $MnCl_2$ e $ZnCl_2$, na concentração de 0,1 e 10mm) e solventes orgânicos (acetona, acetonitrila, álcool etílico, isopropílico, metílico e piridina), na concentração de 10 e 30% (m/v), e parâmetros cinéticos. A atividade lipolítica foi determinada pelo método descrito por Soares *et al.* (1999).

O melhor pH para o substrato foi determinado pela variação entre 3-10,5 em um período de 10 minutos de reação hidrolítica. A fim de determinar a hidrólise na faixa de temperatura de 25-100°C foi utilizado o melhor pH estabelecido anteriormente em um período de 10min de reação hidrolítica. A estabilidade térmica foi avaliada a partir da incubação da enzima durante 5 horas, com intervalos de amostragem de 60min nas temperaturas de 37, 50, 60, 70 e 80°C, utilizando o melhor pH e temperatura reacional estabelecido anteriormente.

A lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada foi incubada no melhor pH e na melhor temperatura de incubação estabelecida anteriormente por 1h na presença de diversos íons (EDTA, CoCl₂, FeCl₃, MnCl₂ e ZnCl₂) na concentração de 0,1 e 10mM e por 3h na presença de diversos solventes orgânicos, acetona, acetonitrila, álcool etílico, isopropílico, metílico, e piridina no volume de 10 e 30% (v/v). A análise foi realizada comparando a atividade hidrolítica da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada sem íons e solventes orgânicos (controle).

Os parâmetros cinéticos da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada foram determinados a partir da variação da concentração de substrato óleo de oliva e solução tampão entre 10 e 70% (v/v) em 60min, com reações de 10min. As constantes cinéticas foram calculadas utilizando os métodos de linearização de Lineweaver-Burk, Hanes-Wolf, Eadie-Scatchard e Wolf Augustinsson-Hofstee e o método não linear.

O grau de ajuste dos modelos aos dados experimentais foi baseado na magnitude do erro médio relativo (P) e estimado (SE), calculado pelas Equações 4.4 e 4.5, respectivamente:

$$P = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{m_{\text{exp}} - m_{\text{pre}}}{m_{\text{exp}}} \quad (4.4)$$

Em que: m_{exp} e m_{pre} são unidades experimentais e previstas, respectivamente, e N é o número de observações.

$$SE = \sqrt{\left[\frac{\sum (Y - \hat{Y})^2}{GLR} \right]} \quad (4.5)$$

Em que: Y e $\hat{Y}$ são os valores observados experimentalmente e os valores calculados para o modelo, respectivamente, e GLR é o modelo de graus de liberdade.

A energia de ativação foi calculada conforme Equação 4.6, em que o K_{cat} (constante de velocidade limite de qualquer reação catalisada por uma enzima nas condições de saturação) foi calculado pelo programa GraphPad Prim.

$$E_A = \frac{K_{cat}}{K_m} \quad (4.6)$$

4.2.4 Atividade de Esterificação

As atividades de esterificação das enzimas estudadas foram realizadas em condições normais (temperatura e pressão) e após submissão da enzima ao fluido supercrítico no tempo 0, 60, 120 e 360min e determinadas pelo método de esterificação do ácido láurico com álcool isopropílico de acordo com o procedimento de Feihrmann *et al.* (2006), com as modificações propostas neste trabalho: a atividade das enzimas foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação com o álcool isopropílico nas razões molar ácido-álcool citadas no item 4.2.6. As reações foram realizadas em reatores fechados de 100mL, contendo 5mL de substrato, na presença 10% (m/m) de peneira molecular como agente dessecante e enzima em agitador orbital em diferentes temperaturas. Foram coletadas alíquotas de 300μL, em triplicata, do meio reacional no tempo zero e após 10 minutos de reação e foram diluídas em 5mL de acetona-etanol (1:1). A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,1N, utilizando como indicador fenolftaleína. As reações de esterificação foram conduzidas em reatores fechados de 100mL e agitador orbital, contendo cerca de 5mL de substrato numa concentração variada de ácido láurico e enzima, descritos no item 4.2.6.

4.2.5 Parâmetros Reacionais de Esterificação

Foi investigada a esterificação enzimática do ácido láurico com álcool isopropílico, utilizando lipase de *Bacillus* sp ITP-001 e *Candida rugosa* na forma livre e imobilizada. Para a lipase de *Bacillus* sp ITP-001 foi realizado o estudo univariável (uma variável por vez), as variáveis foram: temperatura, razão molar, massa de enzima e estabilidade operacional da enzima quando imobilizada.

A dependência da temperatura foi estudada nas seguintes condições: 45; 52,5; 57,5 e 62,5°C, razão molar de 1:3 (álcool: ácido) na presença de peneira molecular como agente de secagem (10% m/m) e 0,75% (m/m) de enzima livre e 5,25% (m/m) de enzima imobilizada.

Para construção da curva de saturação a concentração de ácido láurico e álcool isopropílico foram variados para a síntese de ésteres na curva de saturação, análise do efeito da concentração de substrato na velocidade inicial e a ocorrência de algum tipo de inibição durante a reação de esterificação. As concentrações molares de ácido láurico utilizadas para a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre foram de 840, 1000, 3000, 3150 e 3580mM, para a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada foram 1250, 1620, 2340, 3000 e 4200 mM. A reação foi realizada na temperatura ideal de 52,5°C na presença de peneira molecular como agente de secagem (10% m/m) e 0,75% (m/m) de enzima livre e 5,25% (m/m) de enzima imobilizada.

Foram realizadas reações com diferentes massas de lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre: 0,25% m/m (90U), 0,50% m/m (180U), 0,75% m/m (270U) e 1% m/m (360U), e diferentes concentrações de lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizado: 0,75% m/m (25U), 2,63% m/m (90U), 5,25% m/m (180U) e 7,88% m/m (270U). As reações foram realizadas na temperatura ideal de 52,5°C, razão molar de 1:3 (álcool: ácido) ou 3000mM de ácido láurico para enzima livre e 1:2,34 (álcool: ácido) ou 2340mM de ácido láurico para a enzima imobilizada, na presença de peneira molecular como agente secante (10% m/m).

Para a análise da estabilidade operacional da lipase de *Bacillus* ITP-001 imobilizada, empregaram-se as melhores condições para a realização da reação: razão molar de 1:3 (álcool:ácido) ou 3000mM de ácido láurico, temperatura 52,5°C, massa de 5,25% m/m (180U), na presença de peneira molecular como agente secante (10% m/m). A enzima foi colocada em uma bolsa de tecido de linha e adicionado ao reator, após 10min de reação o saco foi removido e lavado com hexano, após secagem a bolsa foi reutilizado em uma nova reação.

Para a lipase de *Candida rugosa* os experimentos foram realizados por meio de planejamento de experimento fatorial 2^2 com três pontos centrais, uma estratégia aplicada para minimização do número de experimentos e aumento da confiabilidade da caracterização bioquímica das reações enzimáticas obtendo assim condições otimizadas de temperatura e massa de enzima, conforme Tabela 4.3. Para a lipase de *Candida rugosa* foi mantida a concentração de 3000mM em todos os experimentos.

Tabela 4.3. Matriz de planejamento de experimento para avaliação da temperatura e massa de enzima da enzima lipase de *Candida rugosa* livre e imobilizada (níveis e valores reais).

Testes	Nível		Condição experimental para <i>LCR livre</i>			Condição experimental para <i>LCR imobilizada</i>		
	X ₁	X ₂	Temperatura (°C)	Massa de enzima		Temperatura (°C)	Massa de enzima	
				(%)	(U)		(%)	(U)
1	-1	-1	52,5	0,25	90	52,5	2,5	90
2	+1	-1	62,5	0,25	90	62,5	2,5	90
3	-1	+1	52,5	0,75	270	52,5	5,25	270
4	+1	+1	62,5	0,75	270	62,5	5,25	270
5	0	0	57,5	0,5	180	57,5	3,375	180
6	0	0	57,5	0,5	180	57,5	3,375	180
7	0	0	57,5	0,5	180	57,5	3,375	180

A conversão de esterificação foi expressa em percentual molar do ácido láurico consumido, empregando a Equação 4.6:

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{C_o - C_f}{C_o} \times 100 \quad (4.7)$$

Em que: C₀ = concentração inicial do ácido; C_f = concentração final do ácido em um determinado tempo.

4.2.6 Análise Cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas por cromatógrafo à gás e CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). Para injeção das amostras no cromatógrafo à gás, foram pesadas 0,1g da amostra, produzida e purificada, em um balão volumétrico de 10mL e completado com hexano, onde após a agitação foi recolhido 100μL da amostra e colocado em um balão de 1mL juntamente com 100μL de solução de padrão interno (heptadecanoato de metila na concentração de 250mg/mL) e completado novamente com hexano. As amostras

após o preparo foram injetadas no cromatógrafo à gás modelo CP-3800 da VARIAN, equipado com detector de ionização de chama (FID). Para a separação dos compostos foi usada uma coluna DB-Waxetr (Ca, EUA) de 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro e 0,25µm de espessura de filme com fluxo de hidrogênio constante de 1,5mL/min. A Tabela 4.4 indica as condições para dosagem dos ésteres de etila:

Tabela 4.4. Condições para dosagem dos ésteres de etila produzidos a partir da reação de transesterificação utilizando enzimas em cromatografia à gás.

Temperaturas	Coluna: 120°C por 6min e 170°C por 10min a uma taxa de 25°C/min.	
	Ionizador e detector: 230 °C	
Gás de arraste	Hidrogênio	
Tempos de retenção dos Monoésteres de etila(min)	Padrão interno	4,16
	C ₁₂ EtOH	6,80
	C ₁₄ EtOH	11,92
	C ₁₆ EtOH	14,43
	C ₁₈ EtOH	18,16
	C _{18:1} EtOH	19,05
	C _{18:2} EtOH	20,96

Os valores de atividade enzimática específica (AEE), produtividade (P) e rendimento por grama de catalisador oferecido (R) obtidos nos diversos sistemas reacionais testados foram determinados empregando-se as Equações 4.7, 4.8, 4.9, respectivamente, de acordo Foresti e Ferreira (2005).

$$AEE \text{ (mmol ácidos graxos consumidos/h.g)} = (NFA)^0 \times (Xac)_t / (t \times w_o) \quad (4.8)$$

$$P \text{ (mmol ácidos graxos consumidos/h)} = (NFA)^0 \times (Xac)_t / t \quad (4.9)$$

$$R \text{ (mmol ácidos graxos consumidos/g)} = (NFA)^0 \times (Xac)_t / w_o \quad (4.10)$$

Em que: $(NFA)^0$ = é a quantidade inicial de ácidos graxos (mmol), $(Xac)_t$ = é a conversão de ácidos graxos em um determinado tempo, t = tempo (horas) e w_o = massa total de biocatalisador oferecida.

Para injeção em CLAE (cromatógrafo líquido de alta eficiência) as amostras foram preparadas a partir de 0,1g de amostra pesada em um balão de 10mL e diluída com álcool isopropílico, foram injetadas 30µL de amostra que passaram por análise em cromatograma líquido com as seguintes condições: Coluna Supelco Analytical - HPLC Products, Sigma Aldrich, espessura de 15cm x 4,6mm, 3µm, detector de UV, comprimento de onda de 205nm, a 40°C. Os padrões utilizados para a curva de calibração foram o glicerol e o butanotriol para distinção e a monoleína, dioleína e a trioleína para quantificação, tais padrões foram injetados tanto individualmente como misturados o que se denomina mix de ésteres para distinção de tempo de detecção dos picos. As fases móveis utilizadas foram a acetonitrila e o álcool-isopropílico com vazão de 1,5ml/min e 40,01min de análise.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A princípio devemos ressaltar que esse trabalho foi continuidade de outros trabalhos precursores do presente grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (Universidade Tiradentes/Instituto de Tecnologia e Pesquisa) como a produção de enzima lipase a partir do micro-organismo *Bacillus* sp ITP-001 por Carvalho *et al.* (2008) e Feitosa *et al.* (2009), a purificação desta enzima foi realizada por Barbosa (2010) e a condição de imobilização da lipase produzida (*Bacillus* sp. IPT-001) e da comercial (*Candida rugosa*) foram realizados conforme descrito por Soares (2004) utilizando a técnica da encapsulação em matrizes sol-gel.

Na primeira etapa serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para a recuperação de atividade da imobilização da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 (ITP-001) e *Candida rugosa* (LCR); a caracterização bioquímica da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada em matriz sol-gel a partir da hidrólise do azeite oliva para determinação do melhor pH e temperatura reacional, estabilidade térmica, estabilidade na presença de íons e solventes orgânicos, e parâmetros cinéticos. Na segunda etapa serão apresentadas a caracterização dos parâmetros temperatura reacional, razão molar e massa de lipase *Bacillus* sp. ITP-001 na forma livre e imobilizada na reação de esterificação do ácido láurico e álcool isopropílico para produção de emulsificantes utilizando o procedimento experimental univariável. E para a determinação dos parâmetros de temperatura e massa de enzima na reação de esterificação utilizando a lipase de *Candida rugosa* foi aplicado o planejamento de experimento fatorial, após a determinação dos níveis das variáveis no estudo anterior. A terceira etapa refere-se ao estudo da reação de transesterificação variando o tipo de enzima, óleo, razões molares, temperatura, tempo reacional, massa de enzima e presença de solventes. E na quarta etapa será avalia-se a estabilidade das lipases de *Bacillus* sp. ITP-001 e *Candida rugosa* na forma livre e imobilizada para hidrólise e esterificação na presença de propano supercrítico.

Portanto, neste capítulo são apresentados e analisados os principais resultados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho. A Tabela 5.1 orienta o leitor sobre a sequência de apresentação e discussão dos principais resultados obtidos, assim como o item da metodologia empregada para a coleta dos dados.

Tabela 5.1. Disposição geral dos ensaios realizados.

ENSAIOS REALIZADOS	RESULTADOS E DISCUSSÃO	METODOLOGIA
RECUPERAÇÃO DE ATIVIDADE	5.1	4.1.3; 4.2.2; 4.2.3
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA LIPASE IMOBILIZADA	5.2	4.2.2; 4.2.4.
• Efeito do pH e temperatura	5.2.1	4.2.2; 4.2.4
• Estabilidade térmica	5.2.2	4.2.2; 4.2.4.
• Parâmetros cinéticos	5.2.3	4.2.2; 4.2.4.
• Influência de íons e solventes orgânicos	5.2.4.	4.2.2; 4.2.4.
PRODUÇÃO DE EMULSIFICANTES A PARTIR DE LIPASES	5.3	4.1.4; 4.2.5; 4.2.6
• Procedimento experimental univariável para lipase de <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 livre e imobilizada	5.3.1	4.1.4; 4.2.5; 4.2.6
• Efeito da temperatura	5.4.3.1.1	4.1.4; 4.2.5; 4.2.6
• Efeito da concentração de ácido	5.4.3.1.2	4.1.4; 4.2.5; 4.2.6
• Efeito da massa de enzima	5.4.3.1.3	4.1.4; 4.2.5; 4.2.6
• Estabilidade operacional da lipase imobilizada	45.4.3.1.4	4.1.4; 4.2.5; 4.2.6
• Planejamento experimental fatorial para caracterização da reação de esterificação da lipase de <i>Candida rugosa</i> livre e imobilizada.	5.3.2	4.1.4; 4.2.5; 4.2.6
PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS	5.4	4.1.4; 4.2.7
ESTABILIDADE EM SUPERCRTICO	5.5	4.1.2; 4.2.2; 4.2.5
• Estabilidade da lipase de <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 e lipase de <i>Candida rugosa</i> livre	5.5.1	4.1.2; 4.2.2; 4.2.5
• Estabilidade da lipase de <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 e <i>Candida rugosa</i> imobilizada	5.5.2	4.1.2; 4.2.2; 4.2.5

5.1 RECUPERAÇÃO DE ATIVIDADE

As lipases foram imobilizadas em matriz hidrofóbica obtidas pela técnica sol-gel. A recuperação de atividade para enzima lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada foi analisada por meio da atividade lipolítica na hidrólise do azeite de oliva, resultando em uma recuperação de atividade de 43%. Para a lipase de *Candida rugosa* imobilizada pela mesma técnica, a recuperação de atividade foi de 28% (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Recuperação de atividade da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 e *Candida rugosa* imobilizada em matriz hidrofóbica obtidas pela técnica sol-gel.

Biocatalisador	Enzima Adicionada		Enzima Imobilizada			RA (%)
	Massa de enzima (g)	UA (U)	MS (g)	AE (U/g)	AE Total (U)	
ITP-001	2,7	2248	6,3	153	964	43
LCR	2,7	6890	16	122	1952	28

UA = unidade adicionada; MS = massa seca de biocatalisador; EA = atividade enzimática; U = unidade; RA = recuperação de atividade.

Os resultados obtidos evidenciam o efeito estabilizante do aditivo testado (PEG) e confirmam os dados apresentados na literatura, que indicam um considerável aumento da atividade catalítica quando o suporte é tratado com polímeros orgânicos ou proteínas não enzimáticas (KEELING-TUCKER *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2002). E ainda para o experimento utilizando a enzima ITP-001 pode-se confirmar o potencial da imobilização da técnica sol-gel para as reações de hidrólise devido ao alto desempenho na recuperação da atividade após a etapa de imobilização, conforme relatado na literatura para outras lipases.

5.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA LIPASE DE *Bacillus* sp. ITP-001 IMOBILIZADA

Foram avaliadas as propriedades bioquímicas na reação de hidrólise do azeite de oliva em meio aquoso, quanto ao pH (3-10,5) e temperatura reacional (25-100°C), estabilidade térmica (37-70°C), estabilidade em íons (EDTA, CoCl₂, FeCl₃, MnCl₂ e ZnCl₂, na

concentração de 0,1 e 10mM) e solventes orgânicos (acetona, acetonitrila, álcool etílico, isopropílico, metílico e piridina, no volume de 10 e 30% (v/v), e parâmetros cinéticos da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada em matriz hidrofóbica pela técnica sol gel. A caracterização da *Bacillus* sp. ITP-001 livre, *Candida rugosa* livre e imobilizada foram estudadas anteriormente pelo grupo (BARBOSA, 2010; SOARES, 2004).

5.2.1 Efeito do pH e Temperatura

Na Figura 5.1 são apresentados os valores de atividade relativa em função do pH da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre e imobilizada. Os dados referentes à enzima livre foram obtidos por Barbosa *et al.* (2010) e utilizado para efeito de comparação. O pH ótimo da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada foi 5,0, que apresentou uma atividade hidrolítica de 488,69U/g, nota-se também que em pH ligeiramente ácido a atividade enzimática pode ser considerada constante e diminui a sua atividade em valores de pH alcalinos. Barbosa *et al.* (2010) concluíram que essa lipase na forma livre é mais ativa na faixa de pH entre 4 e 7, com atividade máxima no pH 7, seguido de perda de parte de sua atividade em valores de pH fortemente alcalinos, contudo observou-se no presente estudo que o aumento do pH a partir de 5 ocasionou a redução gradual da atividade. O deslocamento do pH ótimo neutro para o ácido da enzima livre para imobilizada, supostamente deve-se às variações no estado de ionização dos componentes do sistema à medida que o pH varia como sugerido por Kennedy e Cabral (1983) no trabalho para estudo dos aspectos analíticos e sintéticos de enzimas imobilizadas.

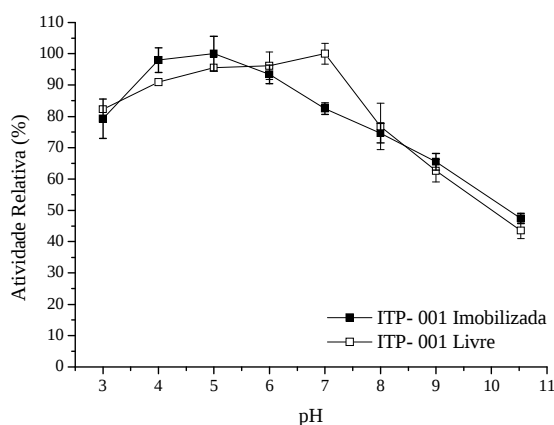


Figura 5.1. Efeito do pH na atividade hidrolítica da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada (■) nesse estudo e livre (○) conforme Barbosa *et al.* (2010).

Resultados similares de pH ótimo próximo ao neutro são descritos na literatura por diversos autores que utilizam lipase na forma livre e imobilizada (GUPTA e RAMNANI 2004). Sugihara *et al.* (1991) relataram que as lipases de *Bacillus* sp. apresentam atividade máxima em pH 5 e 6. Kanwar *et al.* (2005b) estudaram a lipase de *Bacillus coagulans* BTS-1 imobilizada por adsorção em matriz de sílica e celite e verificaram que a maior atividade foi em pH ácido de 5,5. Sathish *et al.* (2009b) realizaram estudo da influência do pH (3-8) na atividade da lipase produzida por um *Bacillus* isolado de amostras de solo coletadas na Índia e observaram que entre o pH 3 e 5 a lipase não apresentou atividade, e somente no pH 6,5 a lipase foi mais ativa. Entretanto, Kumar *et al.* (2006) imobilizaram a lipase *Bacillus* BTS-3 em sílica por adsorção física e verificaram o pH ótimo na faixa de 8,5, a diferença de pH ótimo observada nestes estudos deve-se possivelmente ao tipo de lipase e à técnica de imobilização utilizada.

Pode-se observar na Figura 5.2, a temperatura ótima foi 80°C para as preparações de lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre e imobilizada (BARBOSA *et al.*, 2010). Deve-se salientar que a atividade relativa variou entre 75 e 100% na faixa de temperatura estudada, na qual as maiores atividades hidrolíticas foram 488,69 e 526,63U/g, respectivamente para 37 e 80°C. Conclui-se que temperaturas elevadas não ocasionam diminuição brusca na atividade.

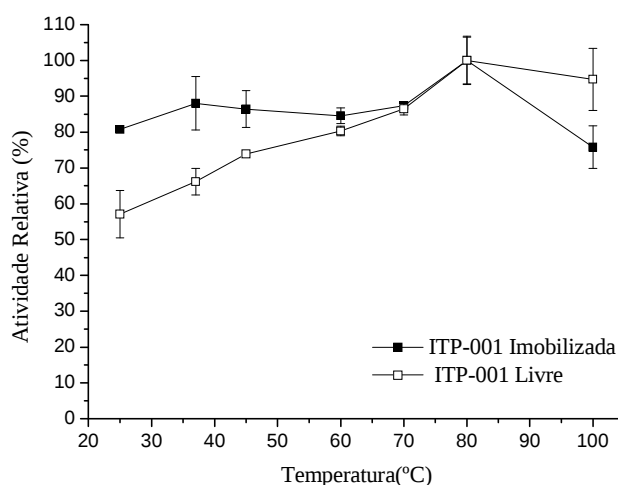


Figura 5.2. Efeito da temperatura na atividade hidrolítica da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada (■) nesse estudo e livre (○) conforme Barbosa *et al.* (2010).

De acordo com o efeito da temperatura sobre a atividade da lipase, em diversos estudos, a atividade ótima foi encontrada entre 30°C e 65°C (BACHA *et al.*, 2005; GAUR *et*

al., 2008). Todavia algumas lipases possuem maior atividade em temperaturas superiores a 70°C (BRADDOO *et al.*, 2002; KAMBOUROVA *et al.*, 2003). Ghori *et al.*(2011) utilizaram uma lipase de *Bacillus* sp. FH5, que foi isolada de resíduos de curtume, e observaram o efeito de variadas temperaturas (10-80°C) sobre a atividade residual da lipase sob pH 9, e notaram que a temperatura ótima para a lipase foi 60°C, o que evidencia o aumento da atividade da lipase do gênero *Bacillus* sp. em temperaturas elevadas.

5.2.2 Estabilidade Térmica

A Figura 5.3 apresenta a variação da atividade da lipase imobilizada após tratamento térmico (37– 80°C) por 120min. Verificou-se que a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada apresentou estabilidade térmica a 37°C mantendo a atividade residual na faixa de 50%, comprovando os resultados anteriores nos quais a enzima também foi ativa na temperatura reacional de 37°C. O mesmo perfil foi observado para a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 na forma livre mantendo-se estável em temperaturas amenas (Barbosa *et al.*, 2010).

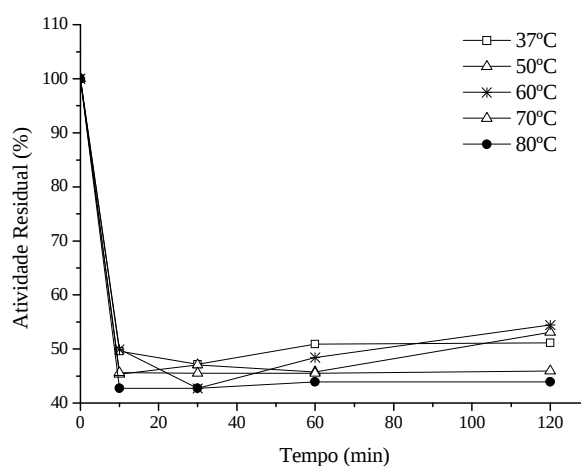


Figura 5.3. Estabilidade enzimática da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada em função da temperatura, em pH 5, tempo reacional de 10min, à 37°C.

Segundo Kumar *et al.* (2006) a lipase *Bacillus* BTS-3 imobilizada em sílica por adsorção física é termoestável em temperaturas de 55, 60, 65 e 70°C e pode-se observar esse comportamento também no estudo realizado por Kanwar *et al.* (2005b) onde a lipase imobilizada de *Bacillus coagulans* BTS-1 apresentou estabilidade térmica na temperatura de

50°C. O estudo de Kumar *et al.* (2006) e Kanwar *et al.* (2005) apresentaram altas temperaturas para estabilidade térmica, diferenciando-se das observadas para a lipase deste estudo, possivelmente essa tolerância deve-se a proteção da enzima promovido pela técnica de imobilização sol gel por encapsulação e adsorção física. A termoestabilidade é uma das características requeridas de enzimas com potencial para aplicação industrial como as lipases, uma vez que muitos processos ocorrem a uma temperatura em torno de 50°C (SALLEH e RAHMAN, 2006).

5.2.3 Parâmetros Cinéticos

O efeito da concentração do substrato para a enzima livre e imobilizada foram estudados utilizando o óleo de oliva como substrato na reação de hidrólise em pH 5 e 37°C. Na Tabela 5.3, apresenta-se os valores de K_m e V_{max} para diferentes métodos de determinação dos parâmetros cinéticos da reação de hidrólise e na Figura 5.3 a comparação entre os métodos que mais se ajustaram aos modelos cinéticos.

Tabela 5.3. Parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) e erros calculados (P e SE).

Modelo	V_{max} (mmol/min.g)	K_m (mmol)	P*	SE**
Lineaweaver-Burk	0,102	14,62	8,26	0,011
Hanes-Wolf	0,118	75,43	11,50	0,017
Eadie-Scatchard	0,125	125,00	12,90	0,021
Wolf-Augustinsson-Hofstee	0,120	103,80	12,11	0,020
Não-linear	0,105	19,96	9,11	0,011

*erro médio relativo; **erro médio estimado

Foi verificado que o modelo que mais se ajustou aos dados experimentais foi o de Lineaweaver-Burk com K_m de 14,62mmol e V_{max} de 0,102mmol/min.g (Figura 5.4) e a energia de ativação foi de 5,62Kcal/mol. Segundo Sgarbieri (1996) os valores de energia de ativação para a desnaturação de enzimas estão entre 12-100 kcal/mol, sendo assim a energia necessária para que ocorra a reação de hidrólise na presença da *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada não é capaz de desnaturá-la. O valores para enzima livre previamente

determinados por Barbosa *et al.* (2010) foram 105,26mmol e 0,116mmol/min.g, K_m e V_{max} , respectivamente. Comparando os valores obtidos para a enzima livre e imobilizada forneceram importantes informações sobre a interação da enzima e o suporte. Segundo Guncheva e Zhiryakova (2011) a estrutura conformacional desta enzima é diferente das demais lipases, pois não apresentam a tampa aberta ou fechada na etapa de transição, o que permite considerar a maior disponibilidade do sítio ativo na enzima imobilizada. Portanto, a diminuição do K_m para a enzima imobilizada indica um substancial acréscimo da afinidade do sítio ativo ao substrato, possivelmente devido à exposição ao substrato depois do ataque nucleofílico produzido pela carga negativa sobre o oxigênio a qual é estabilizada por meio das ligações de hidrogênio pelos resíduos Ile12 (isoleucina) e Met78 (metionina) no sítio ativo da enzima.

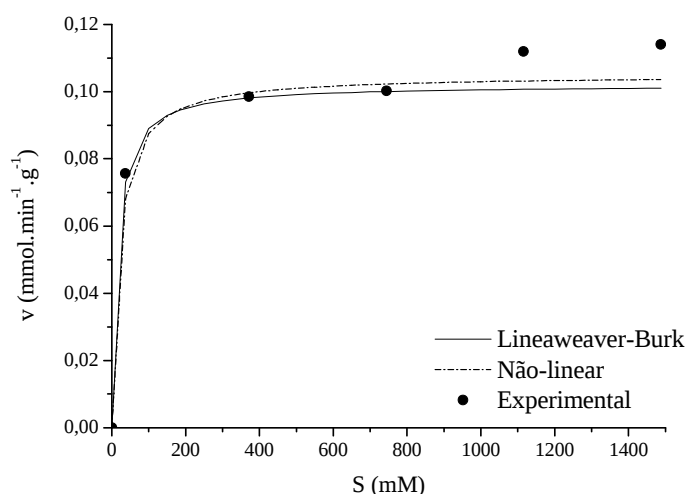


Figura 5.4. Comparação dos dados experimentais com modelos cinéticos de Lineaweaver-Burk e o não-linear na reação de hidrólise do azeite de oliva em pH 5 e 37°C.

5.2.4 Influência de Íons e Solventes Orgânicos

Na presença de íons, a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada apresentou maior atividade em íons de EDTA, $FeCl_3$, $MnCl_2$ (Figura 5.5). Observa-se que a variação da concentração (mM) não influenciou na atividade da enzima, exceto para o $ZnCl_2$ e $FeCl_3$ que o aumento da concentração afetou a atividade enzimática, enquanto o $CoCl_2$ que em ambas concentrações manteve a atividade enzimática próxima ao controle que representa a enzima sem íons. Alguns estudos notificam que o efeito do EDTA pode estimular ou não causar

nenhum efeito sobre a atividade da lipase, enquanto em outros ele mostra um efeito inibitório (BARBOSA *et al.*, 2010; HANDELSMAN e SHOHAM, 1994; DHARMSTHITI e AMMARANOND, 1998).

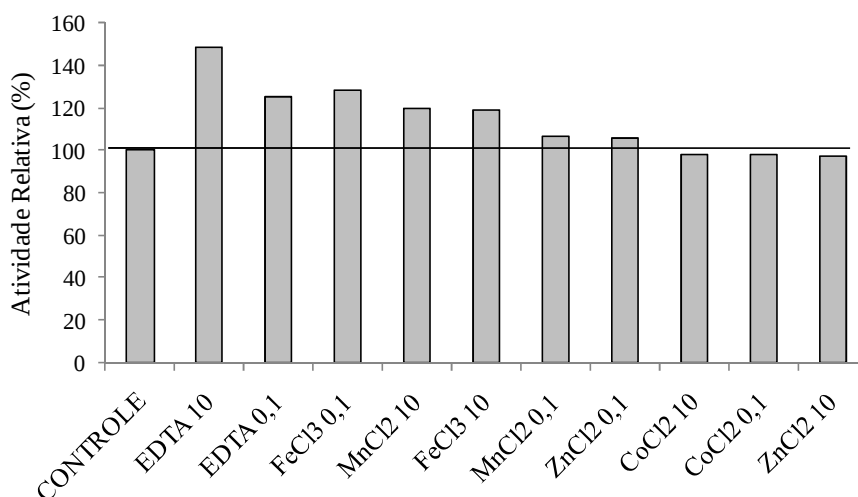


Figura 5.5. Influência dos íons na atividade hidrolítica da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada, pH 5 e 37°C.

O efeito dos solventes orgânicos na lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada é apresentado na Figura 5.6. A atividade lipolítica aumentou para quase todos os solventes testados, exceto para o álcool etílico de 10 e 30% (v/v) e isopropílico de 30% (v/v). Barbosa *et al.* (2010) utilizaram a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 na forma livre e observaram que a piridina na concentração de 30% (v/v) foi o único solvente com efeito positivo de 110,5% na atividade relativa e o principal efeito negativo foi à inativação da lipase livre na presença do álcool etílico, assim como no estudo realizado por Ghori *et al.* (2011).

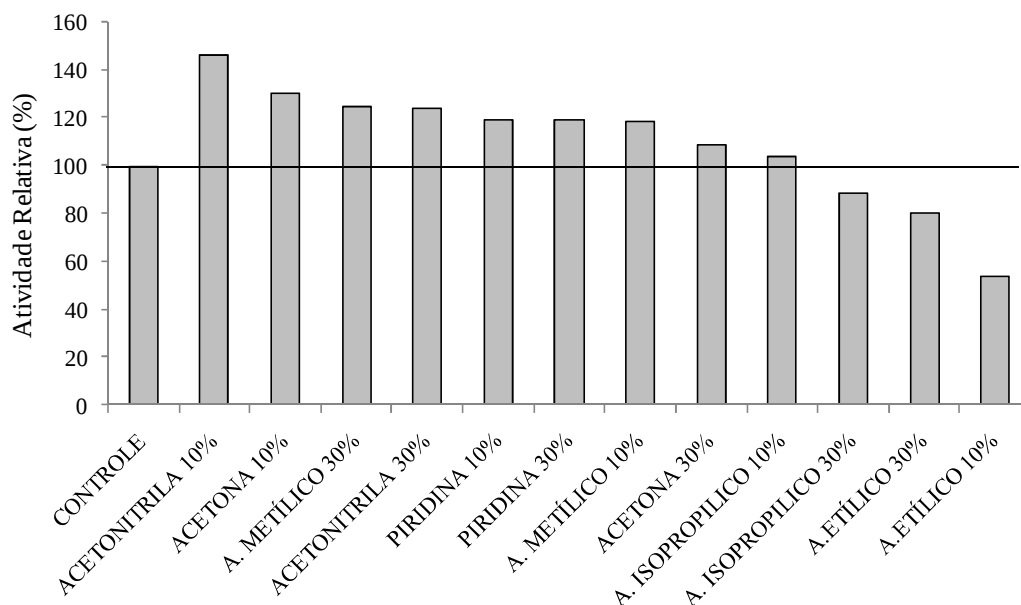


Figura 5.6. Influência dos solventes na atividade hidrolítica da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada, pH 5 e 37°C.

Segundo Pereira (2001) a inibição da atividade enzimática na presença de solventes é decorrente da diminuição da camada de hidratação presente próximo ao sítio ativo, a qual é necessária para que a enzima realize suas atividades. Essa atividade pode também ser relacionada ao $\log P$, que é um coeficiente indicador da hidrofobicidade das substâncias, e é usado como medida da polaridade.

Estudos mostram que geralmente a atividade enzimática é baixa em solventes que apresentam $\log P$ (logaritmo do coeficiente de partição num sistema bifásico padrão octanol/água) menor do que 2, é moderada em solventes com $\log P$ entre 2 e 4, e é alta em solventes apolares com $\log P$ maior do que 4. Portanto, o aumento na polaridade do solvente causa o aumento da quantidade ótima de água necessária à reação, pois solventes com maior afinidade pela água tendem a removê-la em maior quantidade da superfície da proteína. Os valores do $\log P$ para os solventes estudados são: etanol -0,24; acetona -0,23; isopropanol 0,29; acetonitrila -0,33; metanol -0,76; piridina 0,71 (ADLERCREUTZ, 2000; AHMAD *et al.*, 1998). Os resultados obtidos neste trabalho não confirmam a regra geral, pois os solventes utilizados apresentam baixos $\log P$ e resultaram em maiores atividades enzimática quando na presença da maioria dos solventes. Portanto, verifica-se nesse estudo que os valores moderados de $\log P$ são satisfatórios para a atividade do biocatalisador.

5.3. PRODUÇÃO DE EMULSIFICANTES A PARTIR DE LIPASES

5.3.1 Procedimento Experimental Univariável para Lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 Livre e Imobilizada

Os experimentos utilizando a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 foram realizados para determinação das condições ótimas avaliando separadamente os fatores utilizando o procedimento experimental mais difundido e usual, “one-at-a-time”, estudo de uma variável por vez, no qual é avaliada uma das características estudadas a diferentes condições e as demais são fixadas. Foram estudados os efeitos da temperatura (45-62,5°C), da concentração de ácido (840-4200mM), massa de enzima livre ou imobilizada (0,25-7,88% m/m) e estabilidade operacional.

5.3.1.1 Efeito da Temperatura

Neste trabalho foram realizados estudos preliminares, sem peneira molecular, mas não ocorreu a conversão na reação de esterificação em diferentes temperaturas, provavelmente devido à presença da água em excesso. Na literatura, de acordo com o uso de agentes dessecantes, como peneiras moleculares ou hidratos de sal, pode ser adicionado ao sistema para remover a água produzida pela reação (SEKEROGLU *et al.*, 2004; CASTRO *et al.*, 1997). Portanto, passou-se a utilizar a peneira molecular para toda a reação.

A temperatura foi modificada entre 45-62,5°C, observando-se a influência da temperatura na formação do laurato de isopropila. A lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre e imobilizada apresentou maior atividade de esterificação do ácido láurico a 52,5°C (Figura 5.7). Pode ser observado que acima de 52,5°C ocorreu a diminuição da atividade de esterificação. O perfil da temperatura reacional para esterificação é obtido entre 30 e 62°C de acordo com MALCATA *et al.* (1990). No entanto, em reações catalisadas por lipases, a temperatura influencia a velocidade inicial de reação e estabilidade da enzima e na maioria dos casos, a velocidade de reação aumenta com a temperatura, enquanto a estabilidade das enzimas diminui (MAHAPATRA *et al.*, 2009; FORESTI e FERREIRA, 2007). No trabalho realizado por Sekeroglu *et al.* (2004) a lipase de *Candida antarctica* imobilizada (Novozyme 435) exibiu atividade máxima a 60°C para a síntese de laurato isopropílico de álcool

isopropílico e ácido láurico e diversos estudos relatam que lipases também catalisam as reações de síntese a alta temperatura até 55°C (SUN *et al.*, 2009; KANWAR *et al.*, 2007; DANDWATE e MADAMVAR, 2007).

A influência da temperatura ótima da enzima varia com a técnica de imobilização escolhida, pois cada uma apresenta características únicas e dependência de fatores como, por exemplo, a fonte de enzima, tipo de suporte, método de imobilização de enzimas e interação com o suporte (JOSÉ e PRADO, 2005; PEREZ *et al.*, 2007). Paula *et al.* (2008) confirmaram essas informações, trabalhando à temperatura ótima em sistemas imobilizados obtidos por adsorção física (40°C) e covalentes (55°C) e foi comparado com a temperatura ótima da lipase livre (37°C) durante a esterificação do butanol com o ácido butírico. Resultados semelhantes foram observados por Abdullah *et al.* (2009), no qual a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em aminopropil-mesoporoso SBA-15 foi investigada com base no rendimento da esterificação do citrônol com ácido láurico com a temperatura ideal também a 40°C. Essa diferença pode ser justificada por meio de uma proteção favorecida pela imobilização, resultando em atividades iguais ou superiores aos da lipase livre de 37°C.

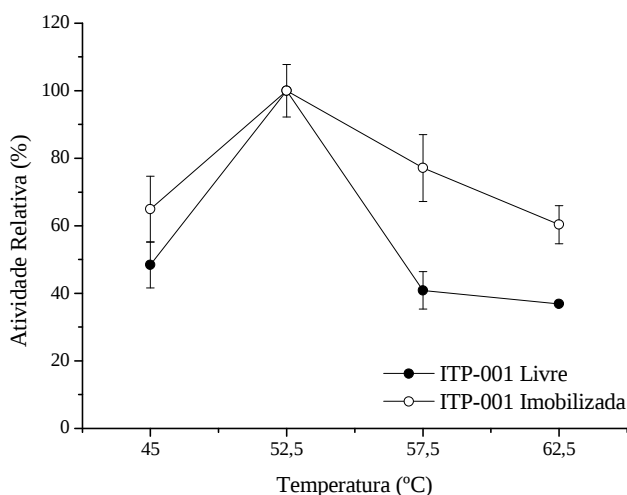


Figura 5.7. Efeito da temperatura sobre a atividade de esterificação da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre (●) com massa de enzima de 0,75% (m/m) e imobilizada (○) com massa de enzima de 5,25% (m/m) e razão molar de 1:3 (álcool:ácido) ou 3000mM de ácido láurico.

5.3.1.2 Efeito da Concentração de Ácido

Neste trabalho foi avaliada a quantidade de reagentes utilizando a enzima livre e imobilizada. A concentração molar dos reagentes são parâmetros importantes na reação catalisada por enzima de tal forma que o rendimento esperado é elevado com o uso mínimo de substratos (KANWAR *et al.*, 2005a; PAULA *et al.*, 2008).

Sun *et al.* (2009) estudaram a relação do tipo de ácidos graxos e etanol para esterificações catalisadas pela lipase de *Rhizopus chinensis* em n-heptano, a 40°C em 30h. Sete ácidos graxos foram testados e os ácidos caprílico, cáprico e láurico foram os três mais eficientes doadores acila para a enzima. Assim, foram realizadas esterificações com ácido caprílico e sete diferentes álcoois lineares em n-heptano, e a enzima apresentou uma afinidade particular para o etanol e n-propanol, com conversões cerca de 93% com tempo reacional de 20h. Este estudo mostra que o ácido láurico e álcool isopropílico têm cadeias de carbono necessárias para realizar a esterificação com lipase, confirmando a escolha do reagente neste trabalho para a produção de emulsificantes.

O conteúdo inicial de ácido láurico na reação de esterificação com álcool isopropílico nesse estudo variou de 840 a 4200mM para enzima livre e imobilizada. Os resultados obtidos mostram a relação entre o conteúdo inicial de ácido láurico na reação para a atividade de esterificação da lipase livre e imobilizada (Figura 5.8) e são consistentes considerando quanto à mudança na concentração inicial, provavelmente devido à carga de enzima oferecida. O máximo consumo de ácido láurico na reação do ácido láurico com álcool isopropílico foi obtido com 7000mg ou 3000mM, quando comparado com o da literatura, podemos concluir que o uso da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada mostrou diferente em relação à Novozyme 435, 0,686 para 30 μ mol.mLmin⁻¹, segundo Sekeroglu *et al.* (2004). Para a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre os valores foram de 7.233 μ mol.mLmin⁻¹ a 11,25mg ou 2340mM de ácido láurico.

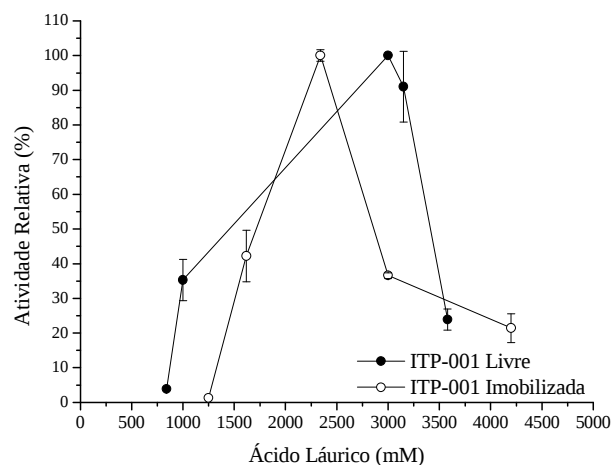
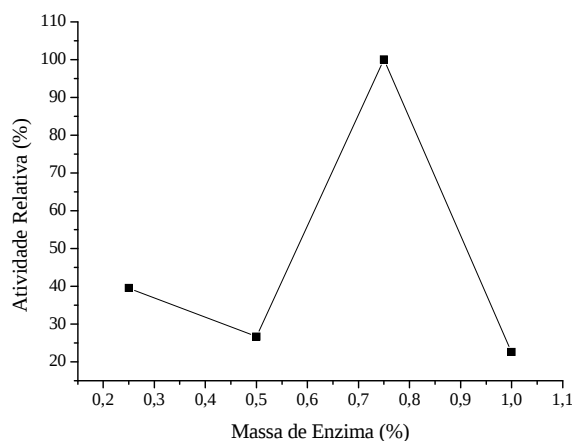


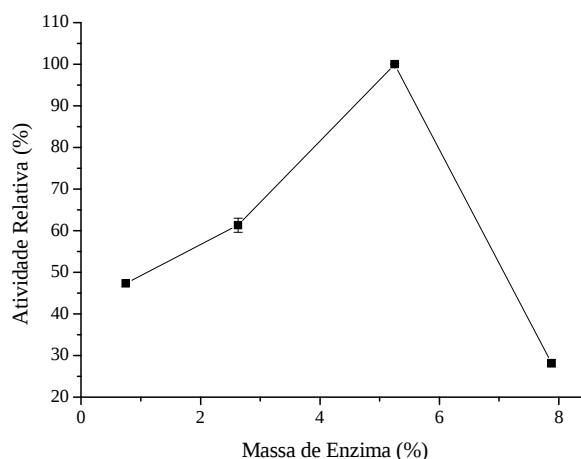
Figura 5.8. Efeito da concentração de ácido na atividade de esterificação da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre (●) com massa de enzima de 0,75% (m/m) e imobilizada (○) com massa de enzima de 5,25% (m/m), à 52,5°C.

5.3.1.3 Efeito da Massa de Enzima

Os valores para a reação de esterificação utilizando lipase livre e imobilizada variaram a depender da massa de enzima livre e imobilizada entre 0,25-0,75% (m/m) e 0,75-7,88% (m/m) em relação ao meio reacional, respectivamente. Os resultados obtidos para maiores atividades de esterificação foram de 0,75% m/m (270 U) para a lipase livre (Figura 5.9.a) e 5,25% m/m (180 U) para a lipase imobilizada (Figura 5.9.b).



(a)



(b)

Figura 5.9. Efeito do percentual da massa da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre para reação de esterificação com razão molar de 1:3 (álcool:ácido) ou 3000mM de ácido láurico, à 52,5°C (a) e imobilizada para reação de esterificação com razão molar de 1:2,34 (álcool:ácido) ou 2340mM de ácido láurico, à 52,5°C 2340mM (b).

Mahapatra *et al.* (2009) estudaram o efeito da quantidade de enzima na esterificação de acetato de n-butila e acetato de n-propila, no qual foi variado a massa de lipase de *Rhizopus oligosporus* imobilizada em gel de sílica reticulada de 2,5% (1,5U/mL) a 30% (18U/mL) (m/v) a 30°C, foi observado que 50 e 56% de conversão molar de síntese pode ser alcançada após 24 h de reação a uma concentração de enzima de 25% (15U/mL). Ao aumentar a quantidade da enzima adicionada, a velocidade de reação não aumentou significativamente, o que pode ser devido à falta de substrato para acessar o sítio ativo da enzima, e/ou dificuldade em manter a suspensão uniforme dos biocatalisadores nas maiores massas de enzima.

A conversão do butanol, utilizando diferentes massas de lipase imobilizada em STY-DVB, foi avaliada em substratos constituídos de ácido butírico e butanol na proporção molar de 1,5. As sínteses foram realizadas a 37°C e as massas de lipase imobilizada variaram entre 5% e 60% (80 a 1000 mg, respectivamente) da massa total dos reagentes contidos em 20 mL de substrato em heptano. Valores iguais ou superiores a 15% da massa total de reagentes levaram a uma transformação quase completa no prazo de 24h de reação. Essa concentração é semelhante à utilizada por muitos pesquisadores em estudos experimentais com Lipozyme e

outras lipases imobilizadas com aproximadamente 100%, resultando em maior atividade de esterificação (OLIVEIRA *et al*, 2000;. ABDULLAH *et al*, 2009).

5.3.1.4 Estabilidade Operacional da Lipase Imobilizada

A estabilidade operacional da lipase imobilizada é também uma característica importante que pode contribuir para redução de capital e custos de operação de produção industrial, uma vez que a enzima livre carece de reciclagem. Em geral, as enzimas são difíceis de ser recuperadas e reutilizadas. A recuperação e reutilização da lipase imobilizada sobre o suporte são aspectos importantes que merecem uma maior investigação (PARK *et al.*, 2010; ABDULLAH *et al.*, 2009). Neste estudo, a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada em matrizes hidrofílicas foram utilizadas como biocatalisador para a reação de esterificação de ácido láurico com álcool isopropílico por 10min e, posteriormente, recuperados e reutilizados. Os dados de atividade residual apresentada na Tabela 5.4, mostraram atividade na ordem de apenas 57% na segunda reutilização.

Tabela 5.4. Estabilidade operacional da enzima imobilizada na reação de esterificação de 3000mM de ácido láurico com álcool isopropílico e massa de lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 de 5,25% (m/m), em 10min, a 52,5°C.

Ensaio	Atividade (U/g)	Atividade Relativa (%)
1	267,18	100
2	152,68	57.14
3	0	0

Abdullah *et al.* (2009) estudaram as enzimas imobilizadas no SBA-15 e FSBA-15. As enzimas imobilizadas foram repetidamente utilizadas como biocatalisador para a reação de esterificação do ácido láurico e citronelol e, posteriormente, recuperados e reutilizados. Concluindo que a atividade das enzimas imobilizadas diminui ligeiramente com o aumento do número de reutilizações e a manutenção da atividade da enzima imobilizada em FSBA-15 foi considerada melhor do que o do SBA-15, a atividade de 90% da enzima imobilizada em FSBA-15 foi mantida mesmo após 4 ciclos de uso. Um dos objetivos mais importantes da tecnologia de imobilização de enzimas é de reforçar a estabilidade conformacional da enzima.

O grau de estabilização depende da estrutura da enzima, dos métodos de imobilização e do tipo de suporte.

5.3.2 Planejamento Experimental Fatorial para Lipase de *Candida rugosa* Livre e Imobilizada.

A partir das variáveis (temperatura, razão molar e massa de enzima) observadas para lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre e imobilizada foi utilizado o planejamento de experimentos para o estudo da lipase de *Candida rugosa* livre e imobilizada. O uso do planejamento de experimentos tem-se tornado uma poderosa estratégia a fim de minimizar o número de experimentos e aumentar a confiabilidade da caracterização bioquímica de diferentes reações enzimáticas obtendo condições otimizadas. O planejamento fatorial é uma ferramenta muito útil devido à sua simplicidade, confiabilidade e análise de dados rápida, examinando a superfície de resposta (RSM) (FORESTI e FERREIRA, 2010; SHAW *et al.*, 2008).

Foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 , com repetição no ponto central para avaliar a variável resposta, em função dos seguintes fatores: temperatura (52,2°C, 57,5°C e 62,5°C) e massa da enzima lipase de *Candida rugosa* livre (0,25; 0,50; 0,75 m/m) e imobilizada (2,5; 5,25; 3,375% m/m) no meio reacional. Três experimentos foram realizados no ponto central para estimativa do erro experimental. Os resultados foram analisados empregando o Programa Statistica versão 7.0.

Os resultados obtidos para a síntese mostram a influência positiva da temperatura, onde o aumento desta variável na reação em meio orgânico implicou em uma maior atividade da lipase, neste caso o aumento da temperatura provocou um aumento na velocidade da reação, favorecendo a formação de produto independentemente da massa de enzima presente no meio reacional.

Verificou-se que a maior conversão para a enzima livre foi de 26,13% para 62,5°C com a massa de enzima de 0,75%. Para a enzima imobilizada a maior conversão foi 35,93% para 62,5°C com a massa de enzima de 5,25% (Tabela 5.5).

Tabela 5.5. Matriz de planejamento de experimento e conversão do ácido láurico pela lipase de *Candida rugosa* livre e imobilizada.

Ensaio	Nível		Conversão (%)	
	X ₁	X ₂	Lipase de <i>Candida rugosa</i> livre.	Lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada.
1	-1	-1	14,62	15,78
2	+1	-1	16,97	13,36
3	-1	+1	7,9	15,4
4	+1	+1	26,13	35,93
5	0	0	19,45	15,16
6	0	0	16,34	3,95
6	0	0	22,56	5,98

Podemos observar nos gráficos de superfície de resposta que o aumento das variáveis causam o aumento na síntese para a enzima livre e imobilizada (Figure 5.10 a,b)

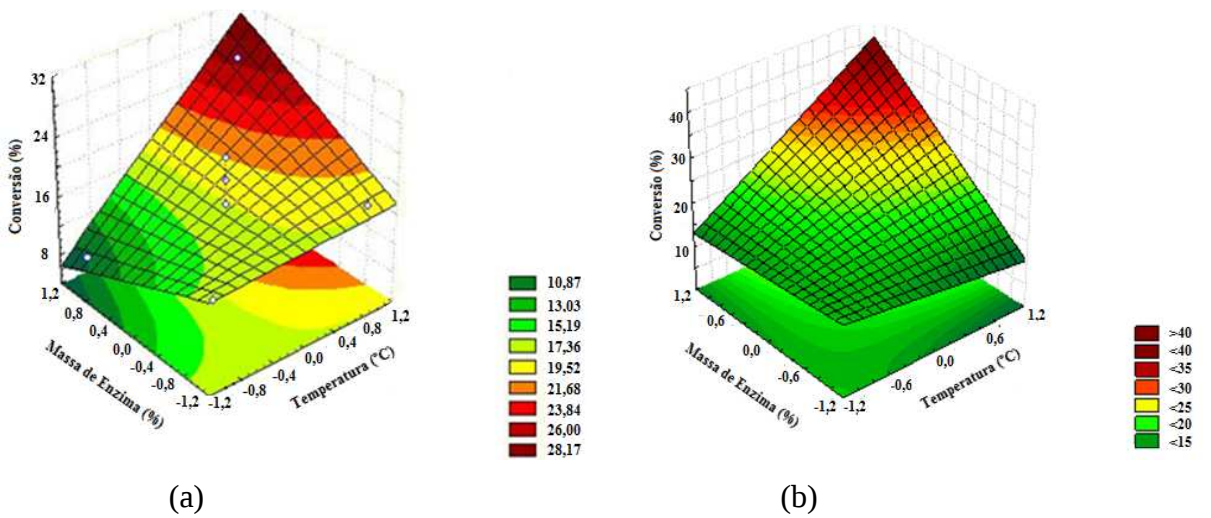


Figura 5.10. Superfície de resposta para a produção de laurato de isopropila utilizando lipase de *Candida rugosa* livre (a) e imobilizada (b).

A Tabela 5.6 apresenta a estimativa de efeito das variáveis e suas interações a partir da análise do planejamento fatorial. Pode ser notado que a temperatura é a variável mais significativa.

Tabela 5.5. Estimativa de efeito na produção de laurato isopropílico a partir da conversão de ácido láurico usando lipase de *Candida rugosa* livre e imobilizada.

Variável	Estimativa		Erro Padrão		Valores de p	
	Livre	Imobilizada	Livre	Imobilizada	Livre	Imobilizada
Média Global	17,71*	8,36	±1,29*	±3,44	0,000847*	0,268778
X ₁ : Temperatura	10,29*	9,05*	±3,42*	±3,42*	0,057560*	0,123367*
X ₂ : Massa de enzima	1,22	23,50	±3,42	±3,42	0,745427	0,745427
X ₁ X ₂	7,94*	11,47*	±3,42*	±3,42*	0,103396*	0,103396*

R²=0,89; p≤0,15

5.4 PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS

Inicialmente foi avaliada a produção de ésteres etílicos a partir do óleo de soja na presença da lipase de *Candida rugosa*, apresentando resultados nas razões molares e carregamentos conforme na Figura 5.11. Com base em dados da literatura verificou-se nesse trabalho a eficiência da enzima lipase *Candida rugosa* para a produção de ésteres etílicos. Portanto, realizou-se o estudo utilizando o carregamento de (25, 250 e 500U) onde a condição ótima foi alcançada com 500U oferecidas de LCR livre e imobilizada para a produção de ésteres etílicos mantendo as seguintes razões molares a 40°C; 1:6 e 1:18. O máximo rendimento global da reação utilizando óleo de soja e etanol foi de 32,68%, na razão molar 1:18 com o tempo de reações de 96h para enzima livre. Desempenhos inferiores foram obtidos pelas preparações de Lipolase e lipase pancreática com formação total em de ésteres etílicos 25,50 e 9,1% respectivamente (MOREIRA RAMOS, 2007).

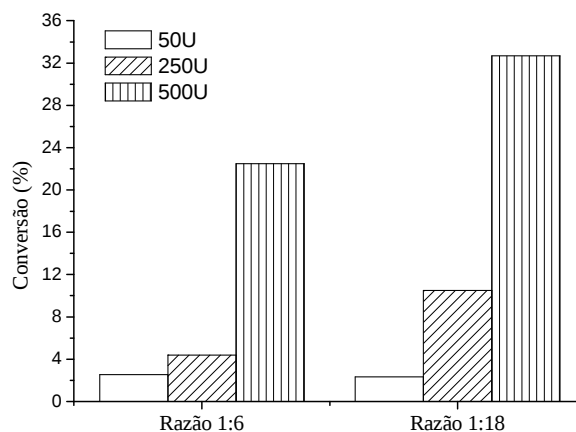


Figura 5.11. Conversão em ésteres etílicos utilizando a lipase de *Candida rugosa* livre, 96h, 40°C, sem solvente.

O mesmo teste foi realizado com a enzima imobilizada, Figura 5.12. Verificou-se que o máximo rendimento global da reação utilizando a enzima imobilizada foi de 34,61% com 120h de reação na razão molar de 1:6. Observa-se um maior tempo reacional comparado à enzima livre, possivelmente devido ao efeito de resistência da transferência de massa oferecida pelo suporte para a difusão do substrato no interior da matriz, isto é, a maior dificuldade de acessibilidade do substrato e da saída do produto do interior do sistema imobilizado quando da enzima quando comparada a enzima livre (FREIRE, 1988).

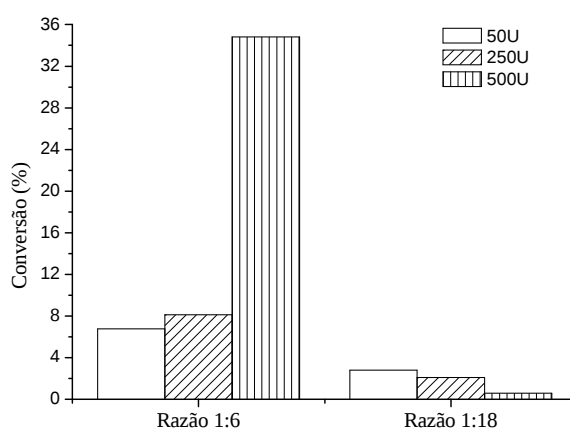


Figura 5.12. Conversão em ésteres etílicos utilizando a lipase de *Candida rugosa* imobilizada, 120h, 40°C, sem solvente.

Observa-se na comparação da enzima livre e imobilizada, o aumento da temperatura para 50°C não apresentou conversão para ambas enzimas. No entanto, o aumento da razão molar óleo:álcool e o aumento do carregamento do catalisador aumentam a conversão em ésteres etílicos para a enzima livre, porém para a enzima imobilizada o aumento da razão molar e consequentemente elevado excesso de etanol influenciou negativamente. Alguns trabalhos relatados na literatura apresentam que o excesso de álcool em reações de transesterificação com enzimas imobilizadas reduz a conversão em ésteres etílicos devido ao efeito de inativação do sistema imobilizado (ISO *et al.*, 2001; HSU *et al.*, 2003).

De acordo com o estudo realizado por Pereira *et al.* (2001) a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em quitosana apresentou uma conversão molar de apenas 26%, possivelmente devido a presença de etanol como doadores do grupo acila no meio reacional ocasionando danos a camada de hidratação da interação camada-protéica ou na estrutura da enzima, resultando numa inibição parcial ou total da preparação enzimática ou também possivelmente a redução da disponibilidade do álcool na fase líquida interrompendo a reação de transesterificação.

A inibição causada pelo álcool pode ser minimizada com a adição de solventes apolares no meio reacional das reações de alcoóis como substratos. O terc-butanol tem sido bastante utilizado alcançando altos rendimentos em ésteres (ROYON *et al.*, 2010). Neste sentido foi realizado teste utilizando o terc-butanol como solventes na reação do óleo de soja com a lipase de *Candida rugosa* livre e imobilizada. Como se pode observar na Figura 5.13 os resultados não foram satisfatórios, diminuindo a conversão quando comparada a reação sem solvente.

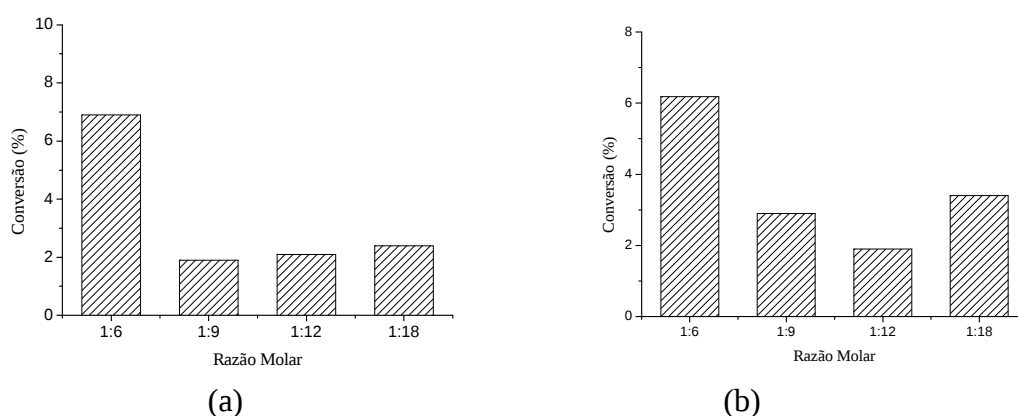


Figura 5.13. Conversão em ésteres etílicos utilizando LCR livre (a) e imobilizada (b), 96h, 40°C, na presença de terc-butanol.

Estudos comprovam que a lipase mantém maior atividade na presença de solventes com baixa polaridade, assim foi testado à reação na presença de n-hexano (Tabela 5.7). Os resultados para a produção de ésteres foram insatisfatórios quando comparados com a literatura. Os ensaios foram realizados com a lipase de *Candida rugosa* livre. Entretanto, apesar da lipase de *Candida rugosa* livre apresentar baixa conversão em ésteres, a conversão em monoglicerídeos apresenta-se como interessante para a aplicação na produção de diversos bioprodutos, como por exemplo emulsificantes utilizados para produção de polímeros e tintas (LIU *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2004).

Tabela 5.7. Produção de ésteres, mono, di e triglicerídeos utilizando LCR.

Lipase	Ésteres (%)	Mono (%)	Di (%)	Tri (%)
Livre	16,73	61,90	21,40	0,00
Imobilizada	0,27	12,90	24,10	62,70

A variação de óleos para reações de transesterificação com *Candida rugosa* na forma livre e imobilizada não apresentaram resultados para a produção de ésteres etílicos. Nas mesmas condições de estudo avaliou-se a lipase *Bacillus* sp. ITP-001 livre e imobilizada, contudo não foi observada produção de ésteres etílicos na transesterificação de diferentes óleos vegetais.

5.5 ESTABILIDADE EM SUPERCRÍTICO

Após a avaliação do potencial das lipases livres e imobilizadas na hidrólise do azeite de oliva, na síntese de laurato de isopropila e na produção de ésteres etílicos verificou-se a estabilidade dos biocatalisadores na presença de fluidos supercríticos. Devido aos resultados não satisfatórios para a produção de ésteres etílicos selecionou-os sistemas reacionais que apresentaram as maiores atividades, foram elas: reação de hidrólise e esterificação.

5.5.1 Estabilidade da Lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 e de *Candida rugosa* Livre

Neste item será avaliada a perda ou ganho de atividade de hidrólise e de esterificação das enzimas livres e imobilizadas após o tratamento com propano supercrítico. As atividades enzimáticas foram realizadas após as enzimas serem submetidas ao propano supercrítico por 1h em temperaturas (45, 52 e 60°C) e pressões (50, 115 e 200bar), onde a atividade foi medida em intervalos de tempos após o tratamento (0, 1, 2 e 6h).

A atividade de hidrólise e de esterificação lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 e lipase de *Candida rugosa* livre depois de submetidas ao propano supercrítico são apresentadas nas Figuras 5.14 a 5.17. Os experimentos foram realizados na temperatura (T) de 45-60°C, pressão de 50-200bar e diferentes tempos (t) para todas as condições.

Na atividade de hidrólise da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 observa-se que quando submetida a altas temperaturas (60°C) e independente da variação de pressão a atividade hidrolítica não é afetada e o ganho é aproximadamente 15%. Na presença de baixa temperatura houve perda de atividade, independente da pressão, a maior atividade em altas temperaturas pode ser explicada pela estabilidade desta enzima a 80°C (BARBOSA *et al.*, 2010). Portanto, as melhores condições foram 60°C/200bar e 60°C/50bar, mantendo uma atividade e ganhos constantes, nas demais condições a atividade menos que 0% significa que é inferior a atividade hidrolítica da enzima antes de ser submetida ao fluido supercrítico (1693U/g) (Figura 5.14).

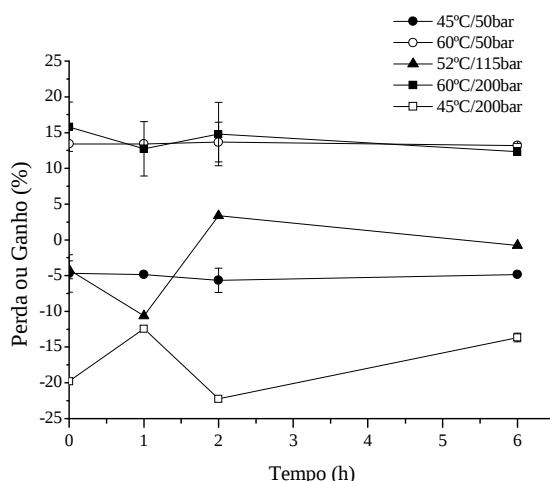


Figura 5.14. Perda ou ganho da atividade de hidrólise da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre depois de submetida ao propano supercrítico.

Em testes com lipase de *Candida rugosa* observou-se que todas as condições resultaram em ganho de atividade de hidrólise, sendo que em temperaturas baixas e alta pressão (45°C/200bar e 52°C/115bar) o ganho de atividade de hidrólise ultrapassou 350%, no entanto, para baixas pressões o ganho não ultrapassou 200%. Observa-se que as melhores condições (52°C/115bar e 45°C/200bar) não apresentaram mudanças significativas em sua atividade hidrolítica após o tempo inicial, conforme Figura 5.15. Nas condições de 45°C/50bar, 60°C/50bar e 60°C/200bar o ganho de atividade hidrolítica da enzima foi próxima a atividade antes de ser submetida ao fluido supercrítico (2550U/g). Esse perfil também foi observado anteriormente para a atividade da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 em sua melhor condição (60°C/200bar e 60°C/50bar).

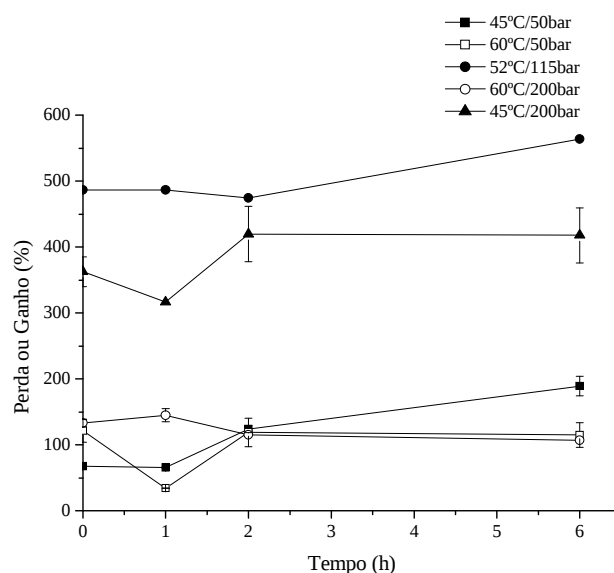


Figura 5.15. Perda ou ganho da atividade de hidrólise da lipase de *Candida rugosa* livre depois de submetida ao propano supercrítico.

Primozic *et al.* (2003) avaliaram a hidrólise de óleo de girassol em presença de Lipolase 100T[®] (lipase de *Aspergillus niger*), utilizando CO₂ supercrítico e a maior conversão de ácido oléico (0,193 g/g) e ácido linoléico (0,586 g/g) foi obtida a 50°C e 200bar, apresentando similaridade com as temperaturas e pressões das melhores condições desse trabalho.

O uso de fluido supercrítico torna-se atraente para a aplicação da enzima e o aumento da atividade foi observada nas reações realizadas no tempo inicial (0), onde as melhores condições para o ganho de atividade apresentou-se constante ou alteração não significativa no decorrer do tempo. Tal vantagem é importante quando comparado ao estudo de Freitas *et al.*

(2007) na hidrólise do óleo de soja utilizando lipase pancreática de suínos em condições normais a 40°C, onde a conversão máxima de 70% foi alcançada apenas depois de 24h de reação.

Na atividade de esterificação da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 no tempo inicial houve ganho de 500% quando a enzima foi submetida a 45°C/200bar, mas o aumento da temperatura a 60°C apresentou influência negativa e o ganho de atividade diminuiu para 240%. O desempenho em alta temperatura foi positivo com a diminuição da pressão e atingiu 190% de ganho na atividade na condição de 60°C/ 50bar. Nos intervalos de 1, 2 e 6h, a lipase de *Bacillus* sp ITP-001 apresentou uma perda da sua atividade, alcançando a perda total na maioria das condições, com atividade de esterificação igual ou menor do que a antes de ser submetida ao fluido supercrítico (1402U/g) (Figura 5.16).

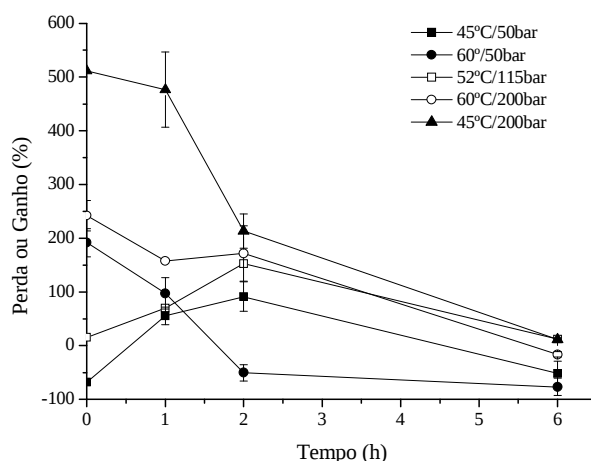


Figura 5.16. Perda ou ganho da atividade de esterificação da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre depois de submetida ao propano supercrítico.

Na Figura 5.17 observou-se que a atividade de esterificação da lipase de *Candida rugosa* foi influenciada positivamente em todas as condições no tempo inicial, atingindo a perda de atividade de esterificação após 6h, possivelmente devido à inativação da enzima, com atividade de esterificação inferior à atividade antes de ser submetida ao fluido supercrítico (1545U/g). No entanto, quando submetidos à alta temperatura e baixa pressão, o mesmo ganho se manteve em tempos posteriores, que pode ser explicado por meio da manutenção de conformação da enzima que após ter sido submetido ao fluido supercrítico

realizou conversões em ganhos significativos, o ganho de atividade constante também foi observado para a reação de hidrólise (Figura 5.15).

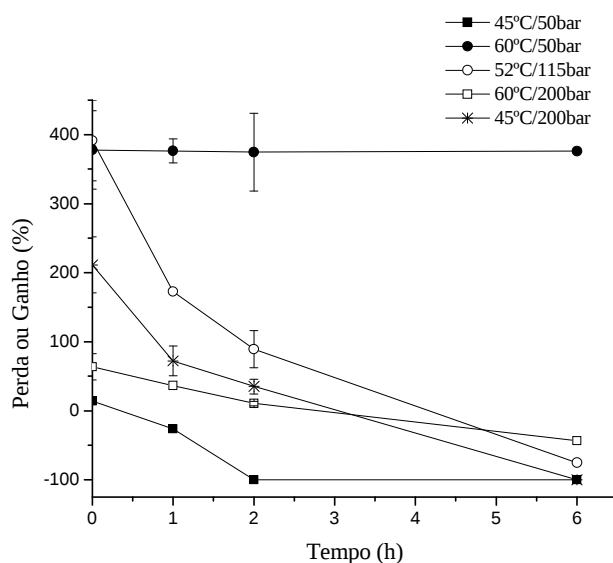


Figura 5.17. Perda ou ganho da atividade de esterificação da lipase de *Candida rugosa* livre depois de submetida ao propano supercrítico.

De acordo com Rezaei *et al.* (2007), embora as enzimas sejam ativas em supercrítico, o aumento da pressão pode afetar sua atividade devido à diminuição do coeficiente de difusão, em algumas situações a atividade melhora com o aumento da temperatura. Mas a combinação de temperatura e pressão varia de acordo com o tipo de enzima. O comportamento da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 (hidrólise e esterificação) e *Candida rugosa* (hidrólise) se opõem ao descrito por Rezaei *et al.* (2007), possivelmente devido ao coeficiente de difusão de substratos para os sítios ativos das enzimas serem afetados positivamente após a submissão ao fluido supercrítico em pressões mais altas. Este comportamento é devido à enzima ser uma molécula complexa em que a pressão e a temperatura afetam a densidade e propriedades de transporte (viscosidade, condutividade térmica e difusividade) de fluido supercrítico, a solubilidade e transporte de reagentes e produtos para a enzima (RANDOLPH *et al.*, 1991).

Ikushima *et al.* (1996) estudaram a atividade de esterificação da lipase de *Candida cylindracea* utilizadas na esterificação e observaram que a velocidade de reação depende da pressão, provocando um aumento em 7,55MPa, pressão próximo ao ponto crítico do CO₂ supercrítico. Este aumento tem explicado as interações entre o dióxido de carbono e conformação de moléculas de enzimas em síntese no sítio ativo.

No entanto, nem todas as enzimas apresentam maior atividade quando submetidas a CO₂ supercrítico devido à polaridade deste líquido, resultando em problemas de dissolução dos compostos hidrofóbicos e hidrofílicos (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2001). Outro efeito também causado pelo FSC CO₂ é a formação de ácido carbónico e carbamatos na camada de hidratação da enzima, tornando-se uma barreira para o substrato ultrapassar e acessar o sítio ativo da enzima (HARPER e BARREIROS, 2002; KAMAT *et al.*, 1995). Habulin e Knez (2001) realizaram o estudo da estabilidade e da atividade de esterificação de ácido n-butírico com o etanol e o álcool isoamílico, na presença de lipases diferentes e ausência de solvente à pressão atmosférica, CO₂ e propano a 100bar e 40°C. Notou-se que na presença de CO₂ houve grande perda na atividade da lipase e a diminuição da atividade relativa foi atribuída, além da interação entre o CO₂ e a enzima, como também à diferença na partição de água entre a enzima e sua vizinhança. No entanto, o uso de propano aumentou a atividade de lipases de pâncreas suíno e *Rhizopus javanicus*.

O outros solventes como propano quando utilizado lipase, tem crescido devido às diferentes partições de água no solvente

5.5.2 Estabilidade da Lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 e de *Candida rugosa* Imobilizadas

Após os experimentos com as lipases livres, foram escolhidas duas condições para experimentos com a enzima imobilizada: 60°C e 200bar (lipase de *Bacillus* sp. ITP-001) e 45°C e 200bar (lipase da *Candida rugosa*). Após a enzima submetida ao fluido supercrítico, as atividades realizadas foram a de hidrólise e esterificação no tempo de 1, 2, 6 e 12h.

Nota-se na Figura 5.18 e 5.19 que houve perda de atividade na hidrólise para as duas enzimas, onde a perda na atividade foi menor do que a atividade antes da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 (676U/g) e lipase de *Candida rugosa* (378U/g) serem submetida ao propano supercrítico. Para a esterificação após 1h a atividade foi maior do que no tempo inicial, possivelmente devido à conformação da lipase e sua estrutura, sendo que após 2h houve perda de atividade de esterificação, alcançando atividade inferior comparada com o valor antes de ser submetida ao fluido supercrítico (233U/g). A diferença de comportamento entre as reações de hidrólise e esterificação deve-se possivelmente ao acesso do substrato e à alteração dos aminoácidos residuais do sítio ativo provocada pelo fluido supercrítico, pois quando imobilizadas, os reagentes devem primeiramente se difundir através do fluido para a

superfície das partículas, que atravessam uma camada estagnada e, em seguida, difundem-se nos poros da enzima, por conseguinte, o processo interno de difusão depende das modificações na conformação da enzima (FREIRE, 1988).

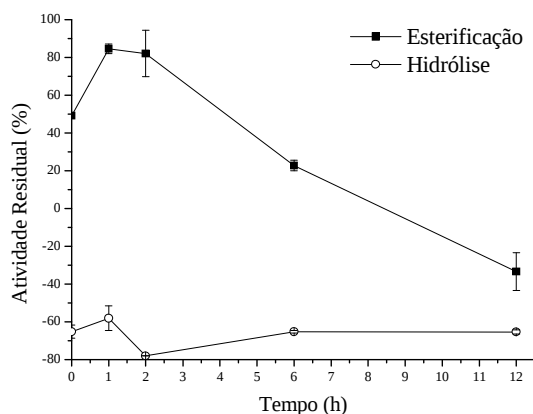


Figura 5.18. Perda ou ganho da atividade de hidrólise (○) e esterificação (■) para lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada, depois de submetido a propano supercrítico (60°C e 200bar).

A lipase de *Candida rugosa* conforme Figura 5.19 apresentou mesmo perfil da *Bacillus* sp. ITP-001, porém para a atividade de esterificação apresentou o maior resultado com atividade residual superior a 1000% até 2 h, sendo que após esse tempo alcançou atividade inferior quando comparada com o valor antes de ser submetida ao fluido supercrítico (104U/g).

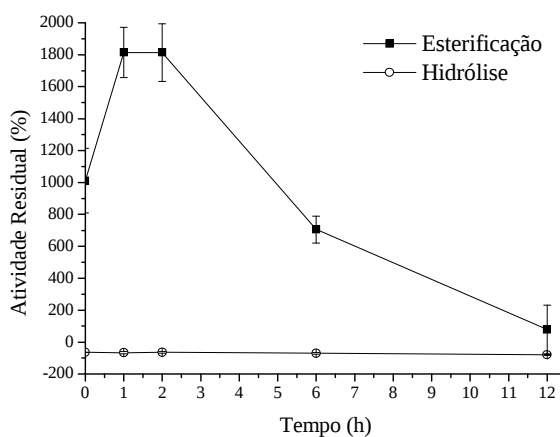


Figura 5.19. Perda ou ganho da atividade de hidrólise (○) e esterificação (■) para lipase imobilizada de *Candida rugosa*, depois de submetido a propano supercrítico (45°C e 200bar).

Romero *et al.* (2005) relataram que para a lipase imobilizada comercial em resina de troca iônica, Novozyme 435, foi altamente eficiente para a reação de esterificação do álcool isoamílico em contínuo, utilizando dióxido de carbono supercrítico, cuja conversão foi de 100%, permanecendo estável por 30 dias. A atividade catalítica foi mantida ativa nas pressões que variam de 80°C em 300bar, porém, a influência da temperatura foi observada negativa após 586°C na produção de acetato de isoamila.

Resultados opostos foram encontrados por Habulin *et al.* (2007) que estudaram a estabilidade da lipase imobilizada de *Candida antarctica* B. (Novozyme 435) em CO₂ supercrítico, a esterificação do ácido láurico e citrionelol em diferentes solventes orgânicos e líquidos iônicos. Atividade residual da lipase exposta ao CO₂ supercrítico diminuiu ligeiramente, resultando em menor concentração do éster na primeira hora da reação. Essa perda da atividade residual pode ser explicada pela extração da água essencial da enzima, o que foi confirmado pelo método de Karl-Fischer, em que a lipase não tratada continha 1,44% de água, enquanto na lipase tratada por CO₂ supercrítico continha apenas 0,88% de água. A presença de água é um fator determinante da estabilidade da enzima em FSC.

O mesmo comportamento foi observado por Oliveira *et al.* (2006), que estudaram a lipase imobilizada *Yarrowia lipolytica* em suporte hidrofóbico e incubadas em diferentes solventes supercríticos. Os resultados mostraram uma maior perda de atividade em dióxido de carbono (29%), com menor perda de atividade em propano (1,5%) e n-butano (1,4%), que impulsiona os estudos da lipase em propano supercrítico, devido à baixa constante dielétrica, características constantes deste solvente, favorecendo a ativação interfacial, e hidrofobicidade, se comportando como um líquido convencional.

Capítulo 6

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho, que envolveu a caracterização bioquímica da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada pela técnica sol-gel na hidrólise do azeite de oliva, produção de emulsificantes a partir da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 e *Candida rugosa* livre e imobilizada, produção de ésteres etílicos e estabilidade das lipases na presença do propano supercrítico, permitiram as seguintes conclusões:

- O rendimento de imobilização foi de 28% para a enzima lipase de *Candida rugosa* e 43% para a enzima lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 na presença do aditivo polietilenoglicol;
- Na caracterização bioquímica a lipase do novo isolado de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada pela técnica de encapsulamento sol-gel apresentou maior atividade, na reação de hidrólise do azeite de oliva, quando submetida ao pH 5 e temperatura de 80°C, a sua estabilidade térmica foi a 37°C. A atividade enzimática foi estimulada pelos íons EDTA, FeCl₃, MnCl₂, ZnCl₂ e quase todos os solventes orgânicos utilizados, exceto para o álcool etílico e isopropílico. Os valores de V_{max} e K_m foram respectivamente 0,102mol/min.g e 14,62mmol determinados pelo método de Lineaweaver-Burk;
- Para a reação de esterificação na conversão em laurato de isopropila utilizando a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre a temperatura ótima foi de 52,5°C, razão molar de 1:3 (álcool:ácido) ou concentração de 3000mM de ácido láurico, 0,75% (m/m) de massa de enzima e para a enzima imobilizada a temperatura ótima também foi de 52,5°C, razão molar de 1:2,34 (álcool:ácido) ou concentração de 2340mM de ácido láurico e 5,25% (m/m) de massa de enzima;
- Para a reação de esterificação na conversão em laurato de isopropila na razão molar de 1:3 (álcool:ácido) ou concentração de 3000mM de ácido láurico utilizando a lipase de *Candida*

rugosa a temperatura ótima de 62,5°C para a livre e imobilizada e massa de enzima de 0,75 e 5,25% (m/m) para enzima livre e imobilizada, respectivamente;

- Na reação de transesterificação a condição ótima de reação foi alcançada com 500U/g de lipase de *Candida rugosa* livre, razão molar óleo:álcool de 1:18, temperatura de 40°C e 96 horas de reação, a conversão foi de 32,68% de conversão para o óleo de soja, e para a enzima imobilizada foi de 34,81% diferenciando-se o tempo de reação para 120 horas;

- Na influência do solvente hexano no meio reacional com razão molar 1:6, verificou-se que a lipase de *Candida rugosa* produziu 61,9% de monoglicerídeos, 21,4% de diglicerídeos, 0 % de triglicerídeos e 16,73% ésteres etílicos;

- Na avaliação da estabilidade das enzimas livres submetida ao propano supercrítico observou-se na maioria das condições que no tempo inicial as enzimas apresentaram ganho de atividade nas reações de hidrólise e esterificação, entretanto esta atividade não é estável, diminuindo com o tempo. Na forma imobilizada para a reação de hidrólise as enzimas apresentam perdas de atividade e o resultado mais significativo na reação de esterificação foi obtido para a *LCR* imobilizada, alcançando ganhos de atividade superiores a 1000% até 2h depois de submetida ao fluido supercrítico.

Portanto, verificou-se nesse estudo a importância da caracterização bioquímica e dos parâmetros reacionais para otimização da aplicação enzimática, o baixo potencial das enzimas para a produção biodiesel pela reação de transesterificação, porém alto potencial para produção de emulsificantes após submissão das enzimas livres e imobilizada ao propano supercrítico.

Capítulo 7

7. TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade e complementar os estudos de produção de ésteres etílicos e emulsificantes por via enzimática, sugere-se:

- Testar outros procedimentos de imobilização para a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 para verificar a estabilidade operacional em outros tipos de reações;
- Avaliar o uso de sistemas supercríticos na produção de emulsificantes utilizando a lipase de *Candida rugosa* imobilizada;
- Realizar as reações em outros meios não convencionais como, por exemplo, micro-ondas;
- Realizar ensaios de pressurização na presença de água;
- Caracterizar o produto da reação de transesterificação para classificá-lo como biodiesel ou não.

Capítulo 8

8. LISTA DE DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Esta dissertação de mestrado foi realizada ao longo de 24 meses de estudo, até o presente momento publicaram-se os resultados em diferentes meios de divulgação, como a seguir listadas:

- Apresentação oral eventos:

1) SANTANA, S.P; QUEIROZ M. L. B.; CARVALHO, N. B.; DARIVA, C.; FRICKS, A. T.; SILVA, A. L.; ZANIN, G. M.; SOARES, C. M. F.; Parâmetros reacionais para a síntese enzimática do laurato de isopropila em meio isento de solvente orgânico. IX SHEB –Simpósio de Hidrólise Enzimática de biomassas, Maringá, 2009.

2) CARVALHO, N. B; BARBOSA, J. M. P; FARIA, E. L. P; FRICKS, A. T.; LIMA, A.S.; SOARES, C.M. F; Caracterização bioquímica da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada em matriz hidrofóbica. I SIMPÓSIO NORDESTINO DE BIOPROCESSOS, Aracaju, 2011.

- Apresentação de pôster em eventos

1) CARVALHO, N. B.; MATOS T. G.; LIMA A. S.; FRICKS A.T.; SOARES C. M. F.. Produção de laurato de isopropila a partir da lipase obtida por micro-organismos isolados do solo contaminado por petróleo. SEPEQ – Seminário de Pesquisa em Engenharia Química - UFS, Aracaju, 2009.

2) CARVALHO N.B.; RESENDE, W.C.S.; MATOS, T.G.; FRICKS, A.T.; SOUZA, R.L.; ZANIN, G.M.; LIMA, A.S.; SOARES, C.M. F. Imobilização de lipase pela técnica sol gel para produção de laurato de isopropila. COBEQ – Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Foz do Iguaçu. 2010.

3) FARIA, E. L. P; CONCEIÇÃO, T.C.G.; REZENDE, W.C.S.; CARVALHO N.B.; FRICKS, A.T.; LIMA, A.S.; SOARES, C.M. F.; Produção de biodiesel por transesterificação utilizando enzimas imobilizadas. COBEQ – Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Foz do Iguaçu. 2010.

4) ZANIN, G. M.; CARVALHO, N. B; FARIA, E. L. P; CASTRO. H. F.; LIMA, A.S.; SOARES, C.M. F.; Transesterificação de óleo de soja para a produção de biodiesel utilizando biocatalisadores livres e imobilizados. 4to. Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones (EnReBB2010). Uruguai. 2010.

5) CARVALHO N.B.; RESENDE, W.C.S.; BORGES, G.; FRICKS, A.T.; FRANCESCHI, E.; DARIVA, C; ZANIN, G. M.; LIMA, A.S.; SOARES, C.M. F. Avaliação da Estabilidade da Lipase *Bacillus* sp. ITP-001 Livre e Imobilizada em Propano Pressurizado para Produção de Emulsificantes. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Caxias do Sul. 2011.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABDULLAH, A. Z.; SULAIMAN, N. S.; KAMARUDDIN, A. H. Biocatalytic esterification of citronellol with lauric acid by immobilized lipase on aminopropyl-grafted mesoporous SBA-15, *Biochemical Engineering Journal*. 44, p. 263–270, 2009.
- AHMAD, R.M.Y.; WILLIAM, A.A. e MURRAY, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions, *Enzyme Microb Tech*, 23, p. 438-450, 1998.
- ADLERCREUTZ, P., **Biocatalysis in Non-Conventional Media. In: Applied biocatalysis**, Eds: Straathof e Adlercreutz, Ed.Harwood academic publishers Netherlands, 2000.
- AIRES BARROS, M. R. Biocatálise em solventes orgânicos. *Boletim.Biotecnologia.*, Lisboa, 72, p. 2-13, 2002.
- AKOH, C. C.; CHANG, S.; LEE, G.; SHAW, J. Enzymatic approach to biodiesel production, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55, p. 8995-9005, 2007.
- ANDRADE, J. M.; OESTREICHER, E. G. Effect of treatment with compressed CO₂ and propane on d-hydantoinase activity, *The Journal of Supercritical Fluids*, 46, p. 342-350, 2008.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process, *Renewable Energy*, 34(5), p. 1185-1194, 2009.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial**. v. 4. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001.
- ARAKAKI, L. N. H.; AIROLDI, C. O. Relevante papel do agente silicante na modificação de superfícies de polímeros, *Química Nova*, 22, p. 246-253, 1999.
- BACHA A. B; GARGOURI Y; BEN ALI Y; MILED N; REINBOLT J; MEJDOUB H. Purification and biochemical characterization of ostrich pancreatic lipase, *Enzyme and Microbial Technology*. 37, p. 309–317. 2005.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(6), p. 392-416, 1996.
- BARBOSA J.M.P.; SOUZA R. L.; CARVALHO N.B.; FRICKS A. T.; SOARES C. M. F.; LIMA A. S. Caracterização bioquímica de lipase de um novo isolado de *Bacillus* sp. ITP-001. In: *XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ*, Foz do Iguaçu-Paraná, 2010.

- BARBOSA, J. M. P. **Purificação e caracterização da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001.** Dissertação de Mestrado, ITP/UNIT, Aracaju-SE, Brasil, 2010.
- BOMMARIUS, A. S.; BROERING, J. M. Established and novel tools to investigate biocatalyst stability, *Biocatalysis and Biotransformation*, 23, p. 125–139, 2005.
- BON, E. P. S.; FERRARA M. A.; CORVO M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado.** 1ª ed. Rio de Janeiro: Inteciência, 2008.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial.** v.1. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochemistry*, 72, p. 248-254, 1976.
- BRADDOO, S.; RATHI, P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. Microwave-assisted rapid characterization of lipase selectivities, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 51, p. 115–120, 2002.
- BUISSON, P.; HERNANDEZ, C.; PIERRE, M.; PIERRE, A. C. Encapsulation of lipases in aerogels, *Journal of Non-crystalline solids*, 285, p. 295-302, 2001.
- BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design, *Bioresource Technology*, Orlando, 91(1), p.77-84, 2004.
- CAO, X.; YANG, J.; SHU, L.; YU, B.; YAN, Y. Improving esterification activity of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in silica by bioimprinting with substrate analogues, *Process Biochemistry*, 44, p. 177-182, 2009.
- CARVALHO, N. B.; SOUZA, R. L.; CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. L. Sequential production of amylolytic and lipolytic enzymes by bacterium strain isolated from petroleum contaminated soil, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150, p. 25–32, 2008.
- CASTRO, H.F.; OLIVEIRA, P.C.; SOARES, C.M.F. Parâmetros reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila em solventes orgânicos, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 17 (3), p. 237-241, 1997.
- COPELAND, R. A. **Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis.** 2ª ed. New York: John Wiley, 2000.
- CORZO, G.; REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681, *Bioresource Technology*, 70, p. 173-180, 1999.
- COUTO, S. R.; SANROMAN, M. A. Application of solid state fermentation to food industry – a review, *Journal of Food Engineering*, 76, p. 291-302, 2006.
- CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1441, p. 205-214. 1999.

- DABDOUB, M. J.; BRONZELI, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria, *Química Nova*, 32, p. 3, 2009.
- DAGGETT, V.; SCHRODER, S.; KOLLMAN, P. Catalytic pathway of serine proteases – classical and quantum mechanical, *Journal of the American chemical society*, 23, p. 8926-8935, 1991.
- DALAL, S.; SINGH, P. K.; RAGHAVA, S.; RAWAT, S.; GUPTA, M. N. Purification and properties of the alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25609. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 51, p. 23-31, 2008.
- DANDWATE, V.; MADAMWAR, D. Novel approach for the synthesis of ethyl isovalerate using surfactant coated *Candida rugosa* lipase immobilized in microemulsion based organogels, *Enzyme and Microbial Technology*, 41, p. 265-270, 2007.
- DEMIR, B. S.; TÜKEL, S. S. Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64, p. 123-128, 2010.
- DHARMSTHITI, S. & AMMARANOND, P. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 21, p. 75-80. 1998.
- DIAZ, J.C.M.; RODRIGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures, *Enzyme and Microbial Technology*, 39, p. 1042–1050, 2006.
- DOSSAT, V.; COMBES, D. M. A. Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil, *Enzyme and Microbial Technology*, 30, p. 90-94, 2002.
- EISENMENGER, M. J.; CORCUERA J. I. R. High pressure enhancement of enzymes: A review, *Enzyme and Microbial Technology*, 45, p. 331-347, 2009.
- ENCINAR, J.M.; GONZALEZ, J.F; RODRIGUEZ, J.J.; TEJEDOR, A. Biodiesel fuels from vegetable oils: transesterification of *Cynara cardunculus* L. oils with ethanol. *Energy and Fuel*, 16, p. 443–450, 2002.
- ESMELINDRO, A. F. A.; FIAMETTI, K. G.; CENI, G.; CORAZZA, M. L.; TREICHEL, H.; de OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Lipase-catalysed production of monoglycerides in compressed propane and AOT surfactant. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47, p. 64 – 69, 2008.
- ESPINOSA, S. N.. **Procesamiento Supercrítico de Productos Naturales Modelado, Análisis y Optimización**. Tese de Doutorado. Universidad Nacional Del Sur, Buenos Aires, Argentina, 2001
- FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry: A Textbook**. 3ª ed., p.21. Berlin: Springer-Verlag, 1997.
- FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 5ª ed. Berlin/Heidelberg: Springer Verlag, 2004.

- FEIHRMANN, A. F.; OLIVEIRA, D.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids, *The Journal of Supercritical Fluids*, 38, p.373-382 2006.
- FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa.** Dissertação de Mestrado, ITP/UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2009.
- FEITOSA, I. C.; PINHO, J. M. B.; ORELLANA, S. C.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Produção de lipase por meio de micro-organismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo, *Acta Scientiarum Technology*, 32(2), p. 27-31, 2009.
- FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise.** Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2007.
- FERNANDES, P.; CABRAL, J. M. S. **Biotransformation. In: Basic Biotechnology**, v. 3. Ed. Ed. Cambridge University Press, Edited, Colin Ratledge, Borj Kristiansen, 2006.
- FERRARI, A. R.; OLIVEIRA, V. S.; SEABIO, A. Biodiesel de Soja – Taxa de Conversão em Ésteres Etilícos, Caracterização Físico-química e Consumo em Gerador de Energia. *Química Nova*, 28, nº 1, p. 19 - 23, 2005.
- FISCHER E. **In: Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme.** Ber. Dt. Chem. Ges. 27: p. 2985–2993. 1894.
- FORESTI M. L.; FERREIRA M. L. Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent medium: Analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses, *Enzyme and Microbial Technology*, 46, p. 419-429, 2010
- FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, p. 769-777, 2007.
- FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. *Catalysis Today*. p. 23-30, 2005.
- FREIRE, D.M.G. **Imobilização de amiloglicosidase em quitina – caracterização e testes em reatores contínuos de leito expandido.** Tese de Mestrado, EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 1988.
- FREITAS, L. A.; SANTOS, J. O. C.; BARCZA, M. S. V.; CASTRO, H. F. Alternativa potencial para aproveitamento do glicerol gerado na produção de biodiesel: síntese enzimática de monolaurina por esterificação, *Quím. Nova*, 32, p. 2277-2281, 2009.
- FREITAS, L.; PEREZ V. H.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of glyceride esters in solvent-free system: influence of the molar ratio, lipase source and functional activating agent of the support, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18, p. 1360-1366, 2007.

- FRICKS, A. T.; SOUZA, D. P. B.; OESTREICHER, E. G.; ANTUNES, O. A. C.; GIRARDI, J. S.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C. Evaluation of radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids*, 38, p. 338-347, 2006.
- GAUR R.; GUPTA A.; KHARE S. K. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Process Biochemistry*. 43, p. 1040-1046. 2008.
- GHORI, M. I. ; IQBAL, M. J., HAMEED, A. Characterization of a novel lipase from *Bacillus* sp. isolated from tannery wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 42, p. 22-29. 2011.
- GIEBAUF, A.; MAGOR, W.; STEINBERGER, D. J.; MARR, R. A study of hydrolases stability in supercritical carbon dioxide (SC-CO₂), *Enzyme and Microbial Technology*, 24, p. 577–583, 1993.
- GUISAN, J. M.; In: **Immobilization of enzymes for use in organic media. In: Immobilization of enzymes and cells.** Totowa: Humana Press. P. 1-13. 2006.
- GUNCHEVA, M. E.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, p. 1-21, 2011.
- GUPTA, R.; RAMNANI P. Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 40, p. 191-196, 2004.
- HABULIN, M.; KRMELJ, Z. K. In: **Alternative media for enzymatic reactions. Conf. On Supercrit, Fluids and their Applications.** Verona, Itália, 1999.
- HABULIN, M. E.; KNEZ Z. Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 76, p. 1260-1266, 2001.
- HABULIN, M.; PRIMOZIC M.; KNEZ Z. Supercritical fluids as solvents for enzymatic reactions, *Acta Chim. Slov.*, 54, p. 667–677, 2007.
- HANDELSMAN, T.; SHOHAM, Y. Production and characterization of an extracellular thermostable lipase from a thermostable *Bacillus* sp., *Journal of General and Applied*, 40, p. 435-443, 1994.
- HARPER N.; BARREIROS S. Enhancement of Enzyme Activity in Supercritical Carbon Dioxide via Changes in Acid-Base Conditions, *Biotechnology Progress*, 18(6), p. 1451–1454, 2002.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), p. 235-251, 2006.
- HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity, *Chemical Reviews*, 102, p. 4501-4523, 2002.

- HSU, A. F.; FOGLIA, T. A.; SHEN, S. Immobilization of *P. cepacia* lipase in a phyllosilicate sol-gel matrix: Effectiveness as a biocatalyst, *Biotechnology Applied Biochemistry*, 31, p. 179-183, 2000.
- HSU, A.; JONES K.; FLOGIA T.A.; MARMER W.N. Immobilized lipase-catalyzed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36, p. 181-186, 2002.
- HSU, A. F.; JONES, K. C.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Optimization of alkyl ester production from grease using a phyllosilicate sol-gel immobilized lipase. *Biotechnology Letters*, v. 25, n. 20, p. 713-716, 2003.
- HSU, A. F.; JONES K.; FOGLIA T. A.; MARMER W. N. Immobilized lipase-catalysed production of Jatropha oil, *Energy and Fuels*, 18, p. 154–159, 2004.
- IKUSHIMA Y. S.; HATAKEDA K.; SATO O. Promotion of a lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide in near-critical region, *Chemical Engineering Science*, 51, p. 2817–22, 1996.
- ILLANES, A. **Biotecnología de Enzimas**. Chile: Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, 1994.
- ISO, M.; CHEN, B. X.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v. 16(1), p. 53-58, 2001.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), p. 390-397, 2002.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 16, p. 396-403, 1998.
- JOSE, N. M.; PRADO, L. A. S. A. Materiais híbridos orgânicos inorgânicos: Preparação e algumas aplicações, *Química Nova*, 28, p. 281-288, 2005.
- JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments, *Biotechnology Advances*, 26, p. 457–470, 2008.
- KAMAT V, HECHT WL, RUBIN RT: Influence of meal composition on the postprandial response of the pituitary-thyroid axis. *Eur Journal Endocrinol*, 133, 75-79, 1995.
- KAMBOUROVA, M., KIRILOVA, N., MANDEVA, R., DEREKOVA, A. Purification and properties of thermostable lipase from thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 22, p. 307-313. 2003.
- KANWAR, S. S.; GEHLOT, S.; VERMA, M. L.; GUPTA, R.; KUMAR, Y.; CHAUHAN, G. S. G.S. Synthesis of geranyl butyrate with the poly (acrylic acid-co-hydroxy propyl methacrylate-cl-ethylene glycol dimethacrylate) hydrogel immobilized lipase of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC-4713, *Journal of Applied Polymer Science. Sci.*, 110, p. 2681–2692, 2008.

- KANWAR, S. S.; KAUSHAL, R. K.; VERMA, M. L.; KUMAR, Y.; CHAUHAN, G. S.; GUPTA, R.; CHIMNI, S. S. Synthesis of ethyl laurate by hydrogel immobilized lipase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375, *Indian Journal of Microbiology*, 45, p. 187–193, 2005a.
- KANWAR, S. S.; SRIVASTAVA, M.; CHIMNI, S. S.; GHAZI, I. A.; KAUSHAL, R. K.; JOSHI, G. K. Properties of an immobilized lipase of *Bacillus coagulans* BTS-1. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 51, p. 57-73, 2005b.
- KANWAR, S. S.; VERMA, M. L.; MAHESHWARI, C.; CHAUHAN, S.; CHIMNI, S. S.; CHAUHAN, G. S. Properties of poly (AAc-co-HPMA-cl-EGDMAi) hydrogel-bound lipase of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC-4713 in synthesis of methyl acrylate, *Journal of Applied Polymer Science*, 104, p. 4636–4644, 2007.
- KARTHIKEYANA A.; SIVAKUMARB N. Citric acid production by Koji fermentation using banana peel as a novel substrate, *Bioresource Technology*, 101, p. 5552-5556, 2010.
- KEGL, B. Effects of biodiesel on emissions of a bus diesel engine. *Bioresource Technology*, v. 99(4), p. 863-873, 2008.
- KEELING-TUCKER, T.; RAKIC, M.; SPONG, C.; BRENNAN, J.D. Activity of lipase within sol-gel derived bioglasses via organo silane and polymer doping. *Chemistry Materials*. 12, p. 3695-4704. 2000.
- KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. **Immobilized enzymes. In: Solid phase biochemistry – analytical and synthetic aspects.** Wiley (Interscience), New York, p. 253, 1983.
- KENNEDY, J. F.; ROIG, M. G. **Handbook of enzyme biotechnology. In: Principles of immobilization of enzymes.** 2 ed. Alan Wiseman, London, p. 235-310, 1995.
- KING, J. W. Extração utilizando fluido no estado supercrítico. *Cosmetics & Toiletries*. 4:34-38, 1992.
- KILINÇA; ÖNAL, S.; TELEFONCU A. Chemical attachment of *porcine pancreatic* lipase to crosslinked poly(vinyl alcohol) by means of adipoylchloride, *Process Biochemistry*, 38, p. 641-647, 2002.
- KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization, *Chemical Engineering Science*, 61, p. 1017-1026, 2006.
- KNEZ, Z. Enzymatic reactions in dense gases, *The Journal of Supercritical Fluids*, 47, p. 357-372, 2009.
- KNEZ, Z.; HABULIM, H. Compressed gases as alternative enzymatic reaction solvents: a short review, *Journal of Supercritical Fluids*, 23, p. 29-42, 2001.
- KOSHLAND D. E. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44 (2), p. 98–104. PMID 16590179. 1958.
- KRAUT, J. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis, *Annu Review Biochemistry*, 46, p. 331-358, 1977

- KRISHNA, S. H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media, *Biotechnology Advances*, 20, p. 239–267, 2002.
- KUMAR S.; PAHUJANI, S; OLA, R. P; KANWAR S. S; GUPTA, R. Enhanced thermostability of silica-immobilized lipase from *Bacillus coagulans* BTS-3 and synthesis of ethyl propionate, *Acta Microbiol Immunol Hung*, 53, p. 219-231, 2006.
- KUMAR, A.; KANWAR, S. S. Synthesis of ethyl ferulate in organic medium using celite-immobilized lipase, *Bioresource Technology*, 102, p. 2162-2167, 2011.
- LEUNG, D. Y. C.; GUO Y. Transesterification of neat and used frying oil: Optimization for biodiesel production, *Fuel Process. Technol.*, 87, p. 883-890, 2006.
- LI, C. Y.; CHENG, C. Y.; CHEN, T. L. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source, *Biochemistry. Engineering. J.*, 19, p. 25-31, 2004.
- LI, C. Y.; CHENG, C. Y.; CHEN, T. L. Production of *Acinetobacter* lipase with repeated fed-batch culture, *Biochem. Engineering. J.*, 25, p. 195-199, 2005.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **In:Bioteecnologia Industrial**. v.3. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.
- LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; FONTANA, J. D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents, *Biochemical Engineering Journal*, 18, p. 65–71, 2004.
- LIU, C. H; LU, W. B.; CHANG, J. S. Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology, *Process Biochemistry*, 41, p. 1940-1944, 2006.
- LIU, Y.; ZHANG, X.; TANC, H.; YAN, Y.; HAMEED, B. H. Effect of pretreatment by different organic solvents on esterification activity and conformation of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase, *Process Biochemistry*, 45, p. 1176–1180, 2010.
- LIU, Z.; CHI, Z.; JING LI, L. W. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical Engineering Journal*, 40, p. 445-451, 2008.
- LU, J. K.; CHEN, Y. W.; WANG, F.; TAN, T. W. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp 99-125 in organic solvent system. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v. n. p. 122-125, 2009.
- MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review, *Bioresource Technol.*, 70, p. 1-15, 1999.
- MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais, *Bioteecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 32, p. 38-46, 2004.
- MADRAS, G.; KOLLURU C.; KUMAR, R. Synthesis of biodiesel in supercritical fluids. *Fuel*, 83, p. 2029-2033, 2004.

- MAHAPATRA, P.; KUMARI, A.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R.; NAG, A. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 60, p. 57–63, 2009.
- MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL JR, C. G.; AMUNDSON, C. H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – A Review, *Journal American Oil Chemist´ Society*, 67, p. 890-910, 1990.
- MARKLEY, K. S. **In: Fatty Acids**. Part II. New York: Interscience Publishers, 1961.
- MARTINS, M. **Biossensores de colesterol baseados no sistema poli(álcool vinílico)/ftalocianina**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá-MG, 2006.
- MARTINS, T. S. **Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682**. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciencias da Saúde/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2001.
- MATSUDA, T. E.; WATANABE K. Enzymatic reactions in supercritical CO₂: carboxylation, asymmetric reduction and esterification, *Catalysis Today*, 96, p. 103-111, 2004.
- MCHUGH, M.; KRUKONIS, V. **In: Supercritical Fluid Extration**, Stonenham, Butterworth-Heinenamm, 1994.
- MENDES, A. A.; BARBOSA, B. C. M.; SOARES, C. M. F.; SILVA, M. L. C. P; CASTRO, H. F. Atividade e estabilidade operacional de lipase imobilizada em fosfato de zircônio na ausência e presença de polietilenoglicol, *Acta Scientiarum. Technology.*, 28, p. 133-140, 2006.
- MISSET, O. **Stability of industrial enzymes. In: Stability and stabilization of enzymes**, 47, p. 111-131, Amsterdam: Elsevier, 1993.
- MONOT, F. L. A catalyze enzymatique in milieu organique, *Revue de l´Institut Français du Pétrole*, 9(2), p. 187-208, 1994.
- MOREIRA RAMOS A. B. **Seleção de fonte de lipase para síntese de biodiesel por transesterificação enzimática do óleo de palma com etanol**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química, FAENQUIL, Lorena-SP, 2007.
- MOURA, J. M. L. N.; RIBEIRO, A. P. B.; GRIMALDI, R.; GONCALVES, L. A. G.. Reator de membrana enzimático e fluidos supercríticos: associação de processos. *Química Nova*. 30, p. 965-969, 2007.
- NANDHINI, K. U.; ARABINDOO, B.; PALANICHAMY, M.; MURUGESAN, V. Al-MCM- 41 supported phosphotungstic acid: Application to symmetrical and unsymmetrical ring opening of succinic anhydride, *Journal of Molecular Catalysis*, 243, p. 183-193, 2006.
- NEIDLEMAN, S. L. Enzymes in the food industry: a bacward glance, *Food Tecnology.*, 45, p. 88-91, 1991.

- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 839p, 2000.
- NETO, P. R. C.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, 23(4), p. 531 - 537, 2000.
- NOEL, M.; COMBES, D. *Rhizomucor miehei* lipase: differential scanning calometry and pressure/temperature stability studies in presence of soluble additives, *Enzyme and Microbial Technology*, 33, p. 299, 2003.
- NOUREDDINI, H.; GAO X.; PHILKANA R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 36, p. 181–186, 2002.
- NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil, *Bioresource Technology*, v. 96(7), p. 769-777, 2005.
- OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; ROSA, C. D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; AMROGINSKI, C.; MENONCIN, S.; OLIVEIRA, J. V. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 115, p. 771-780, 2004.
- OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; DARIVA, C.; CUNHA, A.G.; BEVILAQUA, J.V.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J. V.; FREIRE, D. M. G. Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39, p. 117, 2006.
- OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and SCCO₂, *Journal of Supercritical Fluids*, 19, p. 141-148, 2001.
- OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construction and analytical applications of biosensors using different immobilization procedures of vegetable peroxidase on chitosan matrix, *Química Nova*, 29, 2006.
- OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; VALDUGA, E. Comparação entre solvente orgânico e SC-CO₂ para alcoólise enzimática de óleo de amêndoa de dendê. In: *Anais de Resumos do XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2, p. 533-533, Fortaleza, 2000.
- OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; CASTRO, H. F.; MEI, L. H. I. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno, *Química Nova*, 23(5), p. 632-636, 2000.
- PAIVA, A L., BALCÃO,V.M., MALCATA, F.X. Kinetics and mechanics of reactions catalysed by immobilized lipases, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, p. 187-204, 2000.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais, *Química Nova*, 29(1), p. 93-99, 2006.

- PARK, J.; KIMA, M.; PARK, J.; LEE, D.; LEE, K.; MIN, J. Immobilization of the cross-linked para-nitrobenzyl esterase of *Bacillus subtilis* aggregates onto magnetic beads, *Process Biochemistry*, 45, p. 259–263, 2010.
- PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; CASTRO, H. F.; BRUNO L. M. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias, *Química Nova*, 31, p. 35-40, 2008.
- PEREIRA, E. B; CASTRO, H. F; MORAES, F. F; ZANIN, G. M. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*: A comparative study between free and enzyme immobilized onto porous chitosan beads, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91, p. 739-752, 2001.
- PERES, J.R.R.; FREITAS JUNIOR, E.; GAZZONI, D.L. Biocombustíveis: Uma oportunidade para o agronegócio brasileiro. *Revista de Política Agrícola*, Brasília, 14, p.31-41, 2005.
- PEREZ, V. H.; SILVA, GR. S.; GOMES F. M., CASTRO H. F. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin, *Biochemical Engineering Journal*, 34, p. 13–19, 2007.
- PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 440 p., 2005.
- PIERRE, A. , BUISSON, P., Influence of the porous texture of silica gels on the enzymatic activity of lipases in esterification reactions, *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 11, p. 639-647. 2001.
- PINHEIRO, R. C. ; SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F. ; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. - Response surface methodology as an approach to determine optimal activities of lipase entrapped in sol-gel matrix using different vegetable oils, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 146, p. 203-214, 2008.
- PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; MICHELLE, J. C. R.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, B. A. A. Biodiesel: an overview, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16, p. 1313-1330, 2005.
- POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **In: Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications.**, XII, Dordrecht, The Netherlands. 642 p, 2007.
- PRIMOZIC, M.; HABULIN, M.; KNEZ, Z. Parameter optimization for the enzymatic hydrolysis of sunflower oil in high-pressure reactors, *Journal of the american oil chemists society.*, 80, p. 643-646, 2003.
- QUINTELLA, C. M.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A.; NETO, P. R. C.; TORRES, E. A. C. M.; JESUS, C. A. C. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I, *Química Nova-Ed. Especial*, 2009.

- RAFIEE, E.; JOSHAGHANI, M.; TORK, F.; FAKHRI, A.; EAVANI, S. Esterification of mandelic acid catalyzed by heteropoly acid. *Journal of Molecular Catalysis*, 283, p. 1-4, 2008.
- RAMOS, L. P.; KNOTHE, G.; VAN GERPEN, J.; KRAHL, J. **In: Manual de Biodiesel**. 1^a ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.
- RANDOLPH, T. W; BLANCH, H. W; CLARK, D. S. **Biocatalysis in supercritical fluids. In: Biocatalysis for industry**. p. 219–37, New York: Plenum Press, 1991.
- RATHI, P.; BRADDOO, S.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp with the property of thermal activation. *Biotechnology Letters*, 22 (6), p. 495-498, 2000.
- REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials, *Biotechnology and Bioengineering*, 49, p. 527-534, 1996.
- REZAEI, K.; TEMELLI, F.; JENAB, E. Effects of pressure and temperature on enzymatic reactions in supercritical fluids, *Biotechnology Advances*, 25, p. 272-280, 2007.
- RINALDI, R. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral, *Quím. Nova*, 30(5), p. 1374-1380, 2007.
- ROBLES-MEDINA, A.; GONZALEZ-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDAN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production, *Biotechnology Advances*, 27, p. 398-408, 2009.
- ROMERO, M. D.; CALVO, L.; ALBA, C.; HABULIN, M.; PRIMO, M.; KNEZ, K. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide, *Journal.Supercritic Fluid.*, 33, p.77–84, 2005.
- ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource Technology*, 98, n. 3, p. 648-653, 2007.
- SABU, A.; PANDEY, A.; JAAFAR D. M.; SZAKACS G. Tamarind seed powder and palm kernel cake: Two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620, *Bioresource Technology*, 96, p. 1223-1228, 2005.
- SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, 119(3), p. 291-299, 2005.
- SALLEH, A.B.; RAHMAN, R.N.Z.R.A. **New lipases and proteases**, Nova Biomedical, New York, 159 p. 2006.
- SALUM, T. F. C.; BARON, A. M.; ZAGO, E.; TURRA, V.; BARATTI, J.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26, p. 197-203, 2008.

- SANTOS, O. A. A. **Hidrogenação seletiva do ácido oléico em catalisadores de rutênio**, Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas-SP, 1999.
- SATHISH, K.M.; KARRUNAKARAN, C.M.; ANBUSELVI, S. Production of lipase from *Bacillus* spp. using germinated maize oil and various carbon sources and effect of lipase activity on pH and temperature, *International Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 5(4). p. 361-367. 2009.
- SCROCCARO K. I. **Impregnação de heteropoliácidos em sílica para esterificação do ácido esteárico com metanol**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná/UFP, Paraná-PR, Brasil, 2009.
- SEKEROGLU, G.; FADILOĞLU, S.; İBANOĞLU, E. Production and characterization of isopropyl laurate using immobilized lipase, *Turkish Journal of Engineering & Environmental Sciences*, 28(4), p. 241-248, 2004.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnology Advances*, 19, p. 627-662, 2001.
- SHAW JF, YANG KH, CHANG SF. Chang SW. Studies of optimum conditions for covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(γ -glutamic acid) by RSM., *Bioresource Technology*, 99, p. 2800-2805, 2008.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77-79, p. 745-758, 1999.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; SANTANA, M. H.; ZANIN, G. M. Intensification of lipase performance for long-term operation by immobilization on controlled pore silica in presence of polyethylene glycol, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100, p. 703-718, 2002.
- SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A. A.; CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M. NMR Characterization of the role of silane precursors on the catalytic activity of sol-gel encapsulated lipase, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 352, p. 3469-3477, 2006.
- SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Studies on lipase immobilization in hydrophobic sol-gel matrix, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113, p. 307-319, 2004.
- SOUZA, R. L.; BARBOSA, J. M. P.; ZANIN, G. M.; LOBÃO, M. W. N.; SOARES, C. M. F.; LIMA A. S. Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous, *Appl Biochem Biotechnol*. 161, p. 288-300, 2010.
- SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. S. R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos

- químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica, *Quím. Nova*, 30(3), p. 667-676, 2007.
- SUGIHARA, A.; TANI, T.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp, *The Journal of Biochemistry*, Tokyo, 109, 211-6. 1991.
- SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis, *Bioresource Technology*, 100, p. 2607–2612, 2009.
- TAN, T. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation, *Process Biochemistry*, 39(4), p. 459-465, 2003.
- TAYLOR, L. T. **Introduction to Supercritical Fluid Extraction**. R&D Magazine. 1996.
- TEMELLI, F. Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils, *The Journal of Supercritical Fluids*, 47, p. 583-590, 2009.
- TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, V. A. Review on Microbial Lipases Production, *Food and Bioprocess Technology*, 3, p. 182-196, 2010.
- UJANG.; VAIDYA, A. M. Stepped water activity control for efficient enzymatic interesterification *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 50, p. 318-322, 1998.
- VARMA, M. N.; MADRAS, G. Synthesis of biodiesel from castor oil and linseed oil in supercritical fluids, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46, p. 1-6, 2006.
- VICENTE, G.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems, *Bioresource Technology*, 92, p. 297-305, 2004.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. M.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9, p. 113-148, 2000.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of Biochemistry**. 2ed., New York: John Wiley e Sons, 2006.
- VOET, J. G; VOET, D. **Biochemistry**. New York: John Wiley, 2004.
- WANG R.; GODOY, L. C.; SHAARANI, S. M.; MELIKOGLU, M.; KOUTINAS, A.; WEBB, C. Improving wheat flour hydrolysis by an enzyme mixture from solid state fungal fermentation, *Enzyme and Microbial Technology*, 44, p. 223-228, 2009.
- WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. 3^a ed. London: Ellis Horwood, 1995.
- YIN, J. Z.; XIAO, M.; SONG, J. B.; Energy Convers Manage. 49, p. 908, 2008.
- ZABORSKY, O. R. **Immobilized enzymes - miscellaneous methods and general classification**. In: **Methods in enzymology – immobilized enzymes**. New York,

Academic Press, vol. XLIV, 1976.

ZABORSKY, O. R. **Immobilized enzymes**, Chemical Rubber Co, Cleveland, 1973.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. **Enzimas imobilizadas. In: Enzimas como agentes biotecnológicos**, Saiad, S.; Pietro, R. C. L. R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, cap. 4, p. 35-85, 2004.

ANEXO A

Tabela A.1. Atividade relativa do efeito do pH na atividade hidrolítica da lipase de *Bacillus* sp ITP-001 imobilizada nesse estudo e livre conforme Barbosa *et al.* (2010).

pH	Atividade Relativa <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 Imobilizado (%)		Atividade Relativa <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 Livre (%)	
		Desvio		Desvio
3	82,23	0	79,25	6,26137
4	90,92	0	97,99	3,94068
5	95,53	0	100	5,58086
6	96,15	4,4	93,4	3,00221
7	100	3,3	82,51	1,81174
8	76,81	7,4	74,65	3,12569
9	62,61	3,6	65,55	2,67916
10,5	43,52	2,5	47,4	1,64183

Tabela A.2. Atividade relativa do efeito da temperatura na atividade hidrolítica da lipase de *Bacillus* sp ITP-001 imobilizada nesse estudo e livre conforme Barbosa *et al.* (2010).

Temperatura (°C)	Atividade Relativa <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 Imobilizado (%)		Atividade Relativa <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 Livre (%)	
		Desvio		Desvio
25	80,75	57,08	6,64	0
37	88,01	66,18	3,68	7,46
45	86,41	73,85	0	5,11
60	84,54	80,26	1,32	2,15
70	87,40	86,46	1,65	0
80	100	100	6,51	6,74
100	75,77	94,73	8,66	5,95

Tabela A.3. Atividade relativa em função da temperatura até 120min para avaliação da estabilidade enzimática da lipase de *Bacillus* sp ITP-001 imobilizada, tempo reacional de 10min, em pH 5, à 37°C.

Tempo (min)	37°C	50°C	60°C	70°C	80°C
0	100	100	100	100	100
10	49,60	45,33	49,93	45,62	42,70
30	47,16	47,07	42,70	45,56	42,70
60	50,91	45,79	48,43	45,56	43,88
120	51,15	53,08	54,44	45,94	43,88

Tabela A.4. Atividade relativa na influência de solventes na atividade hidrolítica da lipase de *Bacillus* sp ITP-001 imobilizada, pH 5 e 37°C.

Solvente	Atividade Relativa (%)
CONTROLE (Sem solvente)	100,00
ACETONITRILA 10%	145,90
ACETONA 10%	129,80
A. METÍLICO 30%	124,20
ACETONITRILA 30%	124,11
PIRIDINA 10%	118,99
PIRIDINA 30%	118,99
A. METÍLICO 10%	118,54
ACETONA 30%	108,20
A. ISOPROPILICO 10%	103,51
A. ISOPROPILICO 30%	88,15
A.ETÍLICO 30%	80,08
A.ETÍLICO 10%	53,79

Tabela A.5. Atividade relativa na influência dos íons na atividade hidrolítica da lipase de *Bacillus* sp ITP-001 imobilizada, pH 5 e 37°C.

Solvente	Atividade Relativa (%)
CONTROLE (Sem íons)	100,00
EDTA 10	148,64
EDTA 0,1	125,19
FeCl ₃ 0,1	127,87
MnCl ₂ 10	119,92
FeCl ₃ 10	118,99
MnCl ₂ 0,1	106,03
ZnCl ₂ 0,1	105,86
CoCl ₂ 10	98,02
CoCl ₂ 0,1	97,96
ZnCl ₂ 10	96,79

Tabela A.6. Velocidade e concentração de substrato dos dados experimentais comparados com os modelos cinéticos de Lineaweaver-Burk e o não-linear na reação de hidrólise do azeite de oliva em pH 5 e 37°C.

S (mmol)	v (mmol/g.min)	v (mmol/g.min)	v (mmol/g.min)
	Lineaweaver-Burk	Não-linear	Experimental
0	0	0	0
37	0,07311	0,06821	0,07567
100	0,08899	0,08753	
150	0,09294	0,09267	
186	0,09457	0,09482	
250	0,09636	0,09724	
300	0,09726	0,09845	
350	0,09791	0,09934	
372	0,09814	0,09965	0,09845
450	0,09879	0,10054	
500	0,0991	0,10097	
550	0,09936	0,10132	
600	0,09957	0,10162	
650	0,09976	0,10187	
700	0,09991	0,10209	
744	0,10003	0,10226	0,1002
800	0,10017	0,10244	
850	0,10028	0,10259	
900	0,10037	0,10272	
950	0,10045	0,10284	
1000	0,10053	0,10295	
1050	0,1006	0,10304	
1116	0,10068	0,10316	0,1119
1150	0,10072	0,10321	
1200	0,10077	0,10328	
1250	0,10082	0,10335	
1300	0,10087	0,10341	
1350	0,10091	0,10347	
1400	0,10095	0,10352	
1450	0,10098	0,10357	
1488	0,10101	0,10361	0,114

Tabela A.7. Ajuste dos modelos aos dados experimentais foi baseado na magnitude do erro médio relativo (P) e estimado (SE)Valores dos erros.

Lineaweaver-Burk						
S	Vobs	Vpre	Vobs-vpre	modulo	(Vobs-Vpre)/Vobs	(Vobs-vpre) ²
37	0,07567	0,073111197	0,00256	0,00256	0,033815287	6,54747E-06
186	0,07609	0,094566843	-0,01848	0,01848	0,242828792	0,000341394
372	0,09845	0,098142879	0,00031	0,00031	0,00311956	9,43231E-08
744	0,10020	0,100034273	0,00017	0,00017	0,001653964	2,74655E-08
1116	0,11190	0,100681042	0,01122	0,01122	0,100258782	0,000125865
1488	0,11400	0,101007573	0,01299	0,01299	0,113968654	0,000168803
P	8,260750671					
SE	0,011337823					
Hanes-Wolf						
S	Vobs	Vpre	Vobs-vpre	modulo	(Vobs-Vpre)/Vobs	(Vobs-vpre) ²
37	0,07567	0,038833052	0,03684	0,03684	0,486810471	0,001356961
186	0,07609	0,08395364	-0,00786	0,00786	0,103346558	6,18368E-05
372	0,09845	0,098106966	0,00034	0,00034	0,003484343	1,17672E-07
744	0,10020	0,107137889	-0,00694	0,00694	0,069240405	4,81343E-05
1116	0,11190	0,110529364	0,00137	0,00137	0,012248759	1,87864E-06
1488	0,11400	0,112306915	0,00169	0,00169	0,014851623	2,86654E-06
P	11,49970264					
SE	0,017156892					
Eadie-Scatcharel						
S	Vobs	Vpre	Vobs-vpre	modulo	(Vobs-Vpre)/Vobs	(Vobs-vpre) ²
37	0,07567	0,028549383	0,04712	0,04712	0,622712003	0,002220353
186	0,07609	0,074758842	0,00133	0,00133	0,017494514	1,77198E-06
372	0,09845	0,093561368	0,00489	0,00489	0,049655986	2,38987E-05
744	0,10020	0,107019563	-0,00682	0,00682	0,068059508	4,65064E-05
1116	0,11190	0,112409347	-0,00051	0,00051	0,004551808	2,59435E-07
1488	0,11400	0,115313081	-0,00131	0,00131	0,011518256	1,72418E-06
P	12,89986792					
SE	0,021422014					
Wolf-Augustinisson-Hofstce						
S	Vobs	Vpre	Vobs-vpre	modulo	(Vobs-Vpre)/Vobs	(Vobs-vpre) ²
37	0,07567	0,031714286	0,04396	0,04396	0,580886934	0,001932105
186	0,07609	0,077231834	-0,00114	0,00114	0,01500636	1,30378E-06
372	0,09845	0,093978947	0,00447	0,00447	0,04541445	1,99903E-05
744	0,10020	0,10540732	-0,00521	0,00521	0,051969261	2,71162E-05
1116	0,11190	0,109860541	0,00204	0,00204	0,018225725	4,15939E-06
1488	0,11400	0,112231301	0,00177	0,00177	0,015514903	3,1283E-06
P	12,11696054					
SE	0,019938921					

S	Vobs	Vpre	Non-linear			
			Vobs-vpre	modulo	(Vobs-Vpre)/Vobs	(Vobs-vpre) ²
37	0,07567	0,068205758	0,00746	0,00746	0,098642019	5,57149E-05
186	0,07609	0,094824238	-0,01873	0,01873	0,246211562	0,000350972
372	0,09845	0,099653026	-0,00120	0,00120	0,012219663	1,44727E-06
744	0,10020	0,102256663	-0,00206	0,00206	0,020525575	4,22986E-06
1116	0,11190	0,103155041	0,00874	0,00874	0,078149771	7,64743E-05
1488	0,11400	0,103610175	0,01039	0,01039	0,091138813	0,000107948
P	9,114790037					
SE	0,010925076					

Tabela A.8. Atividade relativa do efeito da temperatura sobre a esterificação da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre com massa de enzima de 0,75% (m/m) e imobilizada com massa de enzima de 5,25% (m/m) e razão molar de 1:3 (álcool:ácido) ou 3000mM de ácido láurico.

Temperatura (°C)	Atividade Relativa		Atividade Relativa	
	<i>Bacillus</i> sp. ITP-001	Desvio	<i>Bacillus</i> sp. ITP-001	Desvio
	Livre (%)		Imobilizada (%)	
45	48,43	9,73	64,90	6,80
52,5	100	7,75	100	0
57,5	40,87	9,88	77,11	5,54
62,5	36,87	5,64	60,30	0

Tabela A.9. Atividade relativa do efeito da concentração de ácido na atividade de esterificação da lipase de *Bacillus* ITP-001 livre com massa de enzima de 0,75% (m/m), à 52,5°C.

Ácido Láurico (mM)	Atividade Relativa (%)	Desvio
840	3,81	0,42
1000	35,31	5,96
3000	100	0
3150	91,04	10,19
3580	23,91	3,06

Tabela A.10. Atividade relativa do efeito da concentração de ácido na atividade de esterificação da lipase de *Bacillus* ITP-001 imobilizada com massa de enzima de 5,25% (m/m), à 52,5°C.

Ácido Láurico (mM)	Atividade Relativa (%)	Desvio
1250	1,26855	0
1620	42,20881	7,41
2340	100	1,68
3000	36,56973	0,82
4200	21,41516	4,16

Tabela A.11. Atividade relativa no efeito da massa da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre na reação de esterificação com razão molar de 1:3 (álcool:ácido) ou 3000mM de ácido láurico, à 52,5°C.

Massa (%)	Atividade Relativa (%)	Desvio
0,25	39,5086	0
0,5	26,62191	3,19
0,75	100	0
1	22,60062	0

Tabela A.12. Atividade relativa no efeito da massa da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada na reação de esterificação com razão molar de 1:2,34 (álcool:ácido) ou 2340mM de ácido láurico, à 52,5°C.

Ácido Láurico (mM)	Atividade Relativa (%)	Desvio
0,75	47,31937	0
2,63	61,31228	1,7
5,25	100	0,16
7,88	28,09484	0

Tabela A.13. Conversão em ésteres etílicos utilizando a lipase de *Candida rugosa* livre, 96h, 40°C, sem solvente.

Razão molar (etanol:soja)	Conversão (%)	Conversão (%)	Conversão (%)
	50U	250U	500U
Razão 1:6	2,54	4,4	22,49
Razão 1:18	2,34	10,5	32,68

Tabela A.14. Conversão em ésteres etílicos utilizando a lipase de *Candida rugosa* imobilizada, 120h, 40°C, sem solvente.

Razão molar (etanol:soja)	Conversão (%)	Conversão (%)	Conversão (%)
	50U	250U	500U
Razão 1:6	6,8	8,13	34,81
Razão 1:18	2,8	2,1	0,59

Tabela A.15. Conversão em ésteres etílicos utilizando a lipase de *Candida rugosa* livre e imobilizada, 96h, 40°C, na presença de terc-butanol.

Razão molar (etanol:soja)	<i>Candida rugosa</i> livre	<i>Candida rugosa</i> imobilizada
Razão 1:6	6,9	6,2
Razão 1:9	1,9	2,9
Razão 1:12	2,1	1,9
Razão 1:18	2,4	3,4

Tabela A.16. Conversão em ésteres etílicos utilizando a lipase de *Candida rugosa* livre e imobilizada, 96h, 40°C, na presença de terc-butanol.

Razão molar (etanol:soja)	<i>Candida rugosa</i> livre	<i>Candida rugosa</i> imobilizada
Razão 1:6	6,9	6,2
Razão 1:9	1,9	2,9
Razão 1:12	2,1	1,9
Razão 1:18	2,4	3,4

Tabela A.17. Perda ou ganho da atividade de hidrólise da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre depois de submetida ao propano supercrítico.

Tempo (h)	45°C/50bar	45°C/200bar	52°C/115bar	60°C/50bar	60°C/200bar
0	-4,69	-19,79	-5,33	13,43	14,32
1	-4,83	-12,44	-10,66	13,43	12,73
2	-5,66	-22,26	3,40	11,70	14,80
6	-4,83	-13,66	-0,77	13,22	12,34

Tabela A.18. Perda ou ganho da atividade de hidrólise da lipase de *Candida rugosa* livre depois de submetida ao propano supercrítico.

Tempo (h)	45°C/50bar	45°C/200bar	52°C/115bar	60°C/50bar	60°C/200bar
0	362,55	67,821	486,34	121,57	133,18
1	316,39	65,693	486,67	34,518	144,96
2	419,63	123,86	474,70	118,99	114,92
6	417,81	189,14	563,84	115,10	106,86

Tabela A.19. Perda ou ganho de esterificação da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 livre depois de submetida ao propano supercrítico.

Tempo (h)	45°C/50bar	45°C/200bar	52°C/115bar	60°C/50bar	60°C/200bar
0	-67,98	511,54	15,353	191,75	242,18
1	55,281	476,48	70,200	97,213	157,40
2	91,249	213,44	152,53	-50,37	171,65
6	-51,98	11,194	12,105	-76,76	-16,46

Tabela A.20. Perda ou ganho de esterificação da lipase de *Candida rugosa* livre depois de submetida ao propano supercrítico.

Tempo (h)	45°C/50bar	45°C/200bar	52°C/115bar	60°C/50bar	60°C/200bar
0	13,97	211,39	391,38	377,69	63,61
1	-25,86	72,237	172,76	376,35	36,517
2	-100	35,116	89,259	374,59	10,605
6	-100	-100	-75,01	375,90	-43,55

Tabela A.21. Perda ou ganho de atividade residual de hidrólise e esterificação para lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada, depois de submetido a propano supercrítico (60°C e 200bar).

Tempo (h)	Hidrólise	Desvio	Esterificação	Desvio
0	-65,26	3,503	49,11	0
1	-58,16	6,555	84,61	2,51
2	-78,09	0,06	82,137	12,32
6	-65,32	0,713	22,761	2,79
12	-65,44	1,096	-33,44	10,03

Tabela A.22. Perda ou ganho de atividade residual de hidrólise e esterificação para lipase de *Candida rugosa* imobilizada, depois de submetido a propano supercrítico (60°C e 200bar).

Tempo (h)	Hidrólise	Desvio	Esterificação	Desvio
0	-63,84	1,02	1010,97	202,19
1	-65,87	6,58	1814,26	157,64
2	-63,91	4,63	1814,54	180,55
6	-70,37	5,48	705,46	84,93
12	-79,55	3,14	79,06	152,32