



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA**

**AMÉRICO CRUZ JÚNIOR**

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM SUPORTES SÓLIDOS PARA  
A ETANÓLISE DE ÓLEO DE GIRASSOL**

**Florianópolis  
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cruz Júnior, Américo

Imobilização de Lipases em Suportes Sólidos para a Etanólise de Óleo de Girassol / Américo Cruz Júnior ; orientador, Luismar Marques Porto; coorientador, José Manuel Guisán Seijas ; coorientador, Benevides Costa Pessela João. 2018.

140 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Lipase. Biodiesel. 3. Biorreatores. 4. Enzima imobilizada. 5. Óleo de girassol. I. Porto, Luismar Marques. II. Seijas, José Manuel Guisán. III. João, Benevides Costa Pessela. IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

**AMÉRICO CRUZ JÚNIOR**

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM SUPORTES SÓLIDOS PARA  
A ETANÓLISE DE ÓLEO DE GIRASSOL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Coorientadores:

Dr. José Manuel Guisán Seijas – Instituto de Catálisis y  
Petroleoquímica (ICP)

Dr. Benevides Costa Pessela Joao – Instituto de Investigación em  
Ciências de la Alimentación (CIAL)

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) – Madrid,  
Espanha

**Florianópolis  
2017**



# IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM SUPORTES SÓLIDOS PARA A ETANÓLISE DE ÓLEO DE GIRASSOL

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química, e aprovada, em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Florianópolis, 22 de Dezembro de 2017.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cíntia Soares  
Coordenadora

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
Orientador

## **Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. André Würst Zibetti

---

Dr<sup>a</sup>. Estela de Oliveira Nunes  
Embrapa-Paraná

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sabrina Moro Villela Pacheco

---

Prof. Dr. Éverton Skoronsky

---

Prof. Dr. Luciano Henrique Campestrini



À minha querida avó Alcina da Cruz  
(*in memoriam*).  
À minha querida mãe Maria Madalena  
da Cruz (*in memoriam*).  
Ao meu querido irmão Dr. Wellington  
da Cruz (*in memoriam*).  
Ao meu querido irmão Edmilson da  
Cruz (*in memoriam*).  
À minha querida cadela Bruninha (*in  
memoriam*).  
Ao meu querido pai Américo da Cruz  
(*in memoriam*), o mentor de tudo.



## AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de relatar meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração desta tese.

Agradeço, em primeiro lugar a DEUS, ao meu grande ídolo e herói, que é meu querido pai, Américo da Cruz (*in memoriam*), que com sua sabedoria e inteligência soube nos criar e nos ensinar, os caminhos que devíamos trilhar como seres humanos e cidadãos.

Ao meu grande amigo Prof.Dr Marcelo Carvalho, pela grande amizade e incentivo.

Prof.Dr André Zibetti, pela amizade e incentivo.

Prof. Dr. Sérgio Peters, pela amizade e incentivo.

Prof. José Fletes, pela amizade e incentivo.

À amiga Dr<sup>a</sup>.Sabrina Moro Villela Pacheco, que nesses anos de convivência foi muito importante na parceria de trabalhos de laboratório, congressos, trabalhos científicos e principalmente pela valiosa amizade.

Ao Joel Pires Viana Junior, meu primeiro aluno de iniciação científica, hoje engenheiro químico, que me auxiliou muito nos experimentos de laboratório.

Ao Vinícius Heidemann de Souza, aluno de iniciação científica, por sua grande ajuda nos experimentos de laboratório.

Ao meu amigo Dr. Marcelo Quint, pela amizade e ajuda nas análises de FT-IR.

Ao meu amigo Dr. João Renato de Mendonça Strelau, pela amizade e sua valiosa ajuda nas análises de RMN H.<sup>1</sup>

Ao Edevilson Silva, secretário da pós-graduação em Engenharia Química (POSENQ/UFSC), por sua grande amizade e companheirismo.

Ao Sandro dos Santos Souza, pela amizade e companheirismo.

Ao Dr. Robson L. Schacker, por sua ajuda, grande amizade e companheirismo.

À UFSC, pela liberação em tempo integral para que eu realizasse o Doutorado em Engenharia Química, durante esses quatro anos.

À Biopar – Bioenergia do Paraná Ltda., principalmente pela preciosa ajuda de Nivaldo Tomazella e Moacyr Tomazella, com a grande amizade durante esses anos e sua ajuda inestimável nas análises de caracterização de biodiesel.

À empresa Bunge do Brasil, localizada em Gaspar, Santa Catarina, pela doação de amostras de óleo de girassol degomado e refinado.

Ao professor Dr. Márcio José Rossi, pela valiosa orientação e ajuda nos experimentos em seu Laboratório de Bioprocessos/MIP/CCB-UFSC, nos experimentos com o cultivo dos fungos em biorreator *Airlift* e por sua valiosa amizade ao longo desses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), por um ano, para realizar estágio doutoral no Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP), Laboratório de Engenharia Enzimática, CSIC/UAM – Madrid/Espanha.

Ao meu querido orientador professor Ph.D. Luismar Marques Porto, que me acolheu no INTELAB e, com a sua orientação e grande incentivo, deu-me a oportunidade de seguir em frente e terminar a Tese de Doutorado, orientando-me e, acima de tudo, nos momentos de grandes dificuldades, valorizando o meu trabalho e incentivando-me com palavras de estímulo, companheirismo e valorosa amizade, transmitindo-me muitos conhecimentos.

Ao meu querido coorientador Dr. José Manuel Guisán Seijas, que me acolheu gentilmente em seu laboratório e me orientou durante a minha estadia em Madrid/Espanha.

Ao meu querido coorientador Dr. Benevides Costa Pessela Joao, por sua orientação e preciosa ajuda e amizade durante o meu estágio em seu laboratório do CIAL/CSIC.

Gostaria de agradecer imensamente aos pesquisadores do ICP-CSIC: Dr. César Mateo González, por sua ajuda, orientação e amizade; Dr. José Palomo Carmona, por sua ajuda e amizade; Dr. Marco Filice, por sua orientação e amizade; Dr. Roberto Fernández-Lafuente, por sua amizade; e ao Dr. Javier Rocha-Martín, por sua grande ajuda e amizade.

Enfim, a todos os amigos que inúmeras vezes me incentivaram e mostraram o quanto era importante para minha formação o trabalho que eu estava realizando.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto.”

**Albert Einstein**



## RESUMO

Imobilizaram-se as lipases produzidas pelos fungos *Candida antarctica* B (CALB), *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Rhizomucor miehei* (RML) e comercializadas pela Novozymes®, sobre suportes comerciais como Duolite A568, Lewatit 1600 (Lanxess) e Sepabeads EC (*Mitsubish Resindion*) e Octilagarose (*Mitsubish Resindion*). Também foram realizadas imobilizações de enzima lipase de *Rhizopus oryzae* comercial Amano FAP-15 em suporte de microesferas de celulose bacteriana por ligação covalente multipontual, utilizando-se como agente reticulante o EDC em concentrações de 0,25 % m/v e 0,50% m/v e foram investigados a imobilização em diferentes tampões de pH 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0. A imobilização das enzimas foi realizada por adsorção e por funcionalização por reagente intrecruzante através da aminação e redução do suporte Sepabeads EC HG. Posteriormente foi avaliada a eficiência de cada sistema de imobilização na reação de óleo de girassol com etanol absoluto com co-solvente ciclohexano. A reação foi realizada em sistema batelada em frascos de vidro de 20 mL contendo 1,45 mL de óleo de girassol, 5 mL de ciclohexano, 10 mL de etanol absoluto e 0,1 g de derivado (enzima + suporte), em agitador orbital à temperatura de 45°C e 200 rpm. A reação de síntese foi realizada por 5 dias e os ésteres foram quantificados por HPLC. Os resultados mostraram que os derivados enzimáticos funcionalizados com enlaces covalentes tiveram mais estabilidade em reação com Sepabeads EC HG e por adsorção com Duolite A568 e consequentemente tiveram melhores valores de conversão de biodiesel. Quanto a produção de biodiesel em sistema de batelada utilizando os biocatalisadores que foram imobilizados em diversos suportes, os resultados foram os melhores para biocatalisadores de natureza que continham ligações covalentes multipontuais, com ligações covalentes muito fortes, e o melhor resultado foi para o biocatalisador Sepabeads EC-CALB em ciclohexano 10% solvente de natureza apolar com razão molar de 9:1(etanol absoluto:óleo de girassol), à temperatura de 45 °C, os resultados de rendimento de cerca de 95 % em 100 horas de reação. E para os biocatalisadores de natureza hidrofóbica, imobilização por adsorção; Lewatit-TLL, Lewatit-RM e Lewatit-CALB com solvente ciclohexano 10% de caráter mais apolar na razão molar de 6:1 (etanol absoluto : óleo de girassol) à temperatura de 45 °C, os resultados foram de 100% em 150 horas de reação.

**Palavras-chave:** Lipase. Biodiesel. Biorreatores. Enzima imobilizada. Óleo de girassol.



## ABSTRACT

The immobilization studies were conducted by using different commercial lipase, *Candida antarctica* B (CALB) *Thermomyces lanuginosus* (TL), *Rhizomucor miehei* (RML) and Novozymes® lipase produced by *Rhizopus oryzae* in brackets Duolite A568, Lewatit 1600 (Lanxess) Sepabeads and EC (Mitsubish Resindion) and octylagarose (Mitsubish Resindion). Also lipase enzyme immobilizations *Rhizopus oryzae* commercial Amano FAP-15 in support of bacterial cellulose microspheres by multipoint covalent bonding were carried out using EDC as the crosslinked agent in concentrations of 0.25% m/v and 0.50% m/v been investigated immobilization in different buffers pH 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0 and 10.0. The immobilization of the enzymes was performed by adsorption and by functionalizing crosslinked reagent through amination and reduction of Sepabeads EC. The purpose of this study was to evaluate and compare the immobilization of two different processes of lipases and using the same process in the synthesis of biodiesel. Furthermore to study the efficiency of the reaction of sunflower oil with absolute ethanol in the presence of co-solvent, cyclohexane in molar ratios of 3/1 and 9/1. The reaction was conducted in batch systems in glass vials of 20 mL containing 1.45 mL of sunflower oil, 5 mL of cyclohexane, 10 mL of absolute ethanol and 0.1 g of (enzyme+support) derivative with *Shaker* orbital agitation at a temperature of 45 °C and agitated at 200 rpm. The synthetic reaction was carried out for 5 days and the esters were quantified through HPLC. The results showed that the enzyme with functionalized covalent bonds were more stable in the reaction with Sepabeads EC HG adsorption and Duolite A568 and hence had better degree of conversion of biodiesel. Regarding the production of biodiesel in a batch system using the biocatalysts that were immobilized in several supports, the results were the best for nature biocatalysts that contained multipoint covalent bonds with very strong covalent bonds, and the best result was for the biocatalyst Sepabeads EC -ALB in cyclohexane 10% solvent of apolar nature with molar ratio of 9:1 (absolute ethanol: sunflower oil), at 45 °C, the yield results of about 95% in 100 hours of reaction. And for biocatalysts of hydrophobic nature, immobilization by adsorption; Lewatit-TLL, Lewatit-RM and Lewatit-CALB with cyclohexane solvent 10% more polar in the molar ratio of 6:1 (absolute ethanol: sunflower oil) at 45 °C, the results were 100% in 150 hours of reaction.

**Keywords:** Lipase. Biodiesel. Bioreactors. Immobilized enzyme. Sunflower oil.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reação de transesterificação .....	35
Figura 2 – Processo de produção de biodiesel.....	36
Figura 3 – Estrutura química da cadeia $\beta(1\rightarrow4)$ -glicana (celulose) mostrando as ligações de hidrogênio intra e inter cadeias de celulose..	37
Figura 4 – Representação da estrutura tridimensional da Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> modificada*.....	39
Figura 5 – Estrutura de formas de RML abertas e fechadas. A estrutura 3D foi obtida a partir do Protein Data Bank (PDB) utilizando PyMOL versão 0.99 .....	40
Figura 6 – Forma da lipase de <i>Candida antarctica</i> B em 3D Protein Data Bank (PDB) com seu sítio ativo .....	41
Figura 7 – Estrutura de formas de TLL abertas e fechadas* .....	42
Figura 8 – Classificação dos métodos de imobilização.....	43
Figura 9 – Esquema de métodos de imobilização de enzimas .....	46
Figura 10 – Esquema do processo de ativação e imobilização de enzima em suporte glyoxilagarose.....	48
Figura 11 – Esquema da imobilização de enzimas em suporte ativado com grupos epóxidos.....	49
Figura 12 – Esquema da imobilização covalente com grupos epóxidos (Sepabeads EC) .....	50
Figura 13 – Microscopia eletrônica de varredura de enzima imobilizada em resina acrílica (Lewatit VOP 1600) imobilizada com lipase de <i>Candida antarctica</i> B (Novozym 435).....	58
Figura 14 – Processo de imobilização com Octilagarose.....	65
Figura 15 – Processo de obtenção do suporte MANAE-agarose .....	67
Figura 16 – Experimento de produção de ésteres etílicos (biodiesel) com diferentes derivados em presença de cossolvente apolar.....	70
Figura 17 – Experimento de estabilidade dos derivados com solvente polar e apolar.....	71
Figura 18 – Ácido oleico + álcool benzílico .....	73
Figura 19 – Reação de hidrólise enzimática do p-NPP .....	74
Figura 20 – Gráfico de atividade enzimática retida <i>versus</i> pH nas esferas de nanocelulose bacteriana com reagente funcionalizante EDC 0,25% g L <sup>-1</sup> .....	78
Figura 21 – Gráfico de proteínas totais retidas <i>versus</i> pH nas esferas de nanocelulose bacteriana com reagente funcionalizante EDC 0,25 g L <sup>-1</sup> 79	
Figura 22 – Gráfico de atividade enzimática retida <i>versus</i> pH nas esferas	

de nanocelulose bacteriana com reagente funcionalizante EDC 0,50 g L <sup>-1</sup> .....	80
Figura 23 – Gráfico de proteínas totais retidas <i>versus</i> pH nas esferas de nanocelulose bacteriana com reagente funcionalizante EDC 0,50 g L <sup>-1</sup> .....	81
Figura 24 – Imagem de MEV da superfície do polímero de nanocelulose bacteriana (suporte) magnificação de X350 energia 5Kv e 50 µm .....	82
Figura 25 – Imagem de MEV da nanocelulose bacteriana funcionalizada com EDC magnificação de X220 energia do feixe de 5Kv e 100 µm ..	82
Figura 26 – Imagem de MEV da nanocelulose bacteriana funcionalizada com EDC magnificação de X750 energia do feixe de 5Kv e 20 µm ....	83
Figura 27 – Imagem de MEV da nanocelulose bacteriana funcionalizada com EDC e imobilizada com lipase FAP-15 Amano com magnificação de X400 energia do feixe de 5Kv e 100 µm.....	83
Figura 28 – Imagem de MEV da nanocelulose bacteriana funcionalizada com EDC e imobilizada com lipase FAP-15 Amano com magnificação de X750 energia do feixe de 5Kv e 20 µm.....	84
Figura 29 – Espectro de FT-IR de amostra de celulose bacteriana preparada em KBr com suas bandas características.....	85
Figura 30 – Espectro de FT-IR de amostra de nanocelulose bacteriana funcionalizada com EDC preparada em KBr com suas bandas características.....	86
Figura 31 – Estabilidade térmica da enzima CALB imobilizada em Octilagarose, BrCN, MANAE0,5% Glutal e MANAE 25% Glutal à temperatura de 40 °C (n = 3).....	96
Figura 32 – Estabilidade térmica do derivado Glioxil-octilagarose-aminado-TLL nas temperaturas de 60 °C a 80 °C (n = 3).....	96
Figura 33 – Estabilidade térmica em atividade enzimática relativa do derivado BrCN-CALB a temperaturas de 40 a 60 °C (n = 3) .....	97
Figura 34 – Termoestabilidade do derivado glioxil-agarose-aminado - TLL de 70 °C a 80 °C (n = 3).....	98
Figura 35 – Estabilidade térmica dos derivados BrCN-TLL, Sepharose Q-TLL, MANAE 0,5% Glutal, MANAE 25% Glutal e Glioxil -TLL Aminada a 60 °C (n = 3) .....	99
Figura 36 – Estabilidade térmica dos derivados BrCN-TLL, Sepharose Q-TLL, Manae glutal 0,5% , Manae glutal 25% e Glioxil TLL-aminada à 60 °C (n 3).....	100
Figura 37 – Gráfico de atividade enzimática relativa de derivados diante de solvente 2-propanol à temperatura de 4 °C (n = 3).....	101
Figura 38 – Atividade enzimática residual dos derivados diante de	

Dioxano a 4 °C (n = 3) .....	102
Figura 39 – Gráfico de atividade enzimática relativa de derivados em presença de acetronitrila à temperatura de 4 °C (n = 3) .....	103
Figura 40 – Estabilidade da atividade enzimática relativa diante de 2-metil-2-butanol com os derivados Sepabeads EC-TLL, Sepabeads EC-RML e Sepabeads EC-CALB à temperatura de 40 °C (n = 3) .....	104
Figura 41 – Estabilidade da atividade enzimática relativa diante de 2-metil-2-butanol com os derivados Duolite A568-TLL, Duolite A568-RML e Duolite A568-CALB à temperatura de 40 °C (n = 3).....	105
Figura 42 – Estabilidade da atividade enzimática relativa diante de 2-metil-2-butanol com os derivados Lewatit-TLL, Lewatit-RML e Lewatit-CALB à temperatura de 40 °C (n = 3) .....	106
Figura 43 – Estabilidade da atividade enzimática relativa diante de ciclohexano com os derivados Sepabeads EC-TLL, Sepabeads EC RML e Sepabeads EC-CALB à temperatura de 40 °C (n = 3).....	108
Figura 44 – Estabilidade enzimática relativa diante de ciclohexano com os derivados Lewatit-TLL, Lewatit-RML e Lewatit-CALB à temperatura de 40 °C (n = 3) .....	109
Figura 45 – Estabilidade da atividade enzimática relativa diante de ciclohexano com os derivados Duolite A568-TLL, Duolite A568- RML e Duolite A568-CALB à temperatura de 40 °C (n = 3).....	110
Figura 46 – Reação com derivados Duolite A568-TLL, Duolite A568-RM e Duolite A568-CALB com ciclohexano a 10% e razão molar 9:1 a 45 °C (óleo de girassol/etanol absoluto) (n = 3).....	112
Figura 47 – Reação dos derivados Duolite A568-TLL, Duolite A568-RM e Duolite A568-CALB com ciclohexano a 10% e razão molar 6:1: óleo de girassol/etanol absoluto à temperatura de 45 °C (n = 3).....	113
Figura 48 – Lewatit-TLL, Lewatit-RML e Lewatit-CALB ciclohexano a 10% e razão molar 9:1: (óleo de girassol/etanol absoluto) na síntese de ésteres à temperatura de 45 °C (n = 3).....	114
Figura 49 – Reação dos derivados Lewatit-TLL, Lewatit-RM e Lewatit-CALB diante de ciclohexano a 10% e razão molar 6:1 em óleo de girassol/etanol absoluto à temperatura de 45 °C (n = 3).....	114
Figura 50 – Reação de Sepabeads-TLL, Sepabeads EC-RML e Sepabeads-CALB com ciclohexano a 10% e razão molar 9:1: (óleo de girassol/etanol absoluto) à temperatura de 45 °C (n = 3) .....	116



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático na produção de biodiesel.....	32
Tabela 2 – Resumo das principais considerações sobre imobilização enzimática .....	52
Tabela 3 – Rendimentos de imobilização de CALB ( <i>Candida antarctica</i> B) aos diferentes derivados (25 °C)*.....	87
Tabela 4 – Rendimento dos biocatalisadores com a enzima Palatase® ( <i>Rhizomucor miehei</i> ) à temperatura de 25 °C*.....	88
Tabela 5 – Rendimento de imobilização dos biocatalisadores com TLL ( <i>Thermomyces lanuginosus</i> ) à temperatura de 25 °C* .....	91
Tabela 6 – Suportes de agarose e suas correspondentes resinas comerciais .....	92
Tabela 7 – Imobilização de resinas comerciais em lipase CALB a temperatura de 25 °C*.....	92
Tabela 8 – Imobilização de resinas comerciais em lipase Palatase® (RML) à temperatura de 25 °C* .....	93
Tabela 9 – Imobilização de resinas comerciais em lipase de TLL ( <i>Thermomyces lanuginosus</i> ) à temperatura de 25 °C.* .....	94
Tabela 10 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos derivados imobilizados.....	111



## LISTA DE ABREVIATURAS

CALB	Lipase de <i>Candida antarctica</i> B
NCB	Nano Celulose bacteriana
CG	Cromatografia em Fase Gasosa
EDA	Hexametiletenodiamina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida .HCl
GLUTAL	Glutaraldeído
Gly	Glioxil
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (CLAE)
MANAE	N- amino-etil
OAg	Octilagarose
PNPB	p-nitrofenilbutirato
RML	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
ROL	Lipase de <i>Rhizomucor oryzae</i>
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>



## LISTA DE REAGENTES

<b>Reagentes</b>	<b>Procedência</b>
1,2- dioxano P.A	Merck
2-metil-2-butanol P.A	Merck
2-propanol P.A	Merck
Acetonitrila P.A	Merck
Ácido acético P.A	Sinth
Azeite de oliva P.A	Sigma
Borohidreto de sódio P.A	Merck
BrCN agarose	Merck
Ciclohexano P.A	Sinth
CTAB P.A	Sigma
Duolite A 568	Resindion (Itália)
EDA P.A - Hexametiletenodiamina	Sigma
EDC P.A - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.HCl	Sigma
Estearato (HPLC)	Sigma
Etanol P.A	Merck
Fosfato de sódio bibásico P.A	Merck
Glicidol P.A - 2,2-epoxipropanol	Sinth
Glutaraldeído	Sinth
Lewatit VP OC 1600	Lanxess
Linoleato de etila (HPLC)	Sigma
Lipase CALB <sup>®</sup>	Novozymes <sup>®</sup> Dinamarca
Lipase FAP-15 ROL	Amano Sigma-Aldrich
Lipase Lipolase <sup>®</sup> TLL	Novozymes <sup>®</sup> Dinamarca
Lipase Palatase <sup>®</sup> RML	Novozymes <sup>®</sup> Dinamarca
Metanol Grau HPLC	Sinth

Octilagarose 4 BCe	Octylagarose Resindion (Itália)
Oleato de etila (HPLC)	Sigma
Óleo de girassol P.A	Sigma
Palmitato (HPLC)	Sigma
Periodato de sódio P.A	Merck
PNPB P.A	Sigma
Sepabeads EC HG	Resindion (Itália)
Sepharose Q	Resindion
Triton-X 100	Sigma

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>31</b>
1.1 OBJETIVOS.....	33
1.1.1 Objetivo geral .....	33
1.1.2 Objetivos específicos .....	33
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>35</b>
2.1 BIODIESEL .....	35
2.2 NANOCELULOSE BACTERIANA (NCB) .....	36
2.3 LIPASES .....	37
2.3.1 Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> .....	39
2.3.2 Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> .....	39
2.3.3 Lipase de <i>Candida antarctica</i> B (CALB) .....	40
2.3.4 Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL).....	41
2.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	42
2.5 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO .....	43
2.5.1 Ligação química na imobilização .....	45
2.5.2 Imobilização covalente em suportes sólidos .....	46
2.6 O ESTADO DA ARTE DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	51
2.7 PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR CATÁLISE ENZIMÁTICA E POR CÉLULAS IMOBILIZADAS .....	57
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>61</b>
3.1 PROTOCOLO DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LIPASE DE <i>RHIZOPUS ORYZAE</i> AMANO FAP-15 EM MICROESFERAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA .....	61
3.2 PROTOCOLOS DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM SUPORTES SÓLIDOS .....	61
3.3 PURIFICAÇÃO DA ENZIMA LIPOLASE® (NOVOZYMES) COM SURFACTANTE HEXADECILTRIMETILAMÔNIO (CTAB).....	62
3.4 IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES CALB ( <i>CANDIDA ANTARCTICA</i> B), RML ( <i>RHIZOMUCOR MIEHEI</i> ) E TLL ( <i>THERMOMYCES LANUGINOSUS</i> ) EM OCTILAGAROSE 4BCE .....	63
3.5 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM SEPHAROSE Q <i>BIG BEADS</i> (LIGAÇÃO IÔNICA) .....	63

3.6 IMOBILIZAÇÃO COM BROMETO DE CIANOGENIO (BRCN) COM LIPASE DE (CALB, RML E TLL) POR IMOBILIZAÇÃO COVALENTE UNIPONTUAL .....	64
3.7 AMINAÇÃO DE LIPASES PARA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO SOBRE GLIOXILAGAROSE...	64
3.7.1 Preparação de solução de Hexametileno-diamina (EDA)...	65
3.7.2 Preparo do suporte glicerilagarose.....	65
3.7.3 Preparo do suporte manae-agarose (Mono-Amino-n-Amino-Etil).....	66
3.7.4 Imobilização das lipases RML, CALB e TLL em MANAE com glutaraldeído 0,5% .....	67
3.7.5 Imobilização de MANAE com Glutaraldeído 25% V/V em enzimas RML, CALB e TLL.....	67
3.7.6 Imobilização por adsorção iônica de lipases (RML, CALB e TLL) ao suporte Duolite 568.....	68
3.7.7 Imobilização das lipases RML, CALB E TLL por adsorção hidrofóbica ao suporte Lewatit VP OC 1600.....	68
3.7.8 Imobilização covalente em suportes ativados com grupos glioxis em suporte Sepabeads EC.....	68
3.8 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES COM OS DERIVADOS PREPARADOS E UTILIZAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL EM BATELADA .....	69
3.9 ESTUDO DA ESTABILIDADE DOS DERIVADOS DIANTE DE SOLVENTES ORGÂNICOS (POLARES E APOLARES).....	71
3.10 PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS.....	71
3.11 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA DOS DERIVADOS (CICLOHEXANO E 2-METIL-2-BUTANOL).....	72
3.12 ATIVIDADE ENZIMÁTICA COM P-NITROFENILBUTIRATO (PNPB).....	73
3.13 ATIVIDADE ENZIMÁTICA COM P-NITROFENIL PALMITATO (P-NPP).....	74
3.14 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS .....	74
3.15 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	74
3.16 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) .....	74
3.17 ANÁLISE DOS GRUPOS FUNCIONAIS POR FT-IR.....	74
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>

4.1 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LIPASE COMERCIAL <i>RHIZOPUS ORYZAE</i> AMANO FAP-15 .....	77
4.2 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LIPASE DE <i>RHIZOPUS ORYZAE</i> AMANO FAP-15 EM MICROESFERAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA .....	77
4.3 AVALIAÇÃO POR IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E FT-IR DAS MICROESFERAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA (NBC)..	81
4.4 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES COMERCIAIS CALB, PALATASE® (RML) E TLL SOBRE OCTILAGAROSE, GLIOXILAGAROSE, BROMETO DE CIANOGENÍO, SEPHAROSE Q BIG B, MANAE .....	86
4.5 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO DE CALB E PALATASE® ( <i>RHIZOMUCOR MIEHEI</i> - RML) SOBRE DERIVADOS DE GLIOXILAMINO .....	87
4.6 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO DA PALATASE ( <i>RHIZOMUCOR MIEHEI</i> ) SOBRE DERIVADOS DE SEPHAROSE Q, OCTILAGAROSE, BRCN E MANAE .....	88
4.7 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO DA TLL ( <i>THERMOMYCES LANUGINOSUS</i> ) SOBRE MANAE 0,5 % E MANAE 25% COM GLUTARALDEÍDO A 25 °C .....	90
4.8 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO DE TLL SOBRE LEWATIT, DUOLITE E SEPABEADS À TEMPERATURA DE 25 °C.....	91
4.9 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO DA PALATASE® (RML) E LIPOLASE® (TLL) SOBRE LEWATIT, DUOLITE E SEPABEADS À TEMPERATURA DE 25 °C .....	93
4.10 IMOBILIZAÇÃO DE RESINAS COMERCIAIS EM LIPASE LIPOLASE® (TLL) À TEMPERATURA DE 25 °C.....	94
4.11 RESULTADOS DA ESTABILIDADE TÉRMICA DOS DERIVADOS .....	95
4.12 ESTUDO DA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA RELATIVA DIANTE DE SOLVENTES POLARES E APOLARES	100
4.13 EXPERIMENTOS DE ESTABILIDADE DOS DERIVADOS COM ÁCIDO OLEICO EM SOLVENTE POLAR E APOLAR .....	103
4.14 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES COM OS DERIVADOS PREPARADOS E UTILIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	110

<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>117</b>
--------------------------	------------

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	118
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>119</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A sociedade está passando por um processo de conscientização em que a preocupação com o meio ambiente já é uma questão de sobrevivência do nosso planeta. O consumo de combustíveis fósseis levou a uma grande degradação ambiental, e o seu uso em larga escala está marcado para um fim já determinado (ROBLES-MEDINA et al., 2009). A pesquisa de novas fontes renováveis de energia já é uma realidade em vários países, sendo o Brasil um dos pioneiros nessa área, e seu emprego torna-se imprescindível por questões ambientais e também por questões econômicas. Desde a década de 1970, o Brasil vem pesquisando novas fontes de biocombustíveis. O etanol já é uma realidade no uso como combustível misturado à gasolina e também nos automóveis *flex* (automóveis movidos à gasolina e/ou a etanol). O biodiesel, que são ésteres de ácidos graxos de origem animal e vegetal, também faz parte desse grupo de biocombustíveis, atualmente, é utilizado no Brasil em misturas com diesel a 5%. A produção de biodiesel no país tem aumentado nos últimos anos pelo incentivo que o Governo Federal tem dado à sua produção por meio do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) e também da pesquisa de novas rotas tecnológicas para sua obtenção, com incentivo financeiro de toda a cadeia produtiva (ANP, 2008). Vale ressaltar que a rota mais utilizada em nível mundial é a catálise básica ou ácida com o uso de metanol, pois ela é mais rápida e também oferece grandes rendimentos de ésteres metílicos (FUKUDA, 2009).

Os processos que utilizam catálise ácida ou básica para a produção de biodiesel causam grande impacto para o meio ambiente, pois produzem uma grande quantidade de efluentes líquidos corrosivos. Assim, os processos de obtenção de biodiesel mais limpos estão sendo pesquisados em todo o mundo, e a utilização de enzimas imobilizadas (ex.: lipases), sobre vários tipos de suportes, orgânicos ou inorgânicos, está tendo grande desenvolvimento nas últimas décadas. O processo de obtenção comercial de biodiesel é realizado por via química - por uma base forte (NaOH ou KOH) ou por um ácido forte (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Mas a catálise enzimática, que consiste na utilização de enzimas lipase imobilizadas em suportes de origem polimérica e de suportes inorgânicos em reações de alcóólise enzimática em condições brandas de temperatura e pressão, tem despertado o interesse da comunidade científica. Os produtos da reação são ésteres de ácidos graxos e glicerina obtidos em ambos os processos. A Tabela 1 mostra as vantagens e desvantagens no processo químico e enzimático:

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático na produção de biodiesel.

Processos	Vantagens	Desvantagens
Químico	Simplicidade	Dificuldade de separação do catalisador
	Alto rendimento	Impossibilidade de reutilização do catalisador
	Curto tempo de reação	Dificuldade de utilização de etanol hidratado Obtenção de produtos com menor grau de pureza
Enzimático	Facilidade de separação do catalisador (suporte)	Longo tempo de reação
	Obtenção de produtos com maior pureza	Custo das enzimas
	Utilização de etanol hidratado na reação	Baixo rendimento

Fonte: Elaborada pelo autor (2016).

As pesquisas relacionadas à produção de lipases em meio submerso utilizando fungos filamentosos (*Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lunuginosus*, *Rhizomucor miehei*, etc.) tiveram grande desenvolvimento nos últimos anos, porque essas lipases são empregadas em vários processos industriais para a obtenção de produtos de alto valor agregado, como fármacos, polímeros, alimentos, biocombustíveis, etc. As lipases de origem de micro-organismos, como bactérias e fungos, são mais facilmente obtidas por causa da abundância desses micro-organismos na natureza, onde são isolados, e então são realizados cultivos para a produção dessas lipases e, posteriormente, a sua purificação. A lipase obtida do fungo *Rhizopus oryzae*, por exemplo, tem grande versatilidade em biocatálise e na síntese do biodiesel, pois apresenta grande estereoespecificidade, catalisando uma só posição (1-3) do triacilglicerol na reação de transesterificação com álcoois (metanol ou etanol). O fungo *Rhizopus oryzae* é um grande produtor de enzima lipase e bastante estudado atualmente (HAMA et al., 2006; LI et al.,

2007; FUKUDA et al., 2008; SHU et al., 2009; WANG et al., 2008; RODRIGUES; FERNANDEZ, 2010).

Diversos autores utilizam células imobilizadas ou lipases imobilizadas em suportes variados para a finalidade de estudarem a alcóolise de óleos vegetais em meio orgânico por catálise enzimática (FUKUDA et al., 2009; SHU et al., 2009; HAMA et al., 2006; HAMA et al., 2009; LI et al., 2007; QIN, 2008; ZENG, 2006). O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por facilitar a reutilização dos catalisadores enzimáticos, facilitar a separação dos produtos das respectivas reações e aumentar a estabilidade diante de solventes orgânicos. E no caso de sistemas contínuos para a síntese de biodiesel, do ponto de vista econômico, é mais vantajoso porque utilizam enzimas imobilizadas, com o reaproveitamento do biocatalisador em outras reações, enquanto a atividade enzimática do biocatalisador estiver estável ao longo do tempo de reação. Assim sendo, o principal objetivo no processo de imobilização de uma enzima seria obter um biocatalisador com alta atividade catalítica e estabilidade, onde estas possam ser mantidas um longo tempo durante o processo, em comparação à enzima livre.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Imobilizar lipases comerciais de *Candida antarctica* B (CALB<sup>®</sup>), *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase<sup>®</sup>) e *Rhizomucor miehei* (Palatase<sup>®</sup>) em diversos suportes sólidos para a alcóolise enzimática para produção de biodiesel.

### 1.1.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos deste trabalho:

- Imobilizar lipase comercial de *Rhizopus oryzae* Amano FAP-15 em microesferas de celulose bacteriana.
- Imobilizar as lipases comerciais de *Candida antarctica* B (CALB), *Thermomyces lanuginosus* (TLL), *Rhizomucor miehei* (RML) da Novozymes<sup>®</sup> nos seguintes suportes: Octilagarose, Brometo de cianogênio, Sepharose Q Big Beads, Glioxilagarose,

MANAE-agarose, Duolite A 568, Lewatit VP OC 1600 e Sepabeads EC HG.

- Avaliar a produção de biodiesel em reator do tipo batelada, utilizando derivados preparados por adsorção hidrofóbica e covalente multipontual; na presença de cossolvente ciclohexano na razão molar de 6:1 e 9:1.

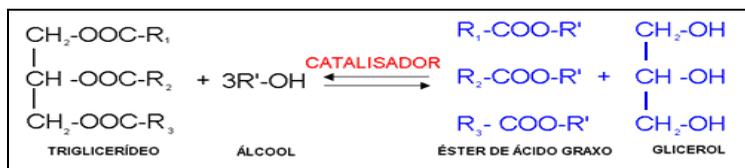
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BIODIESEL

A crescente preocupação com a crise planetária ambiental, associada ao uso de combustíveis fósseis, impulsionou a pesquisa por novas fontes de energia. Uma interessante alternativa para a substituição dos combustíveis fósseis são os biocombustíveis. O termo biocombustível refere-se ao combustível líquido ou gasoso que é predominantemente produzido a partir de biomassa. Dessa forma, o biodiesel é um biocombustível constituído de uma mistura de ésteres de ácidos graxos que podem ser obtidos de óleos vegetais ou gorduras animais. A obtenção do biocombustível pode ser realizada por meio de uma reação de transesterificação ou de uma reação de esterificação. Das reações citadas, a mais utilizada para a produção de biodiesel é a reação de transesterificação, pois fornece um coproduto que possui diversas aplicações em vários segmentos industriais: o glicerol.

Nas reações de transesterificação, a produção de biodiesel forma ésteres alquílicos e glicerol, e a camada desse poliálcool, mais densa que os ésteres, se deposita no fundo do recipiente da reação. O processo se baseia na reação estequiométrica do alquil glicerol com álcool em presença de um catalisador químico ou enzimático (Figura 1).

Figura 1 – Reação de transesterificação

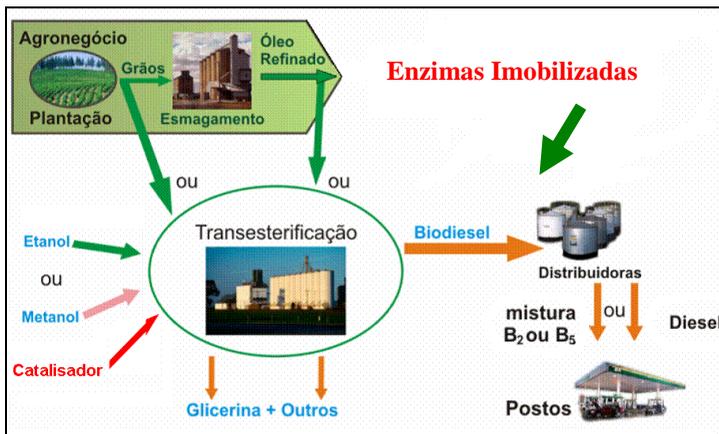


Fonte: Elaborada pelo autor (2015).

As reações de transesterificação podem ser conduzidas através do uso de um catalisador ácido ou básico, catalisador enzimático ou fluidos supercríticos. Embora a transesterificação usando catalisadores álcalis forneça elevadas taxas de conversão de triglicéridos para os seus correspondentes ésteres em curtos períodos de tempo, a reação possui inúmeros inconvenientes: o elevado custo para a recuperação do glicerol; a necessidade de o catalisador ser removido do produto; a produção de resíduos alcalinos que precisam de tratamento; o fato de os

ácidos graxos livres e a água prejudicarem a reação (Figura 2). Tais inconvenientes conduziram as pesquisas por novos catalisadores. Nesse contexto, a produção de biodiesel catalisada pelas enzimas lipases vem recebendo atenção especial por eliminar ou reduzir os problemas citados acima, tornando-se uma promissora rota alternativa às tradicionais rotas químicas com o uso de diversos tipos de reatores químicos, como reatores do tipo batelada e reatores contínuos para a obtenção de biodiesel com enzimas imobilizadas (DORS, 2011; POPPE et al., 2015).

Figura 2 – Processo de produção de biodiesel



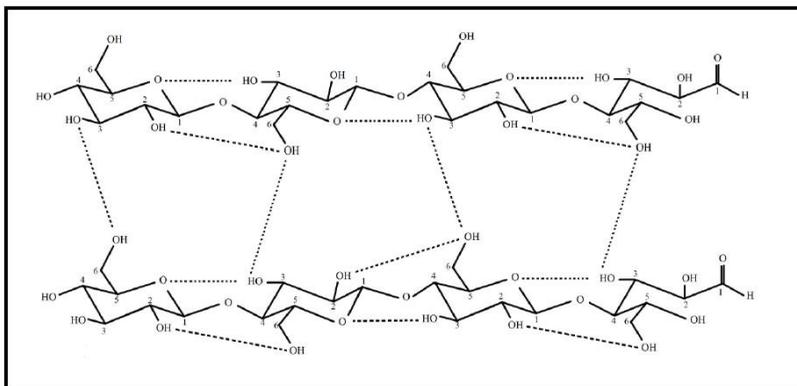
Fonte: Elaborada pelo autor (2016).

## 2.2 NANOCELULOSE BACTERIANA (NCB)

A celulose é um dos carboidratos mais comuns e abundantes no mundo e tem sido amplamente estudada durante décadas. Embora seja um biopolímero estrutural de todas as plantas, várias bactérias são produtoras. A celulose de plantas é normalmente misturada com lignina e hemicelulose, mas, a nanocelulose bacteriana cultivada a partir de bactérias ou nanocelulose bacteriana (NCB), contém cadeias paralelas compostas de unidades de D-glicopiranosose interligadas por hidrogênio intra e intermoleculares, que têm composição química idêntica à das celuloses de plantas. A nanocelulose bacteriana (NCB) exibe muitas propriedades físico-químicas comuns e mecânicas, incluindo pureza mais elevada, maior cristalinidade, maior grau de polimerização, maior absorção de água, maior resistência à tração e mais forte adaptabilidade biológica. A NCB representa uma promissora alternativa para aplicações

específicas em biomedicina, biotecnologia, imobilização de enzimas, cosméticos, fabricação de papel, indústria de alimentos e outras aplicações (SHENG-CHI; YING-KE, 2008; HU et al., 2014; LIN; DUFRESNE, 2014; MOHAMMADKAZEMI et al., 2015).

Figura 3 – Estrutura química da cadeia  $\beta(1\rightarrow4)$ -glicana (celulose) mostrando as ligações de hidrogênio intra e inter cadeias de celulose.



Fonte: ESA et. al. (2014)

## 2.3 LIPASES

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases (EC 3.1.1.3) catalisam “*in vivo*” a hidrólise de ésteres carboxílicos em tri-, di-, e monogliceróis. Como produtos da reação, ácidos carboxílicos e álcoois com um número menor de ésteres (e eventualmente glicerol) são liberados. A reação simplifica-se da forma seguinte:



onde TAG = triacilglicerídeo, DAG = diacilglicerídeo, MAG = monoacilglicerídeo e AGL = ácido graxo livre.

No caso mais geral, lipídeos, ou mesmo moléculas sintéticas, como ésteres, podem sofrer vários tipos de transformações catalisadas por lipases (VAN GERPEN et al., 2004).

Durante o processo de catálise enzimática, um dos grandes subprodutos é o glicerol, que pode ser facilmente recuperado em processo não muito complexo, e os ácidos graxos livres também podem ser convertidos em seus ésteres correspondentes, o que torna esse

processo de catálise interessante do ponto de vista comercial, pois todos são utilizados e convertidos em produtos de alto valor agregado, recuperando a enzima imobilizada no final da reação. Ainda que, em termos econômicos, o custo de produção das lipases seja significativamente maior do que o dos catalisadores químicos, estes últimos são, em contrapartida, muito mais pesados do ponto de vista do manejo ambiental (MACEDO; MACEDO, 2004; KAPOOR; GUPTA, 2012).

Vários tipos de álcoois podem ser empregados na transesterificação catalisada por lipases, ainda que elas sejam conhecidas por terem a propensão a agir mais efetivamente em moléculas de cadeia carbônica longa do que em cadeia carbônica curta (SHIMADA et al., 1998; SHIMADA et al., 1999). Assim, de modo geral, a eficiência da transesterificação dos triglicerídeos com metanol parece ser muito menos favorecida do que com etanol (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; RODRIGUES; FERNANDEZ, 2010).

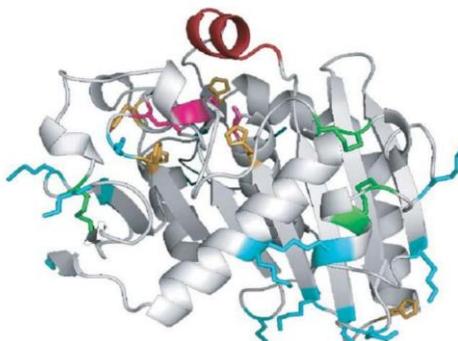
Uma série de trabalhos de pesquisa vem sendo publicada a respeito da alcoólise de óleos por lipases. Os principais resultados dos estudos mencionados (entre outras publicações) podem ser sintetizados nos seguintes trabalhos (SHIMADA et al., 2002; DORS, 2011; HAMA et al., 2011a, 2011b, 2012c; SÉVERAC et al., 2011; STERGIOU et al., 2013; TEO et al., 2014; CHRISTOPHER et al., 2014; AARTHY et al., 2014; GULDHE et al., 2015), como se segue:

- a) a alcoólise de metanol e etanol ocorre mais eficientemente na presença de solvente orgânico do que em meio aquoso;
- b) as lipases catalisam a alcóólise de triglicerídeos, e as reações ocorrem mais eficientemente se a cadeia carbônica for maior do que a do etanol e metanol;
- c) a não ser que a lipase seja imobilizada e permita a reutilização, o processo pode ser muito dispendioso;
- d) as vantagens ambientais do processo enzimático são evidentes: menor gasto energético com temperatura e pressão, mais fácil recuperação dos produtos e menor quantidade de glicerol como subproduto.
- e) lipases podem ser produzidas por plantas, animais e micro-organismos. Entre os diversos tipos de micro-organismos utilizados para a produção de lipases, merecem destaque os fungos, porque são facilmente encontrados e isolados da natureza.

### 2.3.1 Lipase de *Rhizopus oryzae*

A Figura 4 apresenta a estrutura tridimensional da lipase de *Rhizopus oryzae* modificada geneticamente. Segundo Bornscheur (2008), essa estrutura possui os resíduos do sítio ativo característicos das lipases (Ser145, Asp204 e His257), localizadas no centro da molécula. A maioria das lipases possui uma parte da molécula da enzima que cobre o sítio ativo com uma curta  $\alpha$ -hélice, chamada *lid* (tampa). Essa "tampa" possui cadeias laterais hidrofóbicas que, em ambientes aquosos, sem o seu substrato natural, sofrem um dobramento, fazendo com que a *lid* cubra o sítio catalítico. Nesse estado, a lipase encontra-se inativa, e diz-se que ela está na sua forma "fechada". Na presença de substratos hidrofóbicos, as lipases são "adsorvidas" na interface hidrofóbica, o que promove alterações em sua conformação, levando à forma "aberta" da lipase.

Figura 4 – Representação da estrutura tridimensional da Lipase de *Rhizopus oryzae* modificada\*



\*As fitas  $\beta$  estão representadas como setas e as  $\alpha$ -hélices espiral. Os resíduos da triade catalítica estão mostrados em rosa e a tampa *lid* em vermelho.

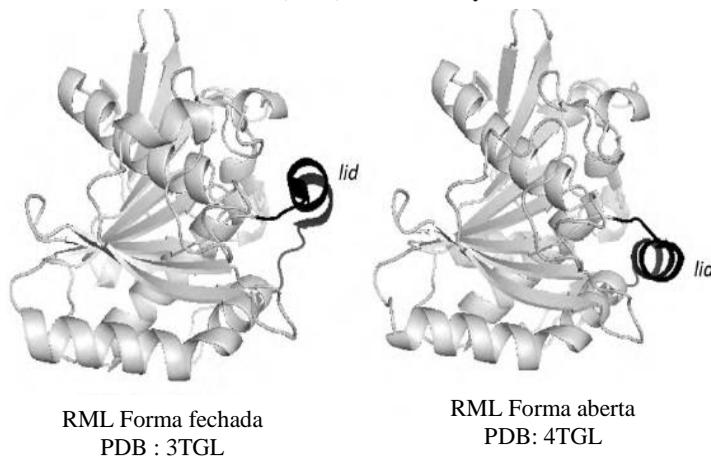
Fonte: Bornscheur (2001).

### 2.3.2 Lipase de *Rhizomucor miehei*

Esta enzima extracelular foi descrita pela primeira vez em 1973. Poucos anos mais tarde descreveu-se uma primeira utilização da enzima na transformação de alimentos. A lipase de *Rhizomucor miehei* (RML), anteriormente *Mucor miehei* (Figura 5), é uma enzima disponível comercialmente em ambas as formas solúveis e imobilizadas com atividade muito alta e boa estabilidade sob condições experimentais

(condições de solventes orgânicos anidros, fluidos supercríticos, etc.). Utiliza-se essa lipase para a indústria de alimentos, indústria farmacêutica e de óleos e gorduras e produção de biodiesel (RODRIGUES, FERNANDEZ, 2010).

Figura 5 – Estrutura de formas de RML abertas e fechadas. A estrutura 3D foi obtida a partir do Protein Data Bank (PDB) utilizando PyMOL versão 0.99



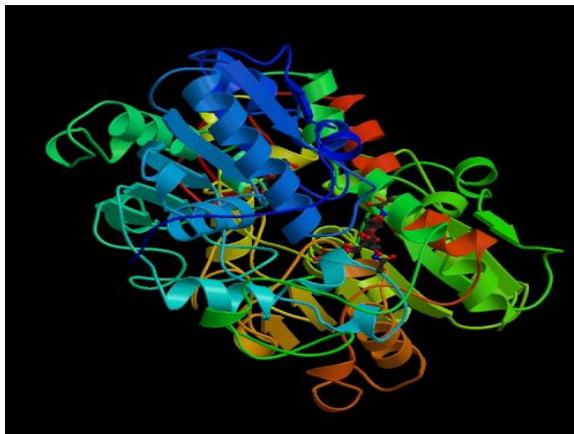
Fonte: Rodrigues, Fernandez (2010), adaptada pelo autor.

### 2.3.3 Lipase de *Candida antarctica* B (CALB)

A lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) é constituída de 317 resíduos de aminoácidos com estrutura globular e dimensões de 30 Å x 40 Å x 50 Å, tem peso molecular de 33 kDa e ponto isoelétrico (PI) de 6,0 (UPPENBERG et al., 1994).

Os autores observaram que na estrutura da CALB, o sítio ativo está acessível ao solvente através de um canal tortuoso. As paredes desse canal são bastante hidrofóbicas e formadas por resíduos alifáticos alinhados. Essa lipase não apresenta a “tampa”, responsável pela hiperativação característica de outras lipases. A Figura 6 mostra uma representação da estrutura molecular da CALB.

Figura 6 – Forma da lipase de *Candida antarctica* B em 3D Protein Data Bank (PDB) com seu sítio ativo



Fonte: [www.rscb.org/pdb/home/home.do](http://www.rscb.org/pdb/home/home.do).

A CALB está comercialmente disponível em várias formulações para aplicações em solventes orgânicos ou meio aquoso. A lipase de *Candida antarctica do tipo B* (CALB) é a enzima mais estudada e utilizada na indústria pela sua característica de suportar temperaturas; isto é, muito termoestável a temperaturas altas de até 100°C, sem haver a sua desnaturação.

Essas formulações são bastante ativas mesmo em baixa atividade de água e podem tolerar solventes relativamente polares como a acetonitrila.

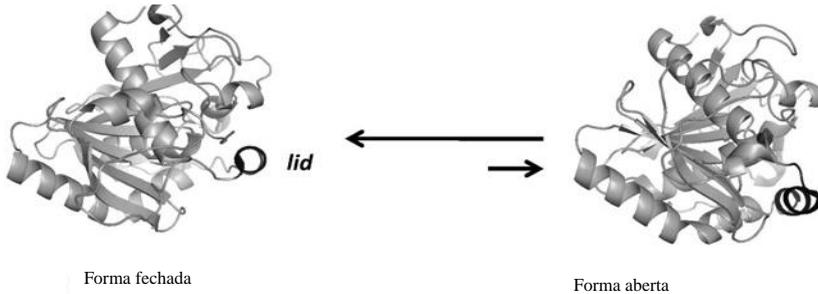
As aplicações industriais importantes de CALB, tanto na forma livre quanto imobilizada, são: síntese de triglicerídeos e esterificação de álcoois terpênicos; esterificação de açúcares, nucleotídeos e esteróides; resolução de álcoois secundários via hidrólise ou esterificação em solventes orgânicos; síntese de anti-inflamatórios e alcoólise enzimática de óleos e gorduras para a produção de biodiesel (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

#### **2.3.4 Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL)**

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (anteriormente *Humicola lanuginosa*) (TLL) (Figura 7) é uma enzima basofílica e visivelmente termoestável, comercialmente disponível tanto na forma solúvel e imobilizada, empregada na indústria de alimentos, que tem muitas

aplicações em diferentes áreas na indústria, desde a produção de biodiesel até a química fina (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Figura 7 – Estrutura de formas de TLL abertas e fechadas\*



\*A estrutura 3D foi obtida a partir do Protein Data Bank (PDB) utilizando PyMOL versão 0.99.

Fonte: Fernandez-Lafuente (2010), adaptada pelo autor.

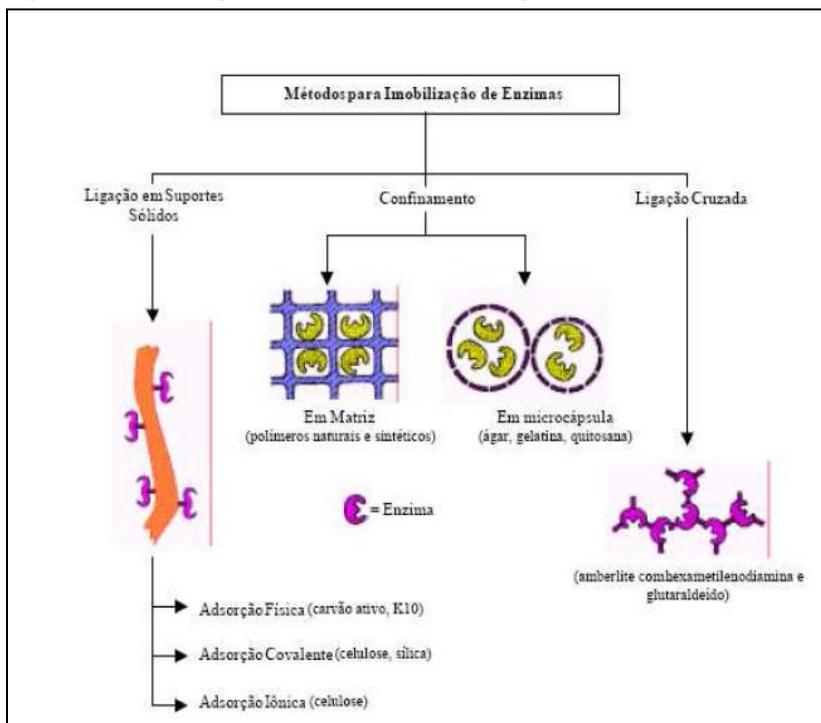
## 2.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A definição mais aceita para enzimas imobilizadas é a recomendada pela Primeira Conferência sobre Engenharia Enzimática, realizada em 1971, que estabelece que “enzimas imobilizadas são enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizados em certa região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente. A enzima pode ser ligada ao suporte sólido ou fisicamente confinada no interior de uma matriz sólida (MATEO et al., 2007a). Esta é a definição de um sistema catalítico que pode ser facilmente separado da mistura reacional para ser utilizado em reatores contínuos ou sistemas em batelada repetida, enquanto o sistema enzimático se mantiver ativo (ROBLES-MEDINA, 2009).

O termo enzima imobilizada inclui: a) enzimas modificadas de forma a se tornarem insolúveis em água; b) enzimas na forma solúvel quando utilizadas em reatores equipados com membranas de ultrafiltração que permitem o escoamento dos produtos da reação retendo a enzima no interior do reator; c) enzimas com mobilidade restringida pela ligação a outra molécula, tornando o sistema insolúvel no meio reacional (HAMA; TAMALAMPUDI; FUKUMIZU, 2006; HAMA et al., 2011).

A imobilização de enzimas justifica-se pela dificuldade em recuperá-las livres do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e frequente inadequabilidade para seu uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, inconvenientes que podem ser superados por meio da imobilização, visto que enzimas imobilizadas podem ser reutilizadas, são normalmente mais estáveis do que enzimas livres e podem ser utilizadas em um sistema contínuo (Figura 8).

Figura 8 – Classificação dos métodos de imobilização



Fonte: Mendes (2009)

## 2.5 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Existe um grande número de métodos de imobilização que podem ser amplamente divididos de acordo com a interação da enzima com o suporte (geralmente por meio de uma ligação química).

Por causa de suas excelentes propriedades funcionais (atividade, seletividade, especificidade), as enzimas têm um grande potencial como catalisadores industriais em várias áreas da indústria química: química fina, química de alimentos, análise, e assim por diante. No entanto, as enzimas foram modificadas durante a evolução para otimizar o seu comportamento no âmbito de complexos catalíticos, em geral solúveis no interior de células vivas, sob estresse e sujeitas à regulação. Tendo em vista que as enzimas não foram otimizadas por evolução a fim de funcionar como catalisadores em reatores industriais, algumas das suas propriedades não são adequadas para esta função: elas são solúveis em água, instáveis em condições diferentes do meio fisiológico, frequentemente inibidas por substratos e produtos da reação e apresentam especificidade do substrato. Isto implica que, na maioria dos casos, as enzimas precisam ser adaptadas para a sua aplicação como catalisadores industriais.

A engenharia de enzimas para tal fim é um dos mais emocionantes e complexos objetos de estudo da biotecnologia e utiliza diferentes ferramentas, tais como:

- a) a triagem, no interior da biodiversidade, de enzimas com propriedades melhoradas;
- b) a melhoria das propriedades de enzimas através de técnicas de biologia molecular;
- c) a melhoria das propriedades da enzima por meio de técnicas de imobilização e de pós-imobilização;
- d) a melhoria das propriedades de enzimas através de reação e engenharia de reatores.

Essas técnicas se complementam para haver sucesso na melhoria da enzima; para que com a aplicação desses biocatalisadores à indústria química seja mais sustentável e para que os compostos sintetizados sejam úteis sob condições muito suaves de temperatura e pressão.

Por razões técnicas e econômicas, a maioria dos processos químicos catalisados por enzimas requer a reutilização ou a utilização contínua do biocatalisador (KATCHALSKI-KATZIR KRAEMER, 2000). Nesse contexto, a imobilização de enzimas pode ser definida como qualquer técnica que permite a utilização ou reutilização contínua do biocatalisador. A imobilização de enzimas é talvez a abordagem mais relevante para a sua estabilização e recuperação. A partir de uma perspectiva industrial, a simplicidade, o custo e a eficácia são propriedades importantes das técnicas de imobilização; mas, em longo

prazo, na aplicação industrial, a reutilização das enzimas imobilizadas também requer a preparação de muitos derivados estáveis com propriedades funcionais corretas (seletividade, atividade, etc.) para uma dada reação (SOUMANOU; BORNSCHEUER, 2003; CAO; LANGEN; SHELDON, 2003).

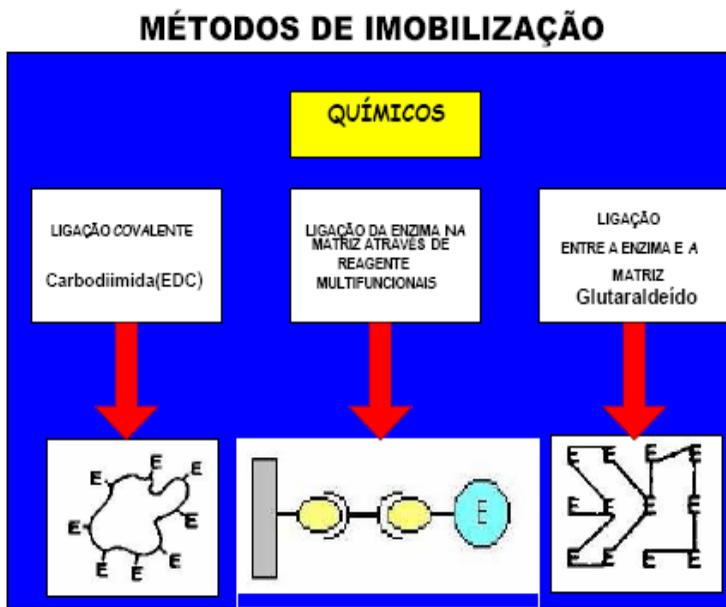
À primeira vista, o desenvolvimento prático de protocolos para a imobilização de enzimas está estreitamente relacionado à simplicidade, ao custo-efetividade e à estabilização. A imobilização de enzimas tem profunda influência sobre a natureza do processo catalítico, que é agora heterogêneo por natureza, uma vez que a catálise ocorre na superfície ou no interior de uma estrutura sólida onde a enzima está localizada, enquanto os substratos e os produtos de reação estão no líquido e no meio de reação, onde os seus produtos estão sendo monitorados.

### **2.5.1 Ligação química na imobilização**

Os métodos de imobilização incluem a ligação química das moléculas de enzima a um suporte inerte, onde a ligação pode ser covalente ou não covalente, e aquelas em que as moléculas de proteína de enzima estão quimicamente ligadas entre si, geralmente por meio de um reagente bifuncional, sem a participação de um suporte inerte.

Diferentes tipos de materiais têm sido usados como suportes para enzimas imobilizadas, considerando ambos os compostos, orgânicos e inorgânicos (Figura 9). As propriedades desejáveis do suporte são: uma elevada área superficial, elevada capacidade de ligação às proteínas, compatibilidade e insolubilidade no meio reacional, estabilidade mecânica e química, capacidade de recuperação após a utilização e flexibilidade conformacional. Não há nenhum material que preencha todos esses requisitos, de modo que, na prática, todos os tipos de materiais têm sido testados para se adequarem às necessidades particulares de um determinado processo.

Figura 9 – Esquema de métodos de imobilização de enzimas



Fonte: Elaborada pelo autor (2016).

Muitos dos materiais testados em escala de laboratório não são, contudo, adequados para serem utilizados como suportes em escala produtiva, ou por causa de suas propriedades intrínsecas, ou por causa do seu alto custo. No final, a disponibilidade e o custo são fatores-chave na determinação do suporte a ser utilizado. Salienta-se que a maioria dos desenvolvimentos na imobilização de enzimas refere-se à sua utilização em meio aquoso, convencional, de modo que se deve fazer uma análise completa quando se definirem suportes apropriados para sua utilização em meios não aquosos (ADLERCREUTZ, 2000).

### 2.5.2 Imobilização covalente em suportes sólidos

Neste tipo de imobilização, estabelece-se uma ligação covalente entre os grupos funcionais no suporte ativado e os grupos químicos dos resíduos de aminoácidos da enzima, que podem ser: OH, SH, NH<sub>2</sub> e COOH etc. Nos últimos tempos, publicaram-se diversos trabalhos relacionados com esse método de imobilização, e um dos grupos que mais tem trabalhado nesse campo é liderado pelo professor Jose Manuel

Guisán, no Instituto de Investigações em Biocatálise Enzimática, em Madrid, Espanha, no Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP)(GUISÁN, 2006). Entre os processos de imobilização covalente de enzimas, podemos destacar a união covalente multipontual, em que a interação da enzima com os grupos funcionais do suporte tem lugar através de inúmeros pontos e é particularmente interessante, uma vez que, normalmente, leva a uma rigidificação muito grande entre essas duas estruturas (enzima e suporte), o que sempre se traduz em uma maior estabilidade (térmica e/ou diante de solventes)(GUISÁN et al., 2006; GUISÁN, 1988).

O estabelecimento de um número de ligações entre cada molécula de enzima imobilizada com o suporte exerce fortes efeitos estabilizadores. Quando os braços espaçadores (distância entre a enzima e o suporte) são muito curtos, é de se esperar que todas as posições relativas entre os resíduos de enzimas envolvidas na imobilização multipontual tenham de permanecer inalteradas durante qualquer mudança conformacional induzida por qualquer agente de distorção (temperatura, cossolventes orgânicos, modificações drásticas de pH, etc.). Dessa forma, a intensidade dessas mudanças conformacionais deve ser fortemente diminuída (GUISÁN et al., 2006).

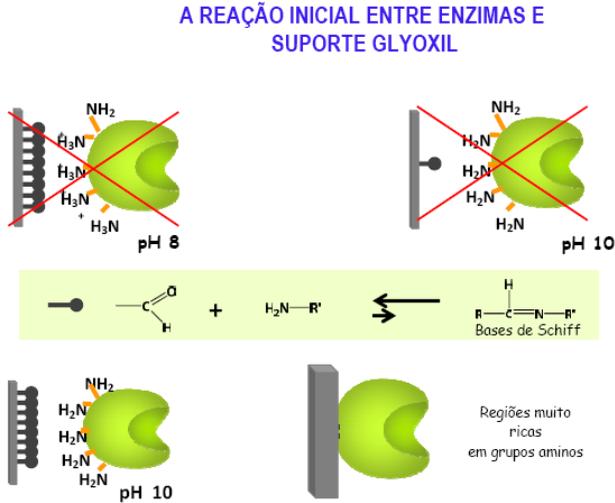
Apesar disso, depois de muitos anos de pesquisa, existem poucos protocolos úteis para promover a imobilização da enzima covalente multipontual ao suporte que confira uma estabilização da estrutura tridimensional da enzima no suporte, como esses dois grandes grupos funcionais.

A união covalente multipontual é um método em que o processo de ativação dos suportes pode ser estendido para uma grande diversidade de materiais, como por exemplo, suportes acrílicos, vidros porosos, nanopartículas, partículas magnéticas, etc. Os suportes mais utilizados para a união covalente multipontual são os que aparecem ativados com grupos aldeídos (glioxil) e os ativados com grupos epóxidos, já que, devido às suas características, permitem modular as propriedades físicas e químicas e, conseqüentemente, orientar a imobilização nos diferentes grupos reativos na superfície da enzima e assim obter diferentes derivados da mesma enzima (PALOMO et al., 2004).

Um dos suportes que mais foram usados até agora para a finalidade de imobilização são os géis de agarose, já que são compostos com fibras grandes com uma alta congruência geométrica com superfícies de proteína (MATEO et al., 2006) e pela possibilidade de os considerarmos “GRAS” (*Generally Recognized As Safe* – geralmente

reconhecidos como seguros) em processos de tecnologia de alimentos (MATEO et al., 2005). Apresenta-se um esquema geral do processo de sua ativação na Figura 10.

Figura 10 – Esquema do processo de ativação e imobilização de enzima em suporte glyoxilgarose

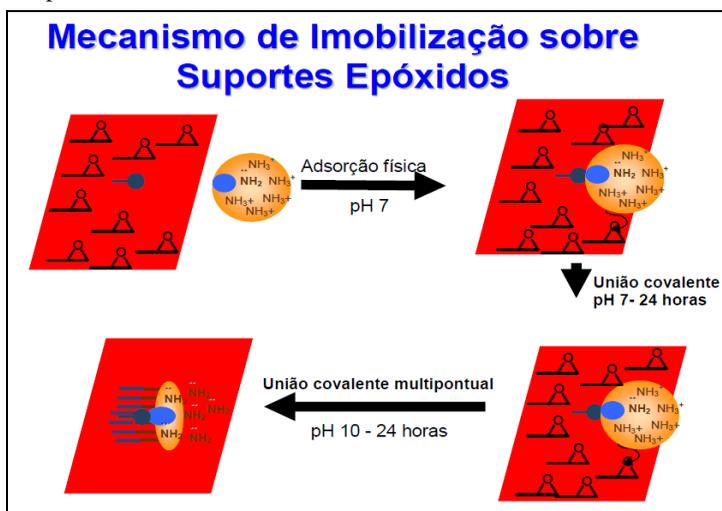


Fonte: Elaborada pelo autor (2016).

Apesar das excelências que acabamos de comentar sobre esses suportes, eles também têm uma limitação química e técnica bastante grande. Normalmente a reação entre os grupos aldeídos desses suportes e os grupamentos aminos na superfície da enzima não ocorre a pH 7. Esta explicação vem dos grupos amino das lisinas na superfície das enzimas (grande densidade desses grupos, que normalmente têm um pKa muito próximo a 10,0 - 10,5). Essa característica faz com que os grupos aminos não fiquem protonados em pH igual a 7,0 e, conseqüentemente, não fiquem reativos. Além disso, o pH 7,0 proporciona uma baixa força iônica (5-10 mM), somente estaria reativo o amino terminal da enzima, o que não bastará para fazer imobilização covalente multipontual nesse caso. Para sanar esse inconveniente, será necessário realizar diretamente o processo de imobilização a pH 10, uma vez que nessas condições é que já poderão reagir com os aldeídos do suporte e seguir o processo até ao final, como se representa na Figura 10.

O segundo suporte mais utilizado na imobilização covalente multipontual de enzimas é ativado com grupos epóxidos (Sepabeads), tal como no caso dos suportes ativados com grupo glioxil (grupos aldeídos). O suporte com grupos epóxidos (Sepabeads) tem a vantagem de poder ser armazenado por longos períodos de tempo. Além disso, ele é muito estável e pode reagir com muitos grupos diferentes presentes na superfície das enzimas. A grande dificuldade deste é que, em pH 7,0 e baixa força iônica (tampão 5-50 mM), ele não é capaz igualmente de reagir, pela mesma natureza do grupo epóxido. Para que o processo de imobilização comece e ocorra, é necessário que haja uma primeira adsorção física da enzima sobre o suporte, e logo o processo seguinte. Assim, para provocar essa adsorção física, mais por hidrofobicidade, é necessário realizar a reação com tampão a 1,0 M. Nessas condições a enzima se absorveria hidrofobicamente e, uma vez que isso ocorra, se incubaria durante a noite com pH 10, dando lugar ao processo de interação intermolecular entre todos os grupamentos do suporte e os da enzima. Representa-se o processo na Figura 11.

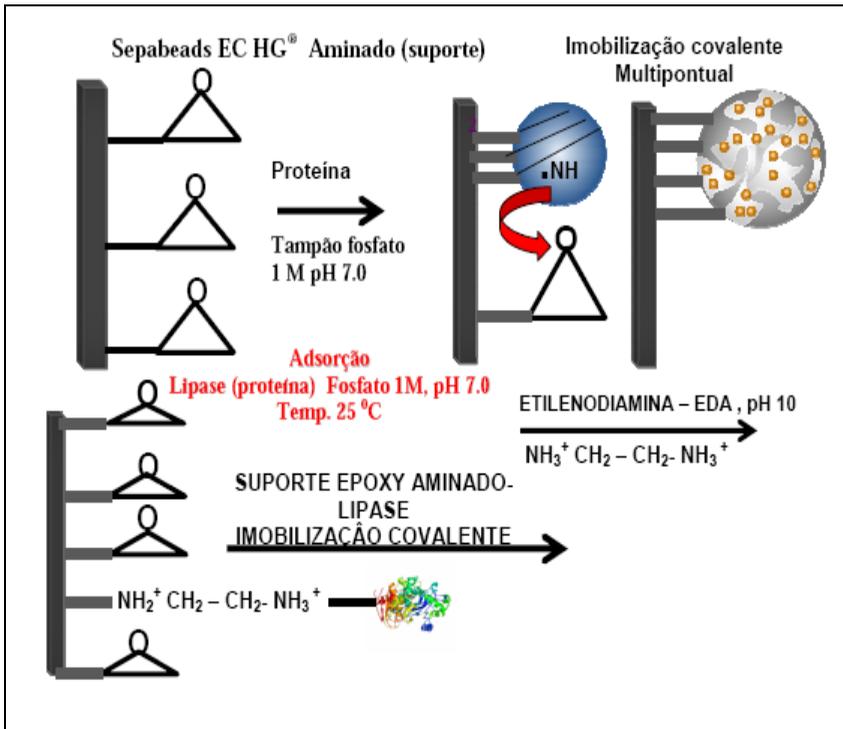
Figura 11 – Esquema da imobilização de enzimas em suporte ativado com grupos epóxidos



Fonte: Elaborada pelo autor (2016).

Mesmo sendo os dois grupos funcionais os melhores (epóxidos e glioxis) para se realizar o processo de imobilização covalente multipontual, eles apresentam duas grandes limitações: as reações não ocorrem a pH 7 (glioxil) e devem ocorrer à alta força iônica (epóxido) (BARBOSA et al., 2015). Assim sendo, uma das grandes possibilidades para ultrapassar esse inconveniente é a preparação de suportes bifuncionais, nos quais se introduz um pequeno grupo na superfície do suporte. Que em uma primeira etapa, promove a adsorção da enzima em condições muito suaves de reação (pH 7 e baixa força iônica, 5-25 mM). Em uma segunda etapa, incuba-se, então subindo o pH a 10 para promover a interação intermolecular entre os grupos amino da enzima e os grupos epóxidos e/ou aldeídos do suporte. Ilustram-se as representações desses suportes na Figura 12.

Figura 12 – Esquema da imobilização covalente com grupos epóxidos (Sepabeads EC)



Fonte: Elaborada pelo autor (2016).

## 2.6 O ESTADO DA ARTE DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Diversos trabalhos destacaram a importância dos processos de imobilização de enzimas e mostraram a sua grande utilização em processos industriais. Nesta seção citam-se alguns trabalhos recentes de autores que abordam diversos tipos de imobilizações e destacam algumas enzimas de grande importância em biocatálise para uso industrial. A Tabela 2 ilustra alguns dados obtidos por outros autores relacionados a diferentes procedimentos de imobilização.

Diante do exposto dos trabalhos relatados na literatura de inúmeros suportes e enzimas imobilizadas para diversas finalidades, demonstrou-se a importância na imobilização dessas enzimas e suas aplicações industriais para importantes produtos de alto valor agregado. Há a necessidade de pesquisar mais os processos de imobilização de enzimas em suportes sólidos, os quais devem ter uma grande área superficial e uma grande resistência mecânica, pois serão utilizados em biorreatores em processos industriais. Por isso estudam-se no presente trabalho os suportes sólidos hidrofóbicos, resinas iônicas e resinas com grupos epóxidos com ativação desses grupos por ligações covalentes multipontuais, que são mais estáveis termicamente a solventes de caráter polares e apolares em reações em meio orgânico.

Tabela 2 – Resumo das principais considerações sobre imobilização enzimática

Enzima utilizada	Origem da enzima	Suporte para imobilização	Comentários	Referência
$\beta$ -Glicosidase	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Glixil Sepharose	O processo de imobilização da enzima foi eficiente. Houve 82% de retenção da atividade. Este método permitiu a imobilização de 9000 UI de enzima g <sup>-1</sup> de suporte.	Bernal et al. (2013)
$\beta$ -xilosidase	<i>Aspergillus niger</i> USP -67	DEAE-Sepharose Polietilenoimina (PEI)-Sepharose Q-Sepharose, CM-Sepharose, Sulphopropil-Sepharose MANAE-agarose	O melhor resultado foi obtido com a PEI-Sepharose, que apresentou 94% de rendimento de imobilização.	Benassi et al. (2013)
Lipase (agregado monomolecular e bimolecular da enzima)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Glixil	Os derivados de biomoléculas foram mais ativos, mais seletivos e mais estáveis tanto em água como em solventes orgânicos do que os monomoleculares. O derivado bimolecular obteve duas vezes mais atividade e uma seletividade mais alta para a hidrólise.	Nunes et al. (2013)
$\beta$ -galactosidase	<i>Bacillus circulans</i>	glixilamida agarose amino-, carboxi e quelato de agarose-glixilamida	A glixilamida agarose teve o maior rendimento de imobilização e estabilidade. As condições ótimas de imobilização nestes suportes foram: 28,9 mg g <sup>-1</sup> e 36,4 h de contato, resultando em um biocatalisador com 595 UI g <sup>-1</sup> , e uma meia-vida de 89 vezes maior do que as enzimas solúveis.	Urrutia et al. (2013)

Lipase microbiana e lipase comercial TL-IM	<i>Thermomyces lamuginosus</i> (TLL)	Esferas de estireno-divinilbenzeno	A TLL obteve uma carga enzimática imobilizada duas vezes mais elevada que a TL-IM, mas com uma atividade três vezes mais elevada.	Martins et al. (2013)
Lipase	<i>Candida cylindracea</i>	Glioxilamida Agarose	De acordo com tempo de meia-vida, o derivado mais termooestável foi glioxilamida-CCL imobilizada em agarose. Esses derivados tiveram altos rendimentos de hidrólise com óleo de peixe.	Pizarro et al. (2012)
Lipase	<i>Rhizomucor miehei</i> <i>Geobacillus thermocatenulatus</i> <i>Thermomyces lamuginosus</i>	Sepharose-Q	A RML imobilizada em Sepharose-Q, mostrou mais elevada atividade e especificidade. O produto monogliceril-fenilmalonato foi sintetizado em 82% de rendimento total.	Acosta et al. (2011)
Lipase	<i>Candida antarctica</i> B (CALB) Novozym 435 (CALB-435) (CALB - MCI)	CALB imobilizada em esferas de estireno-divinilbenzeno (CALB - MCI)	Para CALB -435, as melhores para formação de ésteres são: 5:6:1 razão molar metanol : óleo, 25% de enzima, e 5,44% de água adicionada.	Poppe et al. (2013)
Endoxilanas	<i>Sireptomycetes halstedii</i>	Suportes de glioxilagarose	A atividade e a estabilidade da enzima imobilizada foi maior a pH 5,0 do que pH 7,0. A temperatura ótima para a hidrólise de xilano foi 10 °C mais elevada para o derivado estabilizado do que para o derivado não estabilizado. Por outro lado, a maior capacidade de carga foi de 10% em géis ativadas de agarose, que foi 75 mg de enzima por ml de suporte. Cerca de 80% dos açúcares redutores foram liberados após 3 h a 55 °C.	Aragon et al. (2013)

Lipase	<i>Candida antarctica</i> B (CALB )	Técnica de CLEA	<p>As melhores condições para a preparação de CALB-BSA-CLEA foram: concentração de proteína (3 mg mL<sup>-1</sup>), Álcool terc-butílico como agente precipitante. A precipitação foi durante 60 minutos, e a concentração do precipitante foi de 50 % v / v e com concentração glutaraldeído de 1,5% m / v.</p>	Cruz et al. (2012)
Penicilina G acilase (PGA )	Sepharose de brometo de cianogênio (CNBrSep-PGA) e imobilizado por ligação unipontual covalente e com a glioxil agarose		<p>Os biocatalisadores foram inativados em 70 % (v / v) de dióxano a 5 ° C até 25 % de atividade residual. Os biocatalisadores foram então recuperados por filtração, para remover o meio de inativação e reincubadas em meio aquoso, para promover a reativação. O nível mais elevado de reativação (73 % de recuperação da atividade no que diz respeito à atividade inicial antes da inativação) foi obtido com GX<sub>1</sub>-PGA, correspondente ao biocatalisador com fortes interações multipontuais. Para GX<sub>2</sub>-PGA e CNBrSep-PGA, apenas 33 % e 31 % da atividade foi recuperada, respectivamente.</p>	Romero et al. (2012)
Lipase	<i>Candida antarctica</i> B (CALB)	Eupergit C ou octil Sepharose	<p>Estudou-se a modificação dos grupos imobilizados de amino nativos da CALB, que não produziram uma alteração significativa na enzima CALB. No entanto, se a enzima foi previamente aaminada, cerca de 10-15 moléculas de PEG puderam ser introduzidas por molécula de enzima. Além disso, verificou-se que os grupos succinílicos, que são muito mais reativos do que o ácido acético, foram estudadas como a estratégia seguinte no trabalho.</p>	Ruiz et al. (2013)

Álcool desidrogenase (ADH)	fermento de pão	ligação unipontual de agarose ativada com brometo de cianogênio ou adsorção iônica de agarose ativada	Observou-se que os polímeros poli cationicos (polietilenoimina) reticulam a estrutura quaternária com efeito desprezível na atividade catalítica. A estabilidade aumentou 500 vezes para este derivado.	Bolívar et al. (2012)
Tirosinase		glutaraldeído reticulado (ligação covalente cruzada) em quitosana com grânulos de argila	Os rendimentos (%) de imobilização foram respectivamente: 67%, 25% e 1400 U g <sup>-1</sup> de biocatalisador. O pH ótimo de imobilização foi de 7,0, a temperatura ideal da enzima livre e imobilizada foi de 25-30 °C e 25°C respectivamente.	Dinçer, Becerik e Aydemir (2012)
β-galactosidase e lipase	Suporte 1: magnetita e quitosana Suporte 2: óxido de ferro e quitosana ativadas com glutaraldeído		Durante o estudo, as micropartículas imobilizadas com lipase e galactosidase mostraram-se praticamente estáveis em ambos os tipos de micropartículas magnéticas de quitosana e com valor de retenção de 100% de atividade enzimática inicial durante oito ciclos. A lipase e lactase preparadas em quitosana com micropartículas de magnetita tiveram retenção de mais de 90% de atividade enzimática durante o mesmo período de tempo por 28 dias.	Pospiskova e Safarik (2013)
Lipase	<i>Candida antarctica B</i>	esferas de quitosana e quitosana/alginato	O produto da reação foi analisado por FT-IR e confirmou a reação desses agentes de ativação com os suportes. Os melhores resultados de imobilização foram: 422, 44 ± 50,4 e quitosana / alginato 378,30 ± 50,4 U g <sup>-1</sup> de esferas quitosana e quitosana/ alginato respectivamente.	Silva et al. (2012)

Quitinase	<i>Streptomyces griseus</i>	covalente unipontual com agente reticulante glutaraldeído nas concentrações de GA : 1, 2, 3, 4, 5, e 10%	A atividade do sobrenadante foi de 2,68 U mL <sup>-1</sup> e a enzima imobilizada com GA com 10% apresentou o maior nível de atividade enzimática nas esferas de quitosana.	Seo et al., 2012
β- galactosidase	<i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y1564	quitosana com agente reticulante glutaraldeído	O pH ótimo da β-gal solúvel foi de pH 6,5 e para a enzima imobilizada foi de pH 7,0. As temperaturas ótimas foram de 50 °C e 37 °C. A 50 °C a enzima imobilizada mostrou-se uma maior estabilidade térmica, sendo oito vezes mais estável que a enzima solúvel. A enzima imobilizada foi utilizada por 10 ciclos e manteve-se estável em 70% de sua atividade inicial.	Lima et al. (2013)

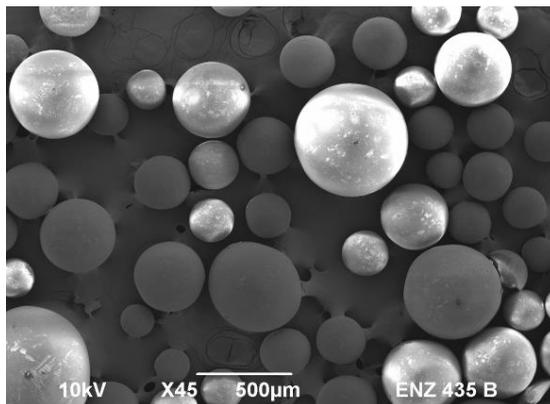
Fonte: Elaborada pelo autor (2016).

## 2.7 PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR CATÁLISE ENZIMÁTICA E POR CÉLULAS IMOBILIZADAS

Na busca de novas rotas para a obtenção de biodiesel, encontram-se vários trabalhos na literatura que utilizam a catálise enzimática com lipases imobilizadas por via etífica. E também, pelo uso de células imobilizadas de fungos produtores de lipases. Os autores mencionados abaixo, mostram ser uma rota mais limpa, porém, com algumas desvantagens quando comparada à catálise inorgânica. A transesterificação enzimática utilizando lipases imobilizadas ou células imobilizadas inteiras está cada vez mais atraente, pois o glicerol produzido como subproduto pode ser facilmente separado e recuperado para outros fins, e o processo de purificação dos ésteres é mais simples. A utilização de enzimas imobilizadas confere vantagens importantes como a capacidade de reuso do biocatalisador e a capacidade de executar processos contínuos. Publicaram-se vários estudos sobre este tema (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; SHIMADA et al., 2002; SHAH et al., 2003). Foram descritos uma variedade de métodos para a imobilização de lipases em suportes sólidos (ADLERCREUTZ; BARROS; WEHTJE, 1996; PEDERSEN; CHRISTENSEN, 2000) cuja leitura dos resultados indica que os melhores métodos são aqueles baseados no aprisionamento da enzima em matrizes hidrofóbicas sol-gel (REETZ, 1997) ou na sua absorção na matriz hidrofóbica, tal como o polipropileno (SALIS et al., 2003b).

As lipases comercialmente disponíveis são vendidas tanto como pó liofilizado quanto nas formas líquida e imobilizada e também contêm outros componentes (estabilizantes, conservantes, etc.). A lipase mais utilizada para a produção de biodiesel é a de *Candida antarctica* B, imobilizada por adsorção em resina Lewatit VP OC 1600 (NELSON; FOGLIA; MARMER, 1996; SHIMADA et al., 1999; SAMUKAWA et al., 2000 ; WATANABE et al., 2000; WATANABE et al., 2001; CHEN ; WU, 2003; OLIVEIRA et al., 2004; DU et al., 2004b, TUTER et al., 2004; CHANG et al., 2005; LAI et al., 2005). Essa enzima é produzida principalmente pela Novozymes®, sob o nome comercial de Novozym 435, e fornecida sob forma imobilizada sobre uma resina acrílica, Lewatit VOP 1600 (Resindion) (Figura 13).

Figura 13 – Microscopia eletrônica de varredura de enzima imobilizada em resina acrílica (Lewatit VOP 1600) imobilizada com lipase de *Candida antarctica* B (Novozym 435)



Fonte: Imagem obtida pelo autor (2016).

A lipase comercial de *Mucor miehei* (Lipozyme IM60), imobilizada em uma resina aniônica trocadora aniônica macroporosa também foi amplamente utilizada para a produção de biodiesel (MITTELBACH, 1990; NELSON; FOGLIA; MARMER, 1996; SELMI; THOMAS, 1998; DOSSAT et al., 1999; SHIEH; LIAO; LEE, 2003; OLIVEIRA et al., 2004; POPPE et al., 2013; ARAÚJO et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2014; CHRISTOPHER et al., 2014), e possui resultados de rendimentos em reações para obtenção de biodiesel mais baixos, comparados com a enzima comercial Novozym 435 de lipase de *Candida antarctica* B.

Embora as preparações comerciais possam ser encontradas para aplicação imediata, o desenvolvimento de novos suportes para o tratamento dessas enzimas é de grande interesse para o avanço tecnológico da área e da competitividade dos processos enzimáticos de produção de biodiesel.

A lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em caulinita porosa (Toyonite 200-M) obteve altas conversões de ésteres de oleato de propila e oleato de butila comparadas às obtidas de lipases de *Pseudomonas cepacia*, *Mucor javanicus*, *Candida rugosa* e *Rhizopus niveus*. A lipase de *Pseudomonas cepacia* (PS-30) imobilizada em filossilicato em uma matriz sol-gel foi mais ativa do que a *Candida antarctica* e *Thermomyces lanuginosa* em sílica granulada. Avaliou-se que a maior produção de éster por *Pseudomonas cepacia* (PS-30) pode

ter sido por causa do aprisionamento da lipase em argila em matriz sol-gel e a sua proteção da inativação por metanol.

As preparações de lipases granuladas não protegem da inativação pelos solventes polares (metanol e /ou etanol), uma vez que são absorvidas pelo suporte (HSU et al., 2002). Utilizaram-se as lipases de *Thermomyces lanuginosa* e *Pseudomonas cepacia* imobilizadas em uma matriz de sol-gel de filossilicato para catalisar diferentes gorduras, obtendo-se ésteres com rendimentos próximos a 80-90%; essas gorduras contêm uma variedade de ácidos graxos livres de 2,6 a 36% (HSU et al., 2004b).

Utilizou-se a lipase de pâncreas de porco imobilizada em uma resina trocadora de ânions macroporosa para a etanolise de óleo de girassol em um sistema livre de solvente. Obteve-se uma alta conversão de ésteres para uma razão molar álcool: óleo de 3:1, 45 °C, 0% de água e 10% em peso de lipase, baseando-se na massa do substrato (YESILOGLU, 2004).

A imobilização de células de micro-organismos produtores de lipases também é uma interessante alternativa e uma forma indireta de imobilização da enzima. Da mesma forma que o conceito de imobilização enzimática, a imobilização de células também consiste no encerramento da célula dentro ou na superfície do agente imobilizador. O uso de processo contínuo, o aumento da estabilidade e o reaproveitamento do material biológico são considerados como as principais vantagens propiciadas pela imobilização de células (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

Várias lipases oriundas de micro-organismos (fungos) estão sendo reportadas na literatura e seu emprego tem se destacado, como o das lipases de *Candida antarctica* B (CALB), *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Rhizomucor miehei* (RML). Essas enzimas, na forma imobilizada, têm se destacado para o uso em reações de transesterificação de óleos e gorduras e, mais recentemente, na alcoólise de óleos vegetais na produção de biodiesel. Inúmeros trabalhos relatam o uso de lipases imobilizadas em variados suportes, como resinas, polímeros e minerais para diversas finalidades industriais; por isso há necessidade de se pesquisar mais sobre esses biocatalisadores e estudar o seu comportamento em meio de reações que envolvam solventes orgânicos e a termoestabilidade, para conhecer seu comportamento e sua eficiência nessas reações.

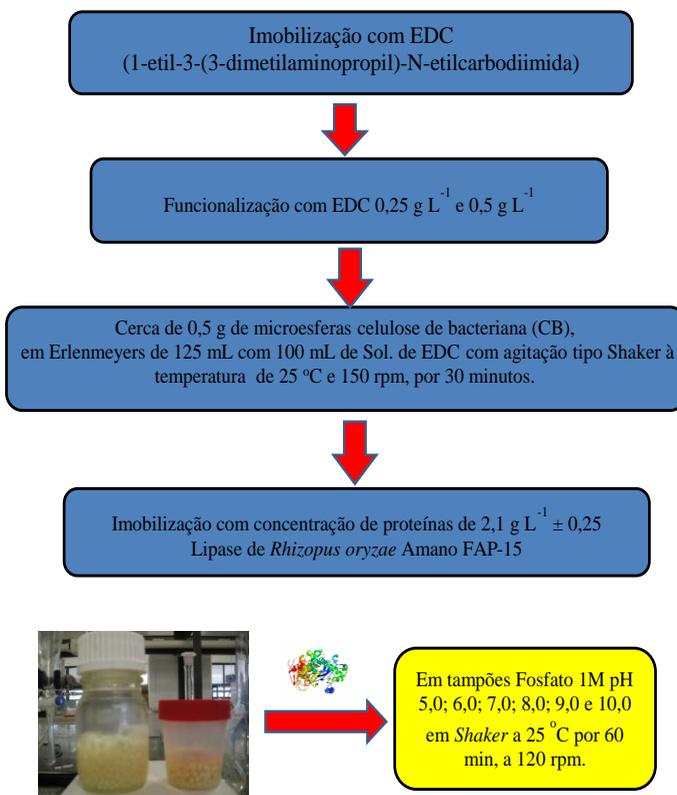
Em face do conhecimento das potencialidades que essas enzimas nos oferecem, escolheram-se três lipases, *Candida antarctica* B (CALB), *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Rhizomucor miehei*

(RML), para investigar sua imobilização em diversos suportes sólidos. Esses suportes têm características muito distintas, como natureza hidrofóbica, iônica e polimérica. Estudaram-se diversas maneiras de imobilização nesses suportes, de acordo com sua natureza física e química. Imobilizaram-se de maneira física (adsorção) e covalente com reagentes entrecruzantes (*crosslinked*) e de maneira covalente multipontual.

Esta pesquisa teve a finalidade de aplicação desses derivados (biocatalisadores) na produção de biodiesel, utilizando óleo vegetal de girassol na presença de solvente ciclohexano (caráter apolar) em reação de etanólise.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PROTOCOLO DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LIPASE DE *RHIZOPUS ORYZAE* AMANO FAP-15 EM MICROESFERAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA



#### 3.2 PROTOCOLOS DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM SUPORTES SÓLIDOS

Para o processo de purificação da enzima, utilizaram 2,0 g de suporte Octilagarose, solubilizados em 19 mL de solução tampão fosfato 25 mM pH 7,0 com 1,0 mL de enzima lipase (Palatase, CalB ou TLL), em frasco de polietileno de 50 mL. Foi ajustado o pH para 7,0 e

deixando por uma hora sob agitação mecânica. Então, foi retirado uma amostra de 100µl da suspensão particulada com o suporte e o mesmo volume da solução filtrada, para análise de atividade enzimática por meio do método de PNPB (*vide seção 3.12*).

### 3.3 PURIFICAÇÃO DA ENZIMA LIPOLASE® (NOVOZYMES) COM SURFACTANTE HEXADECILTRIMETILAMÔNIO (CTAB)

Purificou a enzima Lipolase® de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) na quantidade de 2,0 de Octilsephararose por adsorção interfacial em suporte hidrofóbico antes de sua utilização. A enzima foi adsorvida em esferas de Octil-Sepharose, sob agitação magnética contínua, em solução de tampão fosfato de sódio 10 mM a pH 7,0. Mediu-se periodicamente a atividade enzimática da suspensão e do sobrenadante pelo método de PNPB (p-nitrofenil butirato). Dessorveu-se a enzima TLL da Octil-Sepharose por incubação em uma solução de 0,6 % v/v de CTAB, em fosfato de sódio 25 mM à pH 7,0 durante 1 hora e 30 minutos. Após a dessorção, filtrou-se a enzima com vácuo através de funil de vidro sinterizado e a lavou-se com água destilada. Mediram-se as atividades enzimáticas do sobrenadante e da solução em espectrofotômetro a 348 nm, pelo método de PNPB, após reajuste da concentração da solução de CTAB para 0,6 %, sob agitação magnética em cubeta, à temperatura de 25 °C (*vide seção 3.12*).

Para esse procedimento de purificação com surfactante Triton X-100, com as lipases (CALB, RML e TLL), utilizaram-se 20 mL de solução de surfactante Triton X-100 em 10 mM, em tampão fosfato pH 7,0. Corrigiu-se o pH para 7,0 e adicionou-se em frasco de plástico de 50 mL, deixando-a sob agitação mecânica por 1 hora e 30 minutos. Decorrido esse período, filtrou-se essa solução em kitassato com filtro sinterizado a vácuo, e recolheu-se o filtrado para a medida de atividade enzimática. Retiraram-se 200 µL da solução enzimática e também 200 µL do filtrado para a medida de atividade enzimática, obtendo-se um valor de atividade enzimática igual ao valor de absorbância do filtrado e da solução. É possível dizer que toda proteína (lipase) foi recuperada ou dessorvida.

### 3.4 IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES CALB (*CANDIDA ANTARCTICA* B), RML (*RHIZOMUCOR MIEHEI*) E TLL (*THERMOMYCES LANUGINOSUS*) EM OCTILAGAROSE 4BCE

Para imobilização dessas lipases, utilizou-se o produto comercial Octilagarose 4BCe da empresa Resindion (Itália). É importante ressaltar que se utiliza frequentemente o suporte em questão para os processos de imobilização enzimática e também para a purificação de caldos brutos, uma vez que as moléculas de enzimas podem ser adsorvidas ionicamente a esse suporte.

Em um frasco de plástico de polietileno de 50 mL com 2,0 g de suporte octilagarose 4 BCe, adicionou-se 1,0 mL de enzima lipase em 20 mL de tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 (equivalente a 10 mg de proteína para 20 mL de tampão). Retirou-se uma amostra de 100 µL para servir de branco de leitura. Deixou-se o frasco sob agitação mecânica durante 1 hora e 30 minutos e, decorrido esse tempo de contato da enzima com o suporte, realizou-se a medida da atividade enzimática retirando-se uma amostra de 100 µL sob agitação mecânica. Da mesma forma, retirou-se uma amostra do sobrenadante com o auxílio de uma ponteira de 1.000 µL cortada e munida de um pequeno filtro sinterizado. Em seguida mediu-se a atividade enzimática do branco e sobrenadante em espectrofotômetro a 348 nm em solução de p-nitrofenilbutirato (PNPB), sob agitação magnética em cubeta, à temperatura de 25 °C (*vide seção 3.12*).

### 3.5 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM SEPHAROSE Q *BIG BEADS* (LIGAÇÃO IÔNICA)

Realizou-se o mesmo procedimento descrito na seção anterior, com a única variante de que se usou aqui o suporte Sepharose Q. Imobilizaram-se 2,0 gramas de Sepharose Q (suporte iônico), lavadas em filtro sinterizado com auxílio de um kitassato a vácuo, e em seguida com tampão fosfato 10 mM à pH 7,0. Recuperou-se a Sepharose Q lavada e adicionou-se em um frasco de plástico com 20 mL de solução de enzima Palatase® RML (Novozymes®), e deixou-se por 1 hora sob agitação mecânica, retirando-se 200 µL da solução de enzima RML (Palatase®) para medida do branco. Decorrido o tempo de 1 hora, retirou-se uma amostra da solução e da suspensão e mediu-se a atividade enzimática com solução de PNPB 50 mM (p-nitrofenilbutirato), segundo o procedimento (*vide seção 3.12*).

### 3.6 IMOBILIZAÇÃO COM BROMETO DE CIANOGENÍO (BRCN) COM LIPASE DE (CALB, RML E TLL) POR IMOBILIZAÇÃO COVALENTE UNIPONTUAL

Em um frasco de plástico de polietileno de 50 mL, solubilizaram-se 800 mg de BrCN agarose em 50 mL de água destilada, e ajustou-se o pH para 2,5, com HCl diluído, sob agitação magnética. Realizou-se a solubilização submetendo a solução à agitação mecânica por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, adicionaram-se 2,39 g de BrCN agarose e 20 mL de solução enzimática de lipase, mantendo-se, em seguida, a solução em banho de gelo a 4 °C sob agitação mecânica por 20 minutos. Retiraram-se então 200 µL da suspensão com a ponteira cortada, com um pequeno filtro sinterizado, para amostra de branco, e também da solução enzimática. Realizou-se a medida de atividade enzimática segundo o procedimento (*vide seção 3.12*).

### 3.7 AMINAÇÃO DE LIPASES PARA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO SOBRE GLIOXILAGAROSE

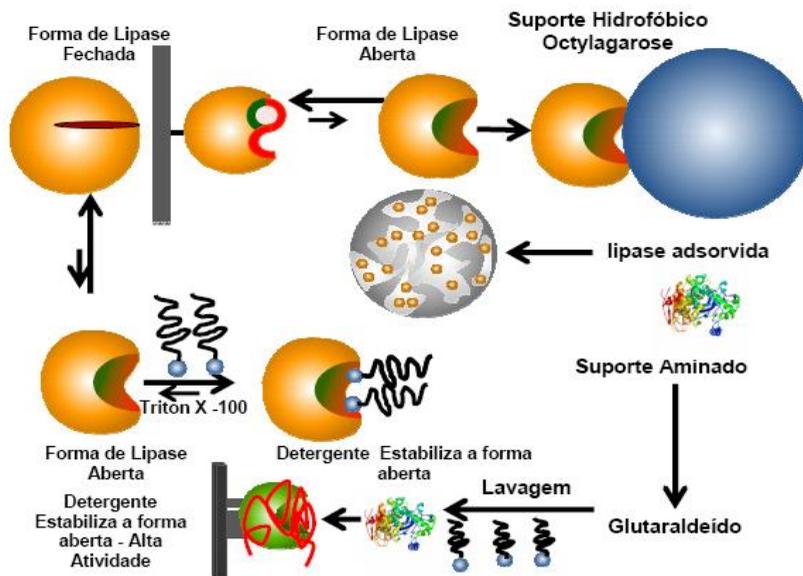
Para a imobilização, utilizou-se 1,0 g de suporte de glioxilagarose com 5 mg de proteína (CALB, RML e TLL) e adicionaram-se 20 ml de tampão de bicarbonato de sódio a 100 mM (pH 10,1). Retirou-se uma amostra da solução de proteína para o branco. Deixou-se sob agitação por 1 hora. Mediu-se a atividade enzimática em espectrofotômetro a 348 nm, segundo o procedimento descrito na seção 3.13.

Adicionaram-se 20 mg de NaBH<sub>4</sub> (1 mg·mL<sup>-1</sup> de solução) ao derivado imobilizado, deixando sob agitação mecânica suave por 30 minutos em um béquer plástico de 20 mL, que permaneceu aberto, já que durante a redução forma-se o gás hidrogênio (H<sub>2</sub>). Filtrou-se o derivado e lavou-se com água destilada; em seguida mediu-se a atividade enzimática em espectrofotômetro a 348 nm (100 mg de derivado em 500 µL de tampão fosfato a 25 mM a pH 7,0).

Para otimizar o processo de imobilização covalente multipontual, foi aminado com grupos amino (EDA), quimicamente as enzimas, aumentando dessa forma o número de grupamentos amino e, conseqüentemente, a capacidade de interação entre a enzima e os grupos glioxis na superfície do suporte. Adicionaram-se 20 mL de solução de EDA (Etilenodiamina) ao béquer plástico de 20 mL, preparado anteriormente, com 20 mL de solução de EDA (Etilenodiamina P.A), pH 4,75 sob agitação magnética e, em seguida, 42,17 mg de EDC

(Carboxietilenodiimina), corrigindo para pH 4,75. Deixou-se esse mesmo béquer plástico de 20 mL sob agita o mecânica por 1 hora e 30 minutos e, em seguida, filtrou-se e lavou-se com água destilada abundantemente a amostra. Esse processo está ilustrado na Figura 14.

Figura 14 – Processo de imobiliza o com Octilagarose



Fonte: Elaborada pelo autor (2016).

### 3.7.1 Prepar o de soluço de Hexametilenodiamina (EDA)

Preparou-se 1 litro de soluço de EDA 1,0 M pH 4,75. Para isso, diluiu-se em 600 mL de H<sub>2</sub>O destilada com 67 mL de EDA 2,0 M. Com a ajuda de um funil de adi o, adicionaram-se lentamente 160 mL de HCl concentrado. Preparou-se a soluço em um becker de 2 litros em banho de gelo em capela sob exaustão química, pois essa re o   muito exotérmica.

### 3.7.2 Preparo do suporte glicerilagarose

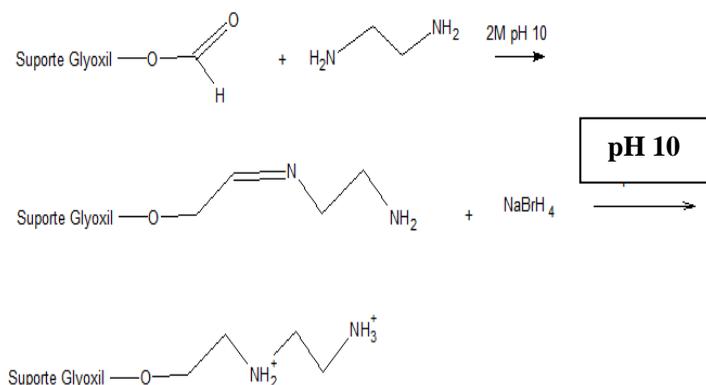
Para o preparo deste suporte, adicionaram-se 50 mL de água destilada, 50 mL de NaOH 1,7 M e 1,4 g de borohidreto de sódio, em um béquer de 5 litros, mantido em banho de gelo, com 109 g de Agarose

4BC. Realizou-se esse procedimento em capela sob exaustão. Lentamente adicionaram-se 36 mL de glicidol (2,2-epoxipropanol), para evitar o aumento de temperatura, e a reação foi mantida entre 12 à 16 horas sob agitação. Após esse período, lavou-se a glicerilagarose preparada abundantemente com água destilada, em funil sinterizado, com auxílio de kitassato a vácuo. Formou-se um gel e a ele adicionaram-se 20 mL de uma solução de periodato de sódio 0,1 M. Manteve-se o gel sob agitação por 1 hora e 30 minutos e finalmente lavou-se abundantemente com água destilada. Guardou-se o suporte obtido de glicerilagarose oxidado em pote de plástico em geladeira à temperatura de 4 °C para posterior utilização. Esse procedimento resultou na oxidação dos grupos hidroxilas (-OH) do suporte.

### **3.7.3 Preparo do suporte manae-agarose (Mono-Amino-n-Amino-Etil)**

Para a preparação desse suporte, adicionaram-se 15 g de glioxilagarose previamente preparada, conforme seção 3.7.1 em béquer de 5 litros, com 84 mL de etilenodiamina 2 M a pH 10, recentemente preparada. Deixou-se a solução por duas horas sob agitação mecânica à temperatura ambiente. Decorrido esse período de tempo, adicionou-se borohidreto de sódio ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) com a finalidade de reduzir as ligações do tipo base de Schiff estabelecidas entre o amino da EDA e o grupo aldeído do suporte. Essa reação ocorreu durante um tempo mínimo de duas horas, após o qual lavou-se o suporte abundantemente com água destilada e guardou-se em frasco plástico à temperatura de 4 °C para posterior utilização. A reação de obtenção do suporte MANAE é mostrada pela Figura 15.

Figura 15 – Processo de obtenção do suporte MANAE-agarose



Fonte: Elaborada pelo autor (2016).

### 3.7.4 Imobilização das lipases RML, CALB e TLL em MANAE com glutaraldeído 0,5%

Para esta imobilização utilizaram-se 2,0 g do suporte MANAE, adicionados em um frasco plástico de polietileno com 50 mL de capacidade, contendo 15 mL de solução enzimática de lipase (2,0 mg de proteína por grama de suporte), em tampão fosfato 10 mM a pH 7,0, tendo o pH sido novamente ajustado para pH 7,0. Retirou-se uma amostra de proteína para análise de atividade enzimática como branco. Adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de glutaraldeído 25 % v/v, deixando por 1 hora sob agitação mecânica. Ao final de 1 hora de agitação, filtrou-se a vácuo o derivado e o lavou-se exaustivamente com água destilada, para a retirada de excesso de glutaraldeído. Retiraram-se 100 mg de derivado, que foram adicionados a um eppendorf de 2,5 mL contendo 500  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 25 mM a pH 7,0. Mediu-se a atividade enzimática espectrofotômetro a 348 nm pelo método do PNPB (*vide seção 3.12*).

### 3.7.5 Imobilização de MANAE com Glutaraldeído 25% V/V em enzimas RML, CALB e TLL

Realizou-se o mesmo procedimento adotado anteriormente, com a única diferença de que utilizou-se uma concentração de 25 % v/v de glutaraldeído no ensaio, com o objetivo de determinar o efeito da concentração de glutaraldeído no processo de imobilização e estabilização das lipases estudadas.

### **3.7.6 Imobilização por adsorção iônica de lipases (RML, CALB e TLL) ao suporte Duolite 568**

Utilizaram-se 2,0 g de suporte Duolite A 568, adicionados a um frasco plástico de polietileno com 50 mL de capacidade, foram adicionados de 50 mL de uma solução enzimática de cada uma das lipases em estudo (CALB, TLL e RML), diluídos em 100 mL tampão fosfato 10 mM a pH 7,0 e deixados sob agitação mecânica por uma noite. Retirou-se uma amostra de 200  $\mu$ L e a colocou em Eppendorf de 2,5 mL como branco, para posterior medida da atividade enzimática com procedimento idêntico ao descrito na seção 3.12.

### **3.7.7 Imobilização das lipases RML, CALB E TLL por adsorção hidrofóbica ao suporte Lewatit VP OC 1600**

Em um frasco plástico de polietileno de 50 mL de capacidade, adicionaram-se 2,0 gramas de suporte Lewatit VP OC 1600, em 30 mL de tampão fosfato 10 mM a pH 7, ao qual adicionou-se 1,0 mL de enzima lipase, corrigindo-se o pH para 7,0. Retiraram-se 200  $\mu$ L de amostra dessa solução (branco) para análise de atividade enzimática. Manteve-se a suspensão por 1 hora e 30 minutos sob agitação mecânica. Após esse período, realizou-se a análise de atividade enzimática da amostra de branco e da solução, segundo o procedimento (*vide seção 3.12*).

### **3.7.8 Imobilização covalente em suportes ativados com grupos glioxis em suporte Sepabeads EC**

A imobilização covalente utilizando o suporte Sepabeads EC teve como objetivo testar o efeito do processo de imobilização e posterior caracterização bioquímica desses derivados e compará-los com os suportes glioxilagarose. Adicionaram-se 4,0 g de Sepabeads EC em béquer plástico de 100 mL, com 1,0 mL de lipase em 50 mL de tampão fosfato 10 mM a pH 7,0, corrigiu-se para pH 7,0, sendo deixado sob agitação mecânica por uma noite, e retirando-se uma amostra de 200  $\mu$ L em Eppendorf para análise do branco. Em intervalos de tempo, retiraram-se alíquotas do sobrenadante e da suspensão para análise de atividade enzimática. Uma vez imobilizada toda a enzima, reduziu-se o derivado com borohidreto de sódio ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) à temperatura de 4 °C durante 15 minutos.

Objetivou-se a imobilização covalente multipontual em

Sepabeads EC HG com as enzimas lipases (RML, CALB e TLL), com a oxidação do suporte Sepabeads EC dos grupos aldeídos para grupos glioxis, com o auxílio de periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) 1000  $\mu\text{M}$ . Em seguida, reduziram-se esses grupos utilizando-se um redutor forte de borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ).

Adicionaram-se 4,0 g de suporte Sepabeads EC HG a 40 mL de solução de periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) 1000  $\mu\text{M}$  contidos em um frasco plástico de polietileno de 100 mL, o qual foi deixado sob agitação mecânica por duas horas. Em seguida, lavou-se o suporte exaustivamente com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada com a ajuda de funil sinterizado em kitassato a vácuo. Retiraram-se amostras da solução de periodato e da solução final, isto é, após as duas horas de oxidação, das quais analisou-se a quantidade de grupos aldeídicos que foram oxidados pelo  $\text{NaIO}_4$  por espectrofotometria a 450 nm. A partir da constatação de que os grupos foram oxidados, passou-se para a fase seguinte.

Após a oxidação dos grupos aldeídos do suporte, este foi lavado exaustivamente com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada e, em seguida, preparou-se uma solução enzimática adicionando-se 1,0 mL de CALB a um frasco plástico de 50 mL, com 23 mL de tampão fosfato 10 mM, pH 7,0, sendo o pH então corrigido para pH 10,1 com NaOH diluído. Retirou-se uma amostra de 200  $\mu\text{L}$  que foi colocada em Eppendorf de 2,5 mL (branco). Deixou-se então o frasco sob agitação mecânica por uma noite, à temperatura ambiente.

Realizou-se a redução do derivado no dia seguinte pela adição à suspensão acima de 30 mg de borohidreto de sódio,  $\text{NaBH}_4$ , seguida de 30 minutos de incubação sob agitação mecânica, com velocidade reduzida e com o frasco aberto, por causa da liberação de gás hidrogênio ( $\text{H}_2$ ). Em seguida, lavou-se abundantemente o derivado reduzido com água destilada em sistema de filtração a vácuo. Recolheu-se o biocatalisador (derivado) em frasco plástico e retirou-se uma amostra de 0,006 g, que foi adicionada a um eppendorf com 2,5 mL de uma solução de tampão fosfato 25 mM a pH 7,0 e 20  $\mu\text{L}$  de solução PNPB 50 mM (p-nitrofenilbutirato), para análise de atividade enzimática hidrolítica pelo procedimento descrito na seção 3.12.

### 3.8 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES COM OS DERIVADOS PREPARADOS E UTILIZAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL EM BATELADA

Objetivou-se a imobilização de lipases de diferentes microorganismos, provenientes de fungos produtores de *Candida antarctica* B

(CALB), *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e de *Rhizomucor miehei* (RML) da empresa Novozymes®, em diferentes suportes comerciais como Duolite A 568, uma resina catiônica, Lewatit VP OC 1600 e Sepabeads EC HG, as duas últimas resinas hidrofóbicas.

Realizou-se a imobilização das enzimas por adsorção com os suportes (Duolite A 568 e Lewatit VP OC 1600) e imobilização por ligação covalente multipontual utilizando o suporte Sepabeads EC HG. Nessa etapa, teve-se como objetivo avaliar e comparar os dois processos de imobilização das enzimas estudadas (adsorção hidrofóbica e aminação química, para enriquecer as enzimas com grupamentos aminos e ver se esse efeito aumentava a interação entre a enzima e o suporte), para em seguida utilizá-las na síntese de biodiesel. Finalmente, também se objetivou avaliar a eficiência na reação de óleo de girassol, que foi escolhido por ter uma grande porcentagem de ácido linoleico, componente majoritário na sua composição (55-75%), o qual seria melhor para reação de transesterificação enzimática e identificação e quantificação pela técnica de CLAE (cromatografia líquida de alto desempenho). Realizou-se essa reação com etanol absoluto, utilizando-se como cossolvente o ciclohexano nas razões molares de 6:1 e 9:1. Ilustra-se esse experimento na Figura 16.

Figura 16 – Experimento de produção de ésteres etílicos (biodiesel) com diferentes derivados em presença de cossolvente apolar



Fonte: Imagem obtida pelo (2016).

Realizou-se a reação em sistema de batelada em frascos de vidro de 20 mL com 1,45 mL de óleo de girassol, 5,0 mL de ciclohexano, 10 mL de etanol absoluto e 0,1 g de derivado (enzima com suporte), incubados em *shaker* sob agitação orbital de 200 rpm, à temperatura de 45 °C. Realizou-se a reação de síntese por sete dias, e quantificaram-se

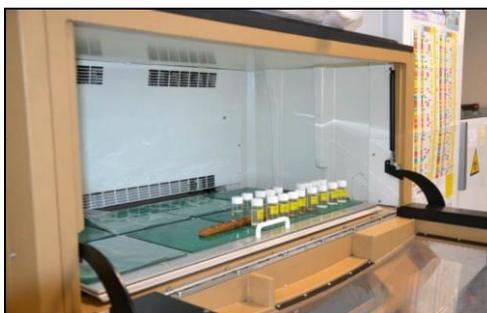
os ésteres por HPLC Spectra System P 4000, em coluna C18 RP 5  $\mu\text{m}$  de 150 x 4,6 mm, marca Phenomenex e detector UV 248 nm, com fase móvel de 95% de metanol e 5% de  $\text{H}_2\text{O}$  acidificado com ácido acético glacial 100% e fluxo 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ .

### 3.9 ESTUDO DA ESTABILIDADE DOS DERIVADOS DIANTE DE SOLVENTES ORGÂNICOS (POLARES E APOLARES)

O objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade dos derivados preparados perante solvente polar e apolar, através da análise da reação de ácido oleico na presença de ácido benzílico formando o éster oleato de benzila. Analisou-se o produto formado por essa reação por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

Realizaram-se estudos de estabilidade de nove derivados preparados de Sepabeads EC HG, Duolite A 568 e Lewatit 1600 VP OC 1600, com caldos enzimáticos de lipases de CALB (*Candida antarctica*), Palatase (RML) e Lipozyme TLL. Realizou-se a reação de estabilidade em frascos de vidro com capacidade de 5,0 ml, usando como solventes ciclohexano ou 2-metil-2-butanol à temperatura de 45  $^{\circ}\text{C}$ , com agitação de 200 rpm durante quatro dias, como ilustrado na Figura 17.

Figura 17 – Experimento de estabilidade dos derivados com solvente polar e apolar



Fonte: Imagem obtida pelo autor (2016).

### 3.10 PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS

Prepararam-se nove derivados de Sepabeads EC HG, Duolite A 568 e Lewatit VP OC 1600 com as lipases comerciais Palatase<sup>®</sup> (RML), CALB e Lipozyme<sup>®</sup> TLL da Novozymes<sup>®</sup>, com concentração de

proteínas de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  para cada derivado. Prepararam-se cerca de 5,0 g dos derivados (biocatalisador), que foram secos em estufa a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  e acondicionados em frascos plásticos de polietileno de 50 mL de capacidade providos de tampas, para posterior utilização no estudo de estabilidade. A preparação e a imobilização dos biocatalisadores foram descritas anteriormente (*vide seção 3.8*).

### 3.11 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA DOS DERIVADOS (CICLOHEXANO E 2-METIL-2-BUTANOL)

Adicionaram-se em nove frascos de vidro de 20 mL, com tampa, 10 mL de ciclohexano P.A e 1,42 mL de ácido oleico na forma de azeite de Oliva P.A, 1,0 mg de peneira molecular e  $103 \text{ }\mu\text{L}$  de álcool benzílico P.A. Deixou-se sob agitação orbital em um *shaker* a 120 rpm por 1 hora, à temperatura de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após esse tempo, retiraram-se  $20 \text{ }\mu\text{L}$  de amostra de cada frasco e adicionaram-se em Eppendorffs de 2,0 mL com 1,75 mL da solução da fase móvel do HPLC (95 % v/v de metanol grau HPLC com 5 % v/v de água destilada em ácido acético).

Homogeneizaram-se as amostras preparadas em banho de ultrassom por cinco minutos para posterior análise em CLAE. Após determinado o tempo zero ( $T_0$ ), adicionou-se 0,1 g das amostras dos derivados preparados anteriormente, com os derivados em frascos de vidro de 20 mL de capacidade, com álcool benzílico, ciclohexano, peneira molecular e ácido oleico.

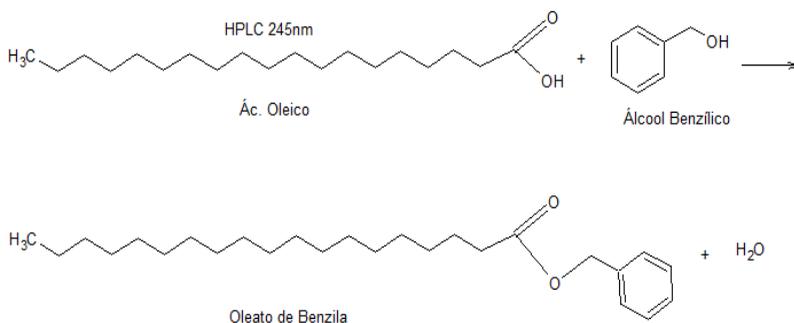
Após três horas de reação, retiraram-se amostras de  $20 \text{ }\mu\text{L}$  dos respectivos frascos e adicionaram-se a Eppendorffs de 2,0 mL de volume, com 1,75 mL da solução de fase móvel (95 % v/v de metanol grau HPLC com 5 %v/v de água destilada acidificada com ácido acético).

Quantificaram-se os ésteres por HPLC Spectra System P 4000 em uma coluna C18 RP,  $5 \text{ }\mu\text{m}$  de  $150 \times 4,6 \text{ mm}$ , marca Phenomenex e detector UV a 248 nm e, como fase móvel, uma solução de 95% de metanol e 5% de  $\text{H}_2\text{O}$  acidificada com ácido acético glacial 100%, com fluxo  $1 \text{ mL. min}^{-1}$ .

No final dos quatro dias de incubação dos derivados, nas condições acima citadas, filtraram-se as amostras em filtro sinterizado. Logo em seguida, adicionaram-se esses derivados em nove frascos de vidro de 20 mL de capacidade com 10 mL de solvente ciclohexano P.A com volume de 1,42 mL de ácido oleico na forma de azeite de Oliva P.A, e 1,0 mg de peneira molecular e  $103 \text{ }\mu\text{L}$  de álcool benzílico PA.

Deixaram-se sob agitação orbital (*shaker*) a 200 rpm por três horas, à temperatura de 40 °C. No decorrer do tempo, retiraram-se de cada frasco 20 µL de amostra e adicionaram-se a Eppendorfs de 2 mL com 1,75 mL da solução da fase móvel do HPLC (95 % v/v de metanol grau HPLC com 5,0 % v/v de água destilada acidificada com ácido acético). Realizou-se esse mesmo estudo nas mesmas condições com o solvente, 2-metil-2-butanol, cuja reação é ilustrada pela Figura 18.

Figura 18 – Ácido oleico + álcool benzílico



Fonte: Elaborada pelo autor (2016).

### 3.12 ATIVIDADE ENZIMÁTICA COM P-NITROFENILBUTIRATO (PNPB)

Realizou-se a análise da atividade enzimática adicionando-se a uma cubeta com 2,5 mL de tampão fosfato 25 mM pH 7,0 20 µL de solução de PNPB 50 mM e volumes de amostra de 25 µL, 50 µL ou 100 µL. Manteve-se a temperatura do sistema a 25 °C por intermédio de um banho de circulação externa de água, acoplado a uma cubeta com agitação magnética. Mediu-se a atividade enzimática hidrolítica em espectrofotômetro UV-VIS, no comprimento de onda fixo de 348 nm (PALOMO et al., 2005).

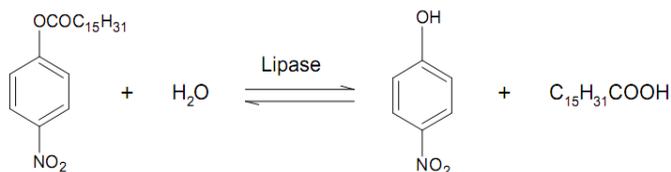
Para o cálculo de rendimento (atividade enzimática relativa) utilizou-se a Equação 1:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Branco} - \text{sobrenadante} * 100}{\text{solução}} \quad (1)$$

### 3.13 ATIVIDADE ENZIMÁTICA COM P-NITROFENIL PALMITATO (P-NPP)

Mediu-se a atividade enzimática hidrolítica pelo método espectrofotométrico (CHIOU; WU, 2004) que se baseia na hidrólise do p-nitrofenilpalmitato para o p-nitrofenol, que apresenta absorção a 410 nm. Mostra-se na Figura 19 a reação de hidrólise enzimática do p-NPP.

Figura 19 – Reação de hidrólise enzimática do p-NPP



Fonte: Elaborada pelo autor (2016).

### 3.14 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS

Quantificaram-se as proteínas pelo método de Bradford (1976).

### 3.15 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Realizaram-se as análises de imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC), em equipamento JEOL JSM-6390 LV.

### 3.16 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Quantificaram-se os ésteres do estudo de estabilidade dos derivados e do experimento em batelada para produção de ésteres de ácidos graxos por HPLC Spectra System P 4000 em coluna C18 RP 5  $\mu\text{m}$  de 150 x 4,6 mm, marca X, detector UV 248 nm com fase móvel de 95% de metanol e 5% de  $\text{H}_2\text{O}$  acidificado com ácido acético glacial 100%, fluxo  $1\text{mL min}^{-1}$ .

### 3.17 ANÁLISE DOS GRUPOS FUNCIONAIS POR FT-IR

Realizou-se a caracterização dos grupos funcionais que estão ligados covalentemente aos suportes estudados por Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Perkin Elmer

Modelo 16 PC FT-IR.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LIPASE COMERCIAL *RHIZOPUS ORYZAE* AMANO FAP-15

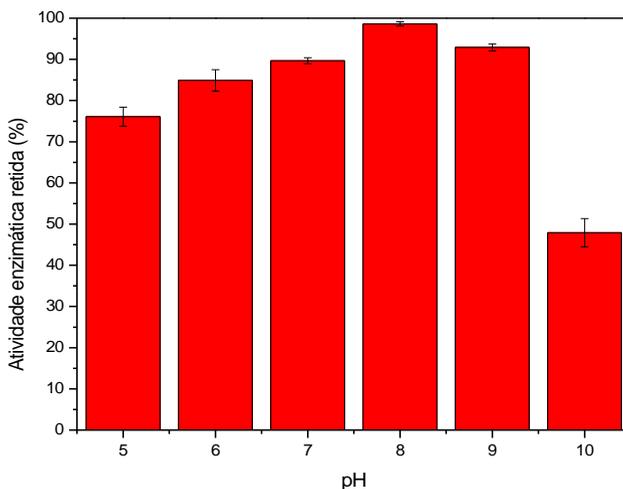
Para a imobilização da enzima lipase comercial em suporte de microesferas de nanocelulose bacteriana por ligação covalente multipontual, utilizou-se como agente reticulante o EDC em concentrações de  $0,25 \text{ g L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ , com concentração de proteínas de  $2,1 \text{ g L}^{-1} \pm 0,25$  com lipase comercial do fungo *Rhizopus oryzae* FAP-15.

### 4.2 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LIPASE DE *RHIZOPUS ORYZAE* AMANO FAP-15 EM MICROESFERAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA

As Figuras 20 e 21 ilustram as atividades enzimáticas residuais *versus* pH do sobrenadante na imobilização da lipase, nas quais se pode observar a eficiência da imobilização covalente e o quanto as proteínas efetivamente ficaram ligadas quimicamente ao suporte estudado, por meio de ligações covalentes.

Na Figura 20 verifica-se que o melhor pH para a imobilização de lipase em nanocelulose bacteriana com EDC com concentração de  $0,25 \text{ g L}^{-1}$  é o pH 8,0. Esses resultados demonstram que há uma grande margem de faixa de pH com a qual podemos trabalhar na imobilização de lipases em microesferas de nanocelulose bacteriana, com tampões na faixa de pH de 6,0 a 9,0. Explica-se esse comportamento pelo fato de o pH 8,0 ser básico e, assim pode-se protonar a reação de NCB com o agente reticulante EDC, formando uma base de *Schiff*, pH alcalino favorece a formação de grupos imina ( $\text{C}=\text{N}$ ) e através destes grupos a enzima liga-se covalentemente ao suporte que é uma ligação covalente muito estável e forte (CHIOU et al. (2004) e TING et al. (2006) (PACHECO, S.M.V, et al., 2015).

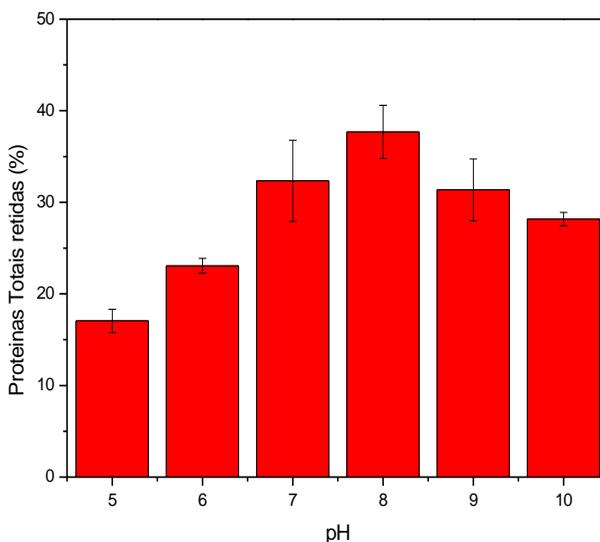
Figura 20 – Gráfico de atividade enzimática retida *versus* pH nas esferas de nanocelulose bacteriana com reagente funcionalizante EDC 0,25% g L<sup>-1</sup>



Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 21 mostra o gráfico de proteínas totais, onde se observa o comportamento com os valores de pH nas esferas de nanocelulose bacteriana, onde se conclui que o melhor pH para se imobilizar a lipase foi em pH 8,0 . Este fato pode ser explicado que em pH 8,0 que é ligeiramente básico, pode se protonar os grupos OH (hidroxilas da celulose bacteriana) com o agente reticulante EDC, formando assim uma base de *Schiff*, o pH alcalino favorece a formação de grupos imina (CH=N) e através destes grupos a enzima liga-se covalentemente ao suporte que é muito estável (CHIOU et al. (2004) e TING et al. (2006) (PACHECO, S.M.V, et al.,2015).

Figura 21 – Gráfico de proteínas totais retidas *versus* pH nas esferas de nanocelulose bacteriana com reagente funcionalizante EDC 0,25 g L<sup>-1</sup>



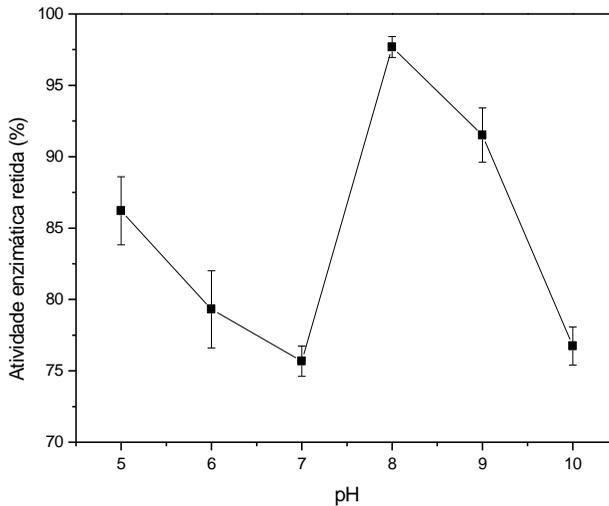
Fonte: Elaborada pelo autor

YAO et al. (2013) pesquisaram as propriedades e a viabilidade do uso de membranas de celulose bacteriana (MCB) como transportadoras e suportes para imobilizar a enzima glutamato descarboxilase (GAD), que é uma enzima para conversão em ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Durante o cultivo, as porosidades de MCB diminuiriam sucessivamente com fibrilas mais prolongadas empilhadas umas sobre as outras, formando um entrecruzamento. A melhor forma encontrada para imobilização da enzima foi por reticulação covalente cruzada com glutaraldeído 0,50 % v/v, com rendimento de imobilização de 87,56 %.

Na Figura 22 e Figura 23 mostram-se resultados relativos ao rendimento de atividade enzimática e proteínas totais x pH nas esferas de nanocelulose bacteriana com 0,50 g L<sup>-1</sup> de EDC. Nos dois gráficos, pode-se observar que efetivamente os resultados se repetem, mesmo quando aumentamos as concentrações de EDC, e que o melhor pH também foi o pH 8. Confirmaram-se esses resultados com análise por FTIR, comparados e concordantes com os resultados de SHENG-CHI; YING-KE (2008), KILDEVAA et al. (2009), HUNG et al. (2003), CHIOU et al. (2004) e Ting et al. (2006), respectivamente. Um dado que

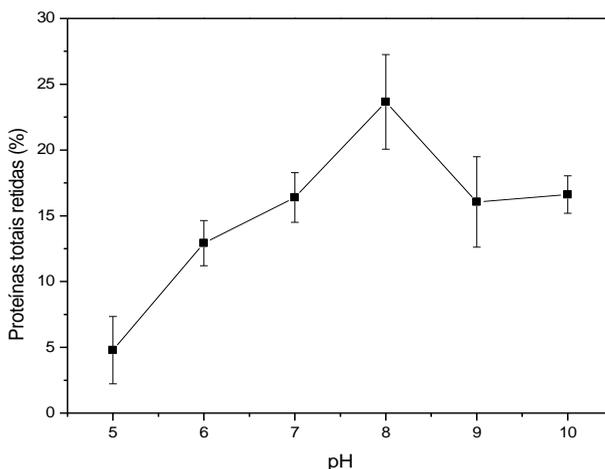
se observou, e que não deixa de ser curioso, ocorreu com os resultados da atividade enzimática. Observou-se como a atividade vai diminuindo, desde pH 5 até valores mais baixos a pH 7, mas que, depois de algum tempo, a atividade sobe até valores máximos a pH 8. Esse resultado mostrou que o agente reticulante EDC necessita de um pH ligeiramente básico para protonar os grupos aminos do EDC e consequentemente poder realizar a ligação covalente (CHIOU et al. (2004) e TING et al. (2006). Isso demonstra que o melhor valor de imobilização foi o de pH 8, como ilustrado nas Figuras 22 e 23.

Figura 22 – Gráfico de atividade enzimática retida *versus* pH nas esferas de nanocelulose bacteriana com reagente funcionalizante EDC 0,50 g L<sup>-1</sup>



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 23 – Gráfico de proteínas totais retidas *versus* pH nas esferas de nanocelulose bacteriana com reagente funcionalizante EDC 0,50 g L<sup>-1</sup>



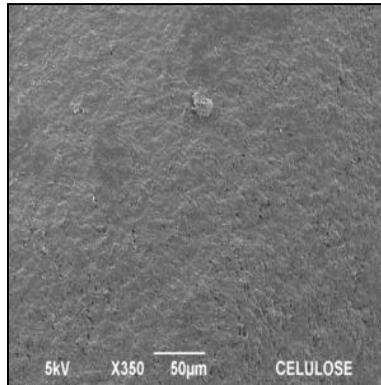
Fonte: Elaborada pelo autor

#### 4.3 AVALIAÇÃO POR IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E FT-IR DAS MICROESFERAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA (NBC)

Realizaram-se imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a verificação da modificação da superfície do biopolímero (NCB), as quais estão ilustradas nas Figuras 24 a 28.

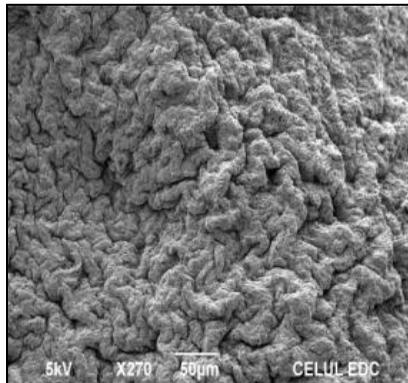
As imagens de MEV mostraram uma modificação da superfície do biopolímero com a funcionalização com EDC. As imagens de MEV do processo de imobilização com lipase Amano FAP-15 mostraram que houve uma grande modificação estrutural, resultando em uma estrutura enovelada na superfície do biopolímero de nanocelulose bacteriana, indicando a presença da enzima ligada covalentemente nas fibras da estrutura do biopolímero (NCB), com ligações covalentes multipontuais, confirmada posteriormente com análise de FT-IR pela absorção do grupamento imida do reagente reticulante EDC.

Figura 24 – Imagem de MEV da superfície do polímero de nanocelulose bacteriana (suporte) magnificação de X350 energia 5Kv e 50  $\mu\text{m}$



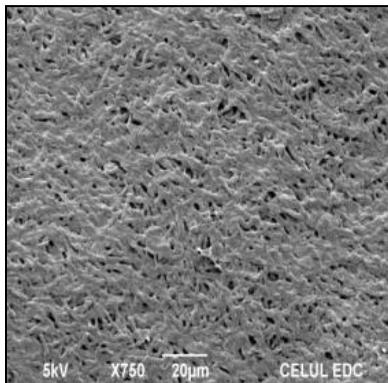
Fonte: Imagem obtida pelo autor.

Figura 25 – Imagem de MEV da nanocelulose bacteriana funcionalizada com EDC magnificação de X220 energia do feixe de 5Kv e 100  $\mu\text{m}$



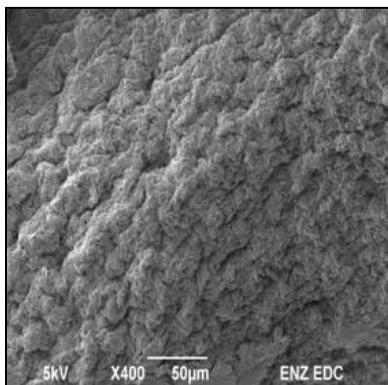
Fonte: Imagem obtida pelo autor.

Figura 26 – Imagem de MEV da nanocelulose bacteriana funcionalizada com EDC magnificação de X750 energia do feixe de 5Kv e 20  $\mu\text{m}$



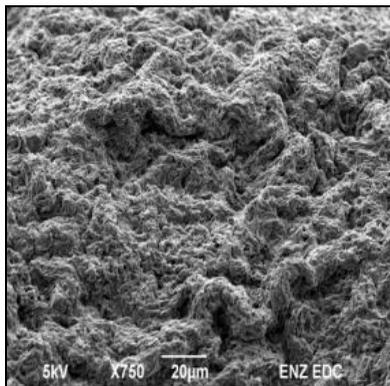
Fonte: Imagem obtida pelo autor

Figura 27 – Imagem de MEV da nanocelulose bacteriana funcionalizada com EDC e imobilizada com lipase FAP-15 Amano com magnificação de X400 energia do feixe de 5Kv e 100  $\mu\text{m}$



Fonte: Imagem obtida pelo autor.

Figura 28 – Imagem de MEV da nanocelulose bacteriana funcionalizada com EDC e imobilizada com lipase FAP-15 Amano com magnificação de X750 energia do feixe de 5Kv e 20  $\mu\text{m}$



Fonte: Imagem obtida pelo autor.

Realizaram-se análises de FT-IR para a nanocelulose bacteriana (RECOUVREUX et al., 2007) para a constatação da funcionalização com EDC com a lipase. Esses resultados estão ilustrados nos espectros com suas respectivas bandas de absorção, conforme Figura 29 e Figura 30.

As principais atribuições que caracterizam a nanocelulose bacteriana (NCB) são:  $3429\text{ cm}^{-1}$  estiramento OH;  $2928\text{ cm}^{-1}$  estiramento-CH de alcanos e estiramento assimétrico  $\text{CH}_2$ ;  $2881\text{ cm}^{-1}$ : estiramento simétrico  $\text{CH}_2$ ;  $1645\text{ cm}^{-1}$ : deformação OH;  $1458\text{ cm}^{-1}$ : deformação  $\text{CH}_2$ ;  $1383\text{ cm}^{-1}$ : deformação  $\text{CH}_3$ ;  $1303\text{ cm}^{-1}$ : deformação OH e  $1081\text{-}915\text{ cm}^{-1}$ : deformação CO.

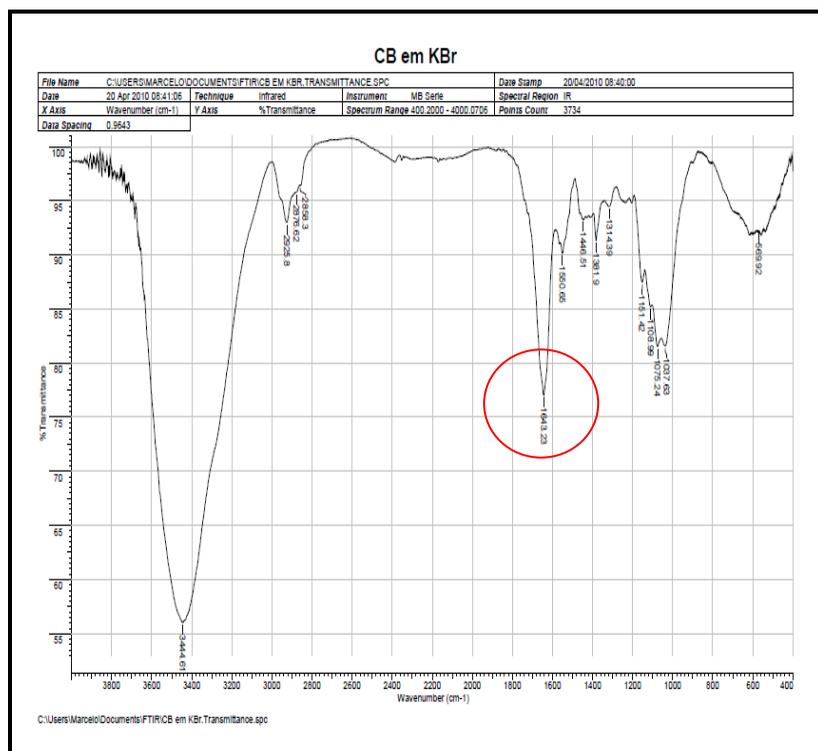
A principal mudança nos espectros de FT-IR de nanocelulose bacteriana funcionalizada (NCBF), após a funcionalização com EDC e imobilização com lipase, foi da absorção na região de  $1650\text{ cm}^{-1}$ , que é característica de grupo imida de carbodiimida (EDC), deformação axial de CN de grupos amino entre  $1323$  e  $1379\text{ cm}^{-1}$  dos resíduos de aminoácidos da enzima lipase, deformação axial de C=O de amida por volta de  $1655\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de N-H em aproximadamente  $1599\text{ cm}^{-1}$  e deformação axial de CN de amida por volta de  $1421\text{ cm}^{-1}$ .

A principal mudança nos espectros de FT-IR de nanocelulose bacteriana (NCB) após a imobilização com EDC com lipase, é da absorção na região de  $1650\text{ cm}^{-1}$  que é uma absorção característica de grupo imida de carbodiimida (EDC), deformação axial de -CN de grupos amino entre  $1323$  a  $1379\text{ cm}^{-1}$  dos resíduos de aminoácidos da

enzima lipase, deformação axial de C=O de amida por volta de  $1655\text{ cm}^{-1}$ ; deformação angular de N-H em aproximadamente  $1599\text{ cm}^{-1}$ ; deformação axial de -CN de amida por volta de  $1421\text{ cm}^{-1}$ .

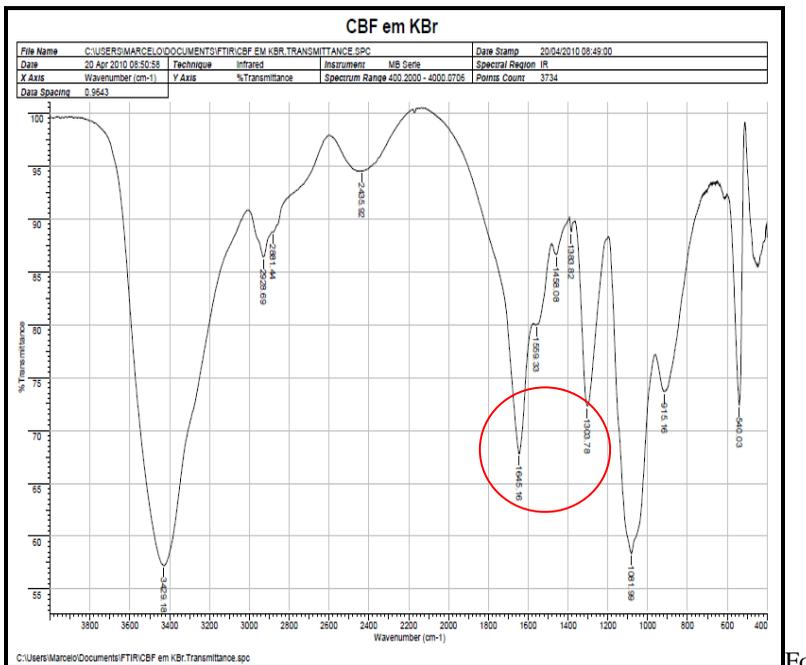
Nelas se pode observar uma mudança nos espectros de absorção para o EDC com incremento de absorções de grupos amidas na região de  $1645\text{ cm}^{-1}$  e deformação axial C-O-C entre  $1303\text{--}1081\text{ cm}^{-1}$ . Seguramente, esse comportamento é devido ao aumento significativo da concentração de EDC (50%) nos experimentos.

Figura 29 – Espectro de FT-IR de amostra de nanocelulose bacteriana preparada em KBr com suas bandas características



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 30 – Espectro de FT-IR de amostra de nanocelulose bacteriana funcionalizada com EDC preparada em KBr com suas bandas características



Fo

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.4 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES COMERCIAIS CALB, PALATASE<sup>®</sup> (RML) E TLL SOBRE OCTILAGAROSE, GLIOXILAGAROSE, BROMETO DE CIANOGENÍO, SEPHAROSE Q BIG B, MANAE

Nesta seção apresentam-se e se discutem os rendimentos das imobilizações das lipases comerciais Novozymes<sup>®</sup> Palatase<sup>®</sup> (RML), CALB e Lipolase<sup>®</sup> (TLL) em diferentes suportes: octilagarose, glioxilagarose, brometo de cianogênio, Sepharose Q Big B, MANAE, e a sua funcionalização com diferentes concentrações de glutaraldeído (0,5 e 25% v/v). Os resultados estão ilustrados na Tabela 3.

Todos os biocatalisadores testados tiveram rendimentos de imobilização de atividade enzimática a 25 °C, acima de 80%, com exceção dos derivados preparados com o suporte Sepharose Q Big B (adsorção iônica), que tiveram resultados e desvio padrão de  $19,81 \pm 1,20$ <sup>1</sup>.

Tabela 3 – Rendimentos de imobilização de CALB (*Candida antarctica* B) aos diferentes derivados (25 °C)\*

Suporte	Rendimento de imobilização (%)	Forma de ligação	Concentração de proteínas [mg g <sup>-1</sup> ]
Octilagarose	97,95±0,56 <sup>1</sup>	Adsorção hidrofóbica	3,0 ±0,5 <sup>1</sup>
Sepharose Q Big B	19,81±1,20 <sup>1</sup>	Adsorção iônica	2,1±0,3 <sup>1</sup>
BrCN Octilagarose	92,00±1,41 <sup>1</sup>	Covalente unipontual	10,0±0,10 <sup>1</sup>
Glioxil-agarose aminado	98,50±0,56 <sup>1</sup>	Covalente multipontual	5,0±0,12 <sup>1</sup>
MANAE glutal 0,5% v/v	81,35±0,81 <sup>1</sup>	Covalente cruzada	3,0±0,5 <sup>1</sup>
MANAE glutal 25% v/v	94,27±1,47 <sup>1</sup>	Covalente cruzada	3,0±0,5 <sup>1</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor.

<sup>1</sup> Os valores apresentados são referentes à média ± desvio padrão (n = 3).

\*As metodologias de imobilização encontram-se na seção 3.8.

#### 4.5 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO DE CALB E PALATASE® (*RHIZOMUCOR MIEHEI* - RML) SOBRE DERIVADOS DE GLIOXILAMINO

Para os biocatalisadores preparados em glioxilamino com a lipase CALB, os rendimentos foram de 98,50±1,56<sup>1</sup>, (Tabela 3).

Em contrapartida, quando se utilizou esse mesmo suporte para a imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei* (Palatase®), obteve-se resultado de rendimento de imobilização de 38,51±0,15<sup>1</sup>. O fato de os rendimentos serem extremamente diferentes implica que as lipases são diferentes na sua estrutura molecular e, possivelmente, que algumas sofram algum impedimento estérico, e não que a quantidade e disposição de grupamentos aminos na sua superfície difira significativamente, o que, interferiria diretamente na interação de tipo covalente multipontual.

Os rendimentos de imobilização unipontual para os biocatalisadores imobilizados com brometo de cianogênio (BrCN-Octilagarose) foram de 96,97±0,05<sup>1</sup>. Isso ocorreu porque naturalmente

esse biocatalisador foi imobilizado por ligações covalentes unipontuais, que são muito fortes e estáveis.

A Tabela 4 ilustra resultados obtidos com experimento de imobilização com a enzima Palatase® (*Rhizomucor miehei*).

Tabela 4 – Rendimento dos biocatalisadores com a enzima Palatase® (*Rhizomucor miehei*) à temperatura de 25 °C\*

Suporte	Rendimento de imobilização (%)	Forma de ligação	Concentração de proteínas [mg g <sup>-1</sup> ]
Octilagarose	82,50±1,14 <sup>1</sup>	Adsorção hidrofóbica	2,6±0,54 <sup>1</sup>
Sepharose Q Big B	91,58±1,36 <sup>1</sup>	Adsorção iônica	2,1±1,25 <sup>1</sup>
Octilagarose + enzima aminado	87,15±3,91 <sup>1</sup>	Covalente multipontual	2,8±0,90 <sup>1</sup>
Glioxil-agarose aminado	38,51±0,15 <sup>1</sup>	Covalente multipontual	5,0±0,80 <sup>1</sup>
BrCN Octilagarose	96,97±0,05 <sup>1</sup>	Covalente unipontual	7,0±0,50 <sup>1</sup>
MANAE GLUTAL 25% v/v	99,04±1,40 <sup>1</sup>	Covalente cruzada	7,0±1,0 <sup>1</sup>
MANAE GLUTAL 0,5% v/v	83,50±1,63 <sup>1</sup>	Covalente cruzada	7,0±0,71 <sup>1</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor.

<sup>1</sup> Os valores apresentados são referentes à média ± desvio padrão (n = 3).

\*As metodologias de imobilização encontram-se na seção 3.8

#### 4.6 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO DA PALATASE (*RHIZOMUCOR MIEHEI*) SOBRE DERIVADOS DE SEPHAROSE Q, OCTILAGAROSE, BRCN E MANAE

Conforme os resultados mostrados na Tabela 4, a imobilização de Palatase® (*Rhizomucor miehei*) por adsorção iônica sobre Sepharose Q Big B apresentou rendimentos de 91,58±1,36, enquanto a utilização de Octilagarose resultou em rendimento de imobilização de 82,50±1,14.

O rendimento de imobilização com MANAE-Palatase® (RML), foi com MANAE-Palatase em glutaraldeído 25% v/v. Com isso se conclui que aumentar a concentração do agente entrecruzante melhora não só os rendimentos de imobilização, como também os níveis de estabilização enzimática.

Comparando os dois resultados de imobilização (Tabela 3 e Tabela 4), constata-se que as duas enzimas, CALB® e Palatase® (RML) imobilizadas em MANAE glutaraldeído 25% v/v, tiveram valores de rendimentos, para MANAE CALB glutaraldeído 25% v/v; com carga de proteínas de  $3,0 \pm 0,5^1$  mg g<sup>-1</sup> com rendimento de  $94,27 \pm 1,47^1$ .

Para o biocatalisador MANAE-Palatase® glutaraldeído 25% v/v, o rendimento de imobilização foi de  $99,04 \pm 1,40$ , com concentração de proteínas de  $7,0 \pm 0,7^1$  mg g<sup>-1</sup>. A conclusão é que se obtêm rendimentos próximos, com quantidades de concentração de proteínas duas vezes maiores, embora as lipases possuam quantidades distintas de aminoácidos superficiais, bem como de grupos lisinas em quantidades diferentes em sua molécula e, conseqüentemente, quantidades diferentes de grupos disponíveis para fazer a ligação cruzada com os substratos.

Comparando os resultados da Tabela 3 e da Tabela 4, para as enzimas CALB® e Palatase® sobre o suporte glioxilagarose, conclui-se que se obteve o melhor com o biocatalisador octilagarose, com a enzima CalB aminada, com concentração de proteínas de  $3,0 \pm 0,5^1$  mg g<sup>-1</sup>, que resultou em rendimento de  $98,50 \pm 1,56^1$ . Comparando-se os resultados ilustrados na Tabela 3 e na Tabela 4, conclui-se que se obtiveram-se melhores rendimentos de imobilização, com este mesmo biocatalisador, com glioxilaminada-Palatase® (RML), com rendimentos de imobilização de  $38,51 \pm 0,15$ ; com concentração de proteínas de  $5,0 \pm 0,53^1$  mg g<sup>-1</sup>. Conclui-se então que isso ocorreu porque, embora as concentrações de proteínas sejam diferentes, a enzima RML tem pouca densidade de grupos aminos (lisinas) em sua superfície.

Para o biocatalisador Octilagarose-Palatase®, imobilizado por adsorção hidrofóbica, o rendimento de imobilização foi de  $87,15 \pm 3,91^1$ , com concentração de proteínas de  $2,8 \pm 0,9^1$  mg g<sup>-1</sup>, como ilustrado na Tabela 3. Esses resultados, comparados com os da Tabela 4, em que o derivado foi Octilagarose-CalB, houve rendimentos de  $97,95 \pm 0,56^1$ , com concentração de proteínas de  $3,0 \pm 0,5^1$  mg g<sup>-1</sup>.

Esse fato demonstra que, embora os biocatalisadores tenham concentração de proteínas bem próximas, é a densidade de grupos aminos que influencia na imobilização nos derivados. A enzima CALB é uma lipase que possui uma grande densidade de grupamentos lisinas

disponíveis em sua superfície para fazer qualquer tipo de ligação química.

Conclui-se que, embora os valores de concentrações de proteínas sejam bem parecidos, o melhor rendimento foi obtido com o biocatalisador com a lipase de *Candida antarctica* B (CALB), por causa das características distintas das duas lipases estudadas em sua estrutura molecular.

Os biocatalisadores Sepharose Q Big B-CALB tiveram rendimentos de imobilização de  $19,81 \pm 1,20^1$ , com concentração de proteínas de  $2,1 \pm 0,30^1 \text{ mg g}^{-1}$ , comparados com os valores dos biocatalisadores de Sepharose Q Big B-Palatase<sup>®</sup>, com valor de rendimento de  $91,58 \pm 1,36^1$  com mesmo valor de concentração de proteínas de  $2,1 \pm 0,30^1 \text{ mg g}^{-1}$ . Concluiu-se que embora sejam suportes iguais e tenham também as mesmas concentrações proteicas, foi a enzima Palatase<sup>®</sup> (RML) que teve uma excelente capacidade de interação enzima-suporte, por ter mais cargas em sua superfície e, conseqüentemente, os suportes possuem as mesmas interações iônicas com a proteína.

#### 4.7 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO DA TLL (*THERMOMYCES LANUGINOSUS*) SOBRE MANAE 0,5 % E MANAE 25% COM GLUTARALDEÍDO A 25 °C

Os resultados mostrados na Tabela 5 indicam os rendimentos de imobilizações obtidos para a esta enzima TLL, tanto por adsorção iônica quanto por ligações covalentes multipontuais e por ligações covalentes cruzadas.

Pode-se constatar que o aumento da concentração de glutaraldeído na solução resultou em um aumento do rendimento de imobilização da TLL sobre MANAE-glutaraldeído 0,5% com rendimento de imobilização de  $90,52 \pm 0,23^1$  e MANAE-glutaraldeído 25% com rendimento de imobilização de  $100 \pm 0,44^1$ , com a mesma concentração de proteínas de  $10,0 \pm 0,10^1 \text{ mg g}^{-1}$ . A constatação é que houve maior rendimento quando se aumentou a concentração de glutaraldeído e cresceram as chances de mais ligações covalentes cruzadas na superfície do suporte e também do aumento da concentração de proteínas.

Observou-se que para os biocatalisadores imobilizados com a enzima TLL, houve rendimentos excelentes. Isso indica que a lipase TLL é uma enzima que possui muitos atributos quanto aos grupos lisinas em sua molécula e uma grande densidade de grupos de resíduos de

aminoácidos em sua superfície, disponíveis a ligações químicas por adsorção iônica, adsorção hidrofóbica e também por ligações covalentes unipontuais e multipontuais.

Tabela 5 – Rendimento de imobilização dos biocatalisadores com TLL (*Thermomyces lanuginosus*) à temperatura de 25 °C\*

Suportes	Rendimento de imobilização (%)	Forma de ligação	Concentração de proteínas [mg g <sup>-1</sup> ]
Octilagarose	99,85 ± 0,11 <sup>1</sup>	Adsorção hidrofóbica	10,0±0,50 <sup>1</sup>
Sepharose QBig B	100 ±0,20 <sup>1</sup>	Adsorção iônica	10,0±0,20
BrCN Octilagarose	99,25 ± 0,07 <sup>1</sup>	Covalente unipontual	10,0±0,25
Glioxil-agarose-aminado	100 ± 0,25 <sup>1</sup>	Covalente multipontual	10,0±0,15
MANAE GLUTAL 0,5% v/v	90,52 ±0,23 <sup>1</sup>	Covalente cruzada	10,0±0,18
MANAE GLUTAL 25% v/v	100 ± 0,44 <sup>1</sup>	Covalente cruzada	10,0±0,10

Fonte: Elaborada pelo autor.

<sup>1</sup> Os valores apresentados são referentes à média ± desvio padrão (n = 3).

\*As metodologias de imobilização encontram-se na seção 3.8.

#### 4.8 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO DE TLL SOBRE LEWATIT, DUOLITE E SEPABEADS À TEMPERATURA DE 25 °C

Realizaram-se imobilizações em resinas comerciais, as quais representam suportes correspondentes aos de Octilagarose já estudados, conforme ilustrado na Tabela 6. O objetivo das imobilizações foi de provar que, mesmo tendo natureza física e química diferentes, esses suportes apresentam a mesma capacidade de fazer ligações por adsorção hidrofóbica, adsorção iônica e ligação covalente multipontual; ou seja, são suportes comerciais que estão disponíveis para fazer imobilizações iguais às dos respectivos suportes de agarose.

Tabela 6 – Suportes de agarose e suas correspondentes resinas comerciais

Tipos de suporte de agarose	Resina correspondente
Octilagarose 4b Ce	Lewatit VP OC 1600
Sepharose Q Big B	Duolite A 568
Glioxil-agarose	Sepabeads EC HG (NaIO <sub>4</sub> )

Fonte: Elaborada pelo autor

Realizou-se a imobilização com as lipases comerciais, CALB, Palatase® (RML) e Lipolase® (TLL) a 25 °C com as três resinas comerciais: a resina Lewatit VP OC 1600, Duolite A 568 e a resina Sepabeads EC HG, que são de natureza hidrofóbica. Descreve-se a purificação da enzima comercial Lipolase® (TLL) e a sua dessorção conforme consta na seção 5.3.

A Tabela 7 ilustra os rendimentos de imobilização da lipase CALB sobre os três suportes mencionados e suas respectivas cargas de proteínas. Todos os biocatalisadores tiveram rendimentos de imobilização acima de 90 %, com concentração de proteínas de  $3,0 \pm 1,0^1$ .

Tabela 7 – Imobilização de resinas comerciais em lipase CALB a temperatura de 25 °C\*

Suporte	Rendimento de imobilização (%)	Forma de ligação	Concentração de proteínas [mg g <sup>-1</sup> ]
Lewatit VP OC 1600	$96,67 \pm 0,92^1$	Adsorção hidrofóbica	$3,0 \pm 1,0^1$ $3,0 \pm 1,0$
Duolite A 568	$100,00 \pm 0,35^1$	Adsorção hidrofóbica	$3,0 \pm 1,0$
SEPABEADS EC HG	$95,25 \pm 1,24^1$	Covalente multipontual	$3,0 \pm 1,0$

Como se pode observar na Tabela anterior, fazendo uso dos suportes Duolite A 568 e Lewatit VP OC 1600, todos de natureza hidrofóbica, obtiveram-se resultados de imobilização muito parecidos, o que pode ser atribuído à natureza hidrofóbica idêntica dos suportes e das características da enzima (CALB), que possui uma boa densidade de grupos aminos (lisinas) na sua superfície. Embora a natureza do derivado Sepabeads EC-CALB seja mais estável, devido ao fato de que as ligações covalentes multipontuais sejam mais fortes, os demais derivados (hidrofóbicos) tiveram rendimentos de imobilização com valores bem próximos.

#### 4.9 RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO DA PALATASE® (RML) E LIPOLASE® (TLL) SOBRE LEWATIT, DUOLITE E SEPABEADS À TEMPERATURA DE 25 °C

Imobilizaram-se as lipases Palatase® (RML) e Lipolase® (TLL) em suportes de Lewatit VP OC 1600, Duolite A 568 e Sepabeads EC HG (Tabela 8 e Tabela 9).

A Tabela 8 mostra os resultados de rendimento obtidos com a Palatase (RML) em resinas hidrofóbicas (Lewatit VP OC 1600 e Duolite A 568).

Esses rendimentos são bem parecidos quando se imobilizou com o suporte Sepabeads EC HG, derivado enzimático de natureza covalente multipontual (Tabela 8 e Tabela 9). Concluiu-se que esses biocatalisadores tiveram os mesmos efeitos de imobilização com concentração de proteína de  $2,1 \pm 1,05^1$  mg g<sup>-1</sup>, embora eles sejam diferentes, mas o biocatalisador de Sepabeads-RML foi mais eficiente, com resultados de rendimento de imobilização de  $100 \pm 0,30^1$ . Isto é, por causa da forma de imobilização covalente multipontual, que é mais estável no biocatalisador Sepabeads EC-RML. Os outros biocatalisadores tiveram rendimentos muito parecidos porque esses suportes de Lewatit e Duolite são de adsorção muito hidrofóbica.

Tabela 8 – Imobilização de resinas comerciais em lipase Palatase® (RML) à temperatura de 25 °C\*

Suporte	Rendimento de imobilização (%)	Forma de ligação	Concentração de proteínas [mg g <sup>-1</sup> ]
Lewatit VP OC 1600	97,26 ± 0,55 <sup>1</sup>	Adsorção hidrofóbica	2,1 ± 1,05 <sup>1</sup>
Lewatit VP OC 1600	96,48 ± 0,55 <sup>1</sup>	Adsorção hidrofóbica	2,1 ± 1,05
Duolite A 568	96,25 ± 0,44 <sup>1</sup>	Adsorção hidrofóbica	2,1 ± 1,05
SEPABEADS EC HG	100 ± 0,30 <sup>1</sup>	Covalente multipontual	2,1 ± 1,05

Fonte: Elaborada pelo autor.

<sup>1</sup> Os valores apresentados são referentes à média ± desvio padrão (n = 3).

\*As metodologias de imobilização encontram-se na seção 3.8.

#### 4.10 IMOBILIZAÇÃO DE RESINAS COMERCIAIS EM LIPASE LIPOLASE® (TLL) À TEMPERATURA DE 25 °C

A Tabela 9 demonstra os resultados de rendimento de imobilização dos derivados de natureza hidrofóbica (Duolite A 568 e Lewatit VP OC 1600) com TLL e Sepabeads EC-TLL de natureza covalente multipontual.

Os resultados de rendimento de imobilização com resinas hidrofóbicas de Lewatit VP OC 1600 – TLL foram os que tiveram os rendimentos bem parecidos com a lipase TLL (*Thermomyces lanuginosus*), seguido do biocatalisador Sepabeads EC-TLL de caráter covalente multipontual. Todos esses biocatalisadores tiveram concentrações de proteínas de  $2,1 \pm 1,05^1$  mg g<sup>-1</sup>.

A explicação para esse fato está na natureza da lipase TLL, que certamente possui grande densidade de grupos lisinas, e também na resina Lewatit VP OC 1600, que é muito hidrofóbica e possui uma grande capacidade de adsorção em seus poros, ou seja, possui uma grande área superficial. Os biocatalisadores com ligações covalentes multipontuais são muito mais estáveis devido à natureza das ligações covalentes mais fortes com as lisinas das lipases e, conseqüentemente, possuem muitos sítios catalíticos disponíveis.

Tabela 9 – Imobilização de resinas comerciais em lipase de TLL (*Thermomyces lanuginosus*) à temperatura de 25 °C.\*

Suporte	Rendimento de imobilização [%]	Forma de ligação	Concentração de proteínas [mg g <sup>-1</sup> ]
Lewatit VP OC 1600	96,24 ± 0,17 <sup>1</sup>	Adsorção hidrofóbica	2,1±1,0 <sup>1</sup>
Duolite A 568	92,60 ± 1,53 <sup>1</sup>	Adsorção hidrofóbica	2,1±1,0
SEPABEADS EC HG	95,00 ± 1,06 <sup>1</sup>	Covalente multipontual	2,1±1,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

<sup>1</sup> Os valores apresentados são referentes à média ± desvio padrão (n = 3).

\*Os detalhes da imobilização encontram-se descritos na seção 3.8

#### 4.11 RESULTADOS DA ESTABILIDADE TÉRMICA DOS DERIVADOS

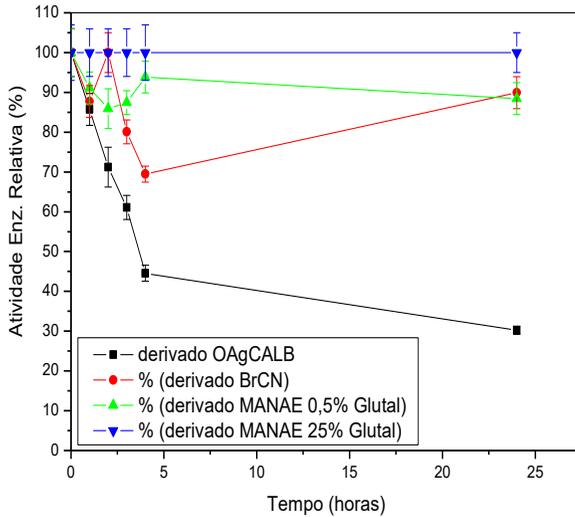
Uma das características mais importantes dos diferentes biocatalisadores obtidos através das várias metodologias aplicadas é sem dúvida a estabilidade térmica, pois só assim pode-se prever o tipo de reação, o tipo de reator e o processo a ser usado em presença desses derivados.

Essas reações ocorreram à temperatura que variou de 40 °C a 80 °C, uma vez que essa análise incluía biocatalisadores obtidos hidrofobicamente, ionicamente e covalentemente. Assim, era de se esperar que as respectivas estabilidades fossem diferentes umas das outras, porque os derivados foram imobilizados com suportes diferentes e também por adsorção e de forma covalente cruzada unipontual.

O melhor rendimento de imobilização foi com o biocatalisador de MANAE, com 25% de glutaraldeído, porque esse biocatalisador está imobilizado por ligações covalentes cruzadas com uma maior concentração de glutaraldeído a 25 % v/v que fazem com que essas ligações sejam mais fortes submetidas a temperaturas mais elevadas e, conseqüentemente, suportem a variação de temperaturas. As ligações com os derivados por adsorção iônica são mais fracas à variação de temperatura e são suscetíveis ao rompimento, por possuírem ligações mais fracas (iônicas). Demonstrem-se os resultados na Figura 31, efetuando-se todos os experimentos com três réplicas (n = 3) e calculando-se o erro experimental.

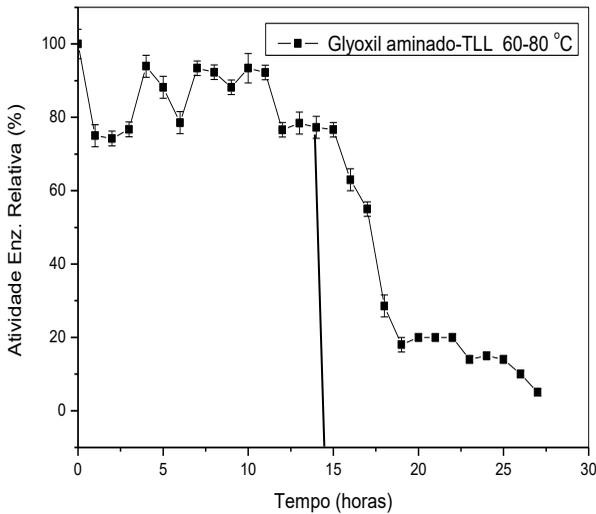
Posteriormente realizou-se este mesmo estudo para os diferentes derivados a temperaturas de 60 °C a 80 °C. Como se observou, o derivado glioxiloctilagarose imobilizado com a enzima TLL aminada manteve quase intacta a sua atividade a 60 °C, com cerca de 80% de atividade enzimática residual; mas, uma vez aumentada a temperatura a 80 °C, a atividade caiu vertiginosamente, o que também era previsível. Esses resultados demonstraram que os derivados com ligações covalentes realmente são mais estáveis a temperaturas mais elevadas, se os comparamos com derivados por adsorção hidrofóbica e/ou iônicas, como ilustrado na Figura 32.

Figura 31 – Estabilidade térmica da enzima CALB imobilizada em Octilagarose, BrCN, MANAE0,5% Glutal e MANAE 25% Glutal à temperatura de 40 °C (n = 3)



Fonte: Elaborada pelo autor

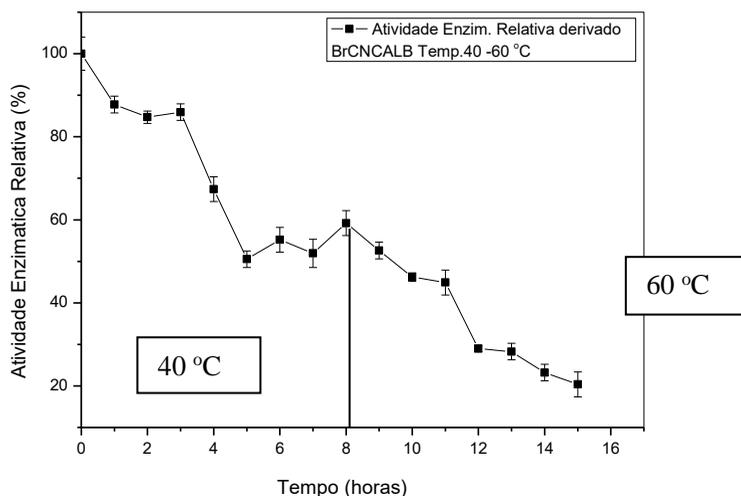
Figura 32 – Estabilidade térmica do derivado Glixil-octilagarose- aminado-TLL nas temperaturas de 60 °C a 80 °C (n = 3)



Fonte: Elaborada pelo autor

A imobilização realizada com o derivado Brometo de Cianogênio-agarose com a enzima CALB, a temperaturas de 40 °C a 60 °C demonstrou que com esse derivado, à medida que aumentaram as temperaturas, a sua atividade enzimática relativa foi caindo progressivamente, o que também era previsível atendendo ao tipo de interação entre a enzima e o suporte. Esse resultado demonstrou que, para esse derivado de BrCN-CALB, há uma queda de atividade enzimática a partir da temperatura de 40 °C. Isso pode ser explicado porque a natureza da ligação desse derivado é covalente unipontual. Ligações covalentes unipontuais são mais fracas termicamente, porque têm poucos grupos aminos ligados covalentemente ao suporte, possuindo uma menor densidade de sítios catalíticos nesses derivados. Demonstra-se o efeito desse comportamento na Figura 33.

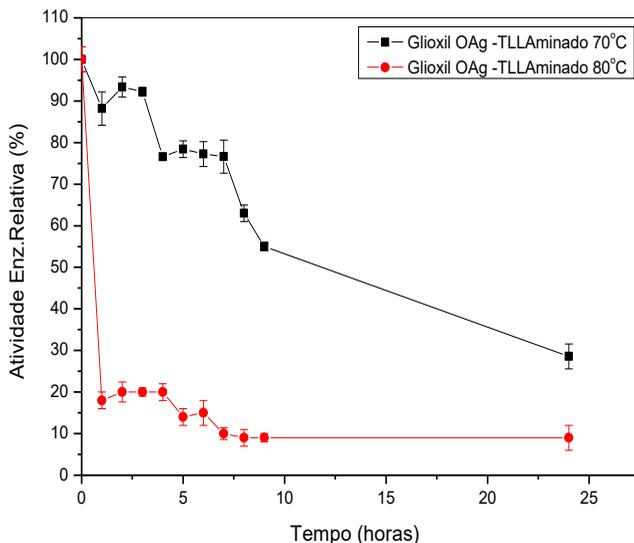
Figura 33 – Estabilidade térmica em atividade enzimática relativa do derivado BrCN-CALB a temperaturas de 40 a 60 °C (n = 3)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Estudos realizados com derivados aminados e imobilizados em glioxil-agarose-aminado com lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) demonstraram que eles não são estáveis a temperaturas de 70 °C a 80 °C. O fato é um pouco curioso talvez por causa da natureza da enzima, que é mais pobre por grupos aminos do que pelas interações enzima-suporte, como se pode observar na Figura 34.

Figura 34 – Termoestabilidade do derivado glioxil-agarose-aminado -TLL de 70 °C a 80 °C (n = 3)

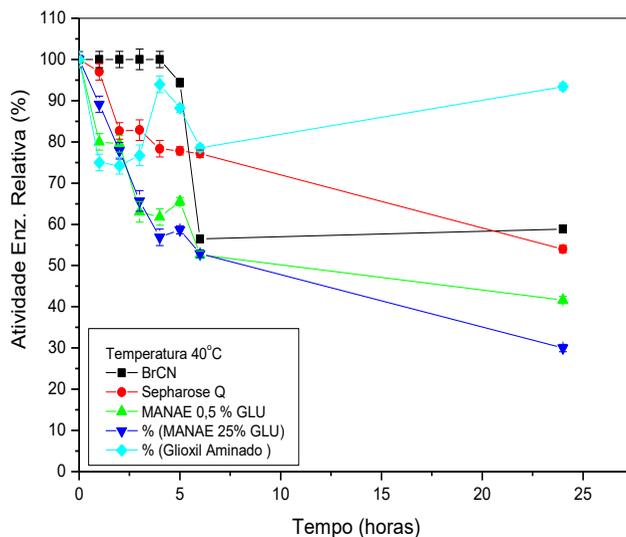


Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 35 apresenta a atividade enzimática residual à temperatura de 70 °C a 80 °C. Como se pode observar, e como era de se esperar, o melhor derivado é o preparado sobre glioxilagarose com a enzima previamente aminada, por ser uma ligação covalente multipontual com muitos grupos aminados. Esse efeito de aumento de grupos aminos na superfície da enzima favoreceu uma maior interação entre a enzima e o suporte de maneira a melhorar a estabilidade térmica desses derivados. Esta conclusão demonstra como essas ligações covalentes multipontuais são mais fortes, mais estáveis e mais rígidas, comparadas com as ligações por adsorção iônica, que são muito mais frágeis de estabilidade térmica.

Na Figura 35 e Figura 36 compararam-se os efeitos da temperatura com derivados por adsorção iônica e derivados por ligações covalentes e concluiu-se que os melhores efeitos termoestabilizadores dos derivados estudados foram os que apresentaram grupos glioxis. Segundo GUIÁN (1988), a utilização de géis de glioxil-agarose possibilita uma intensa multi-interação enzima-suporte, sem distorção da estrutura da enzima, devido à ausência de impedimentos estéricos para reação química amino-aldeído.

Figura 35 – Estabilidade térmica dos derivados BrCN-TLL, Sepharose Q-TLL, MANAE 0,5% Glutal, MANAE 25% Glutal e Glioxil –TLL Aminada a 60 °C (n = 3)

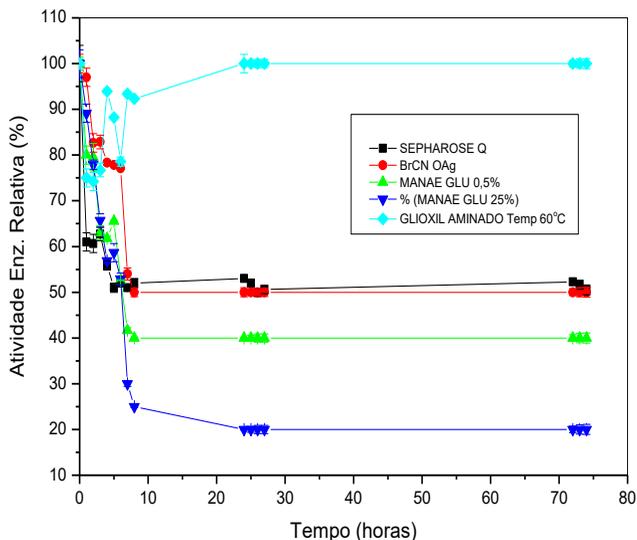


Fonte: Elaborada pelo autor.

Dessa forma, as bases instáveis de *Schiff*, com redução com borohidreto de sódio, são convertidas em amins secundárias estáveis, produzindo-se derivados com alta retenção de atividade enzimática, alta rigidez e, por conseguinte, alta estabilidade térmica. Esses resultados corroboram com os de Mendes (2009), que estudou a estabilidade dos grupos glioxis com vários derivados enzimáticos, confirmando a grande estabilidade térmica a solventes orgânicos.

Como observado e ilustrado pela Figura 36, a estabilidade térmica do derivado imobilizado sobre glioxil e com a enzima aminada foi melhor que a dos demais derivados na temperatura estudada, os quais tiveram resultados de atividade enzimática relativa com valores muito baixos com a temperatura de 60 °C. O derivado glioxil-aminado teve o melhor desempenho por causa da forte ligação covalente desses derivados (biocatalisadores) e, conseqüentemente, da alta estabilidade térmica.

Figura 36 – Estabilidade térmica dos derivados BrCN-TLL, Sepharose Q-TLL, Manae glutal 0,5% , Manae glutal 25% e Glioxil TLL-aminada à 60 °C (n 3)

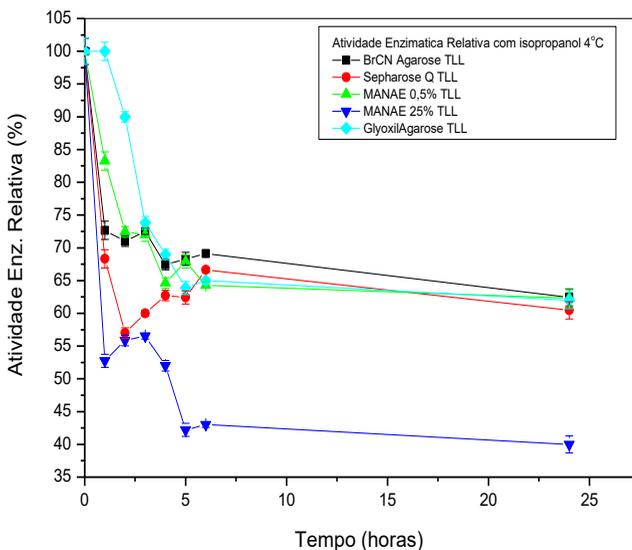


Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.12 ESTUDO DA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA RELATIVA DIANTE DE SOLVENTES POLARES E APOLARES

Indicam-se na Figura 37 os resultados para os derivados utilizando 2-propanol (isopropanol), os quais demonstram que a atividade enzimática diminui depois de cinco horas para todos os derivados. O melhor resultado foi para o derivado glioxilagarose-TLL e o pior foi para o derivado MANAE 25% glutaraldeído com TLL. Esse resultado deve-se ao fato de as ligações covalentes serem mais efetivas no derivado aminado de glioxilagarose TLL e também ao fato de o 2-propanol ser muito polar. Mas, como se pode observar, com a exceção do derivado MANAE-agarose com 25% de glutaraldeído, cuja atividade diminuiu para cerca de 40%, os demais derivados mantiveram mais ou menos 70% de sua atividade enzimática residual. Esses resultados demonstraram a grande estabilidade de derivados ligados por ligações covalentes diante de solventes mais polares.

Figura 37 – Gráfico de atividade enzimática relativa de derivados diante de solvente 2-propanol à temperatura de 4 °C (n = 3)



Fonte: Elaborada pelo autor.

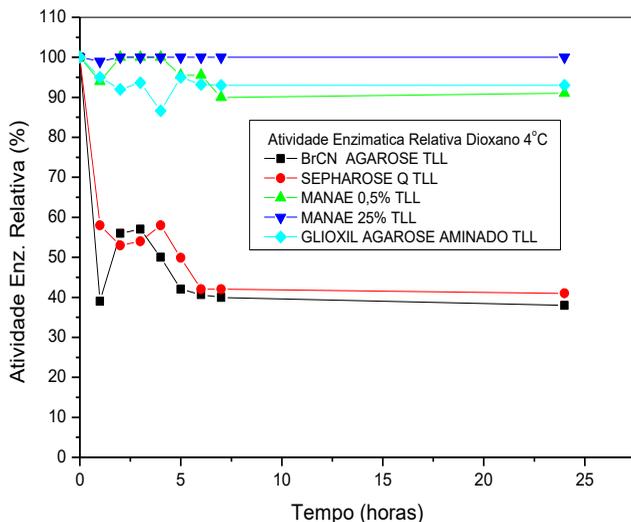
Para esta etapa, utilizou-se neste experimento o solvente 1,2-dioxano P.A (solvente mais apolar) para os cinco derivados estudados. Observou-se que houve uma mudança no rendimento de atividade enzimática relativa para eles, pois se utilizou um solvente de caráter muito apolar.

Os melhores resultados de atividade enzimática relativa nas mesmas condições do ensaio anterior foram para os derivados de MANAE 25% V/V (que foi o pior com um solvente de caráter mais polar). Com os derivados de Glutal-TLL MANAE 0,5% V/V e MANAE Glutal-TLL 25% e glioxilagarose TLL-aminada, estes tiveram rendimentos de atividade enzimática relativa de 95 % a 100% em 24 horas de reação.

A explicação para esses rendimentos está no fato de que as lipases têm melhores rendimentos em presença de solventes orgânicos apolares, conforme descrito na literatura, com o aumento do coeficiente de partição ( $\log P$ ) (ZAKS; RUSSEL, 1988; KLIBANOV, 1997, MATEO et al., 2007a; ANTCZAK et al., 2009; LI et al., 2007), também pelo fato de os derivados possuírem ligações por entrecruzamento muito fortes, como é o caso de MANAE 25% glutaraldeído-TLL, MANAE

0,5% glutaraldeído-TLL, que possuem ligações cruzadas (*crosslinked*) e do derivado aminado de glioxilagarose-TLL, com ligações covalentes multipontuais, que contêm mais grupos lisinas e, conseqüentemente, mais grupos ligados covalentemente ao suporte. Essas conclusões estão indicadas na Figura 38.

Figura 38 – Atividade enzimática residual dos derivados diante de Dioxano a 4 °C (n = 3)



Fonte: Elaborada pelo autor.

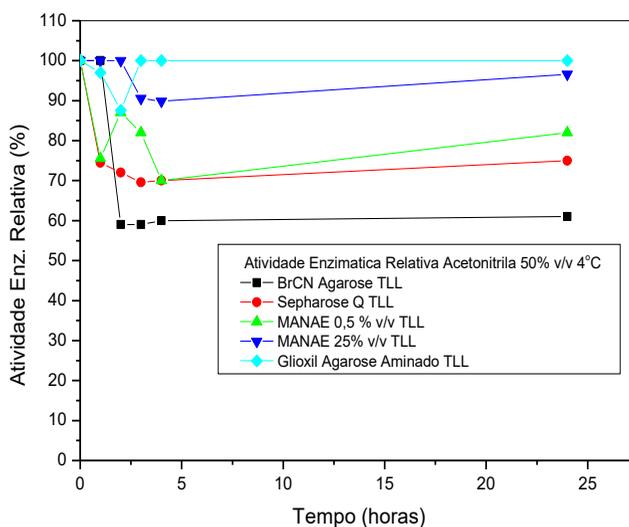
No experimento com o solvente acetonitrila P.A (Figura 39), que também possui uma polaridade muito baixa, observou-se um efeito semelhante ao constatado no estudo anterior. Houve uma grande diferença de resultados com o melhor rendimento do derivado MANAE glutal 25% -TLL para os três derivados de Glioxil-agarose aminado, MANAE glutal 0,5% -TLL, em relação ao experimento anterior com solvente dioxano. Esses derivados tiveram rendimentos diferentes pelo fato de eles reagirem em solvente apolar (acetonitrina), que é bem menos apolar que o 1,2-dioxano; assim, está explicado por que o efeito de solventes apolares favorece um bom rendimento em reações com lipases em meio orgânico, que tiveram rendimentos entre 90% e 100% em 24 horas de reação.

Para Sepharose Q -TLL houve um desempenho mais baixo de rendimento, devido ao fato o tipo de ligação desse derivado ser por

adsorção iônica, que é muito fraca, assim como sua estabilidade diante de termoestabilidade e solventes orgânicos, obtendo-se um rendimento muito ruim, em torno de 60% nas primeiras cinco horas de reação e decrescendo a 40% em 24 horas de reação.

Li et al. (2007) realizaram um estudo de revisão no qual relataram que a hidrofobicidade de solventes de hidrocarbonetos alifáticos favorecem a reação de transesterificação enzimática usando solventes com  $\log P > 3,0$ . No trabalho, também foi pesquisado o efeito de vários solventes apolares em reações de produção de biodiesel com as enzimas comerciais Novozym 435 e Lipozyme TL IM.

Figura 39 – Gráfico de atividade enzimática relativa de derivados em presença de acetronitrila à temperatura de 4 °C (n = 3)



Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.13 EXPERIMENTOS DE ESTABILIDADE DOS DERIVADOS COM ÁCIDO OLEICO EM SOLVENTE POLAR E APOLAR

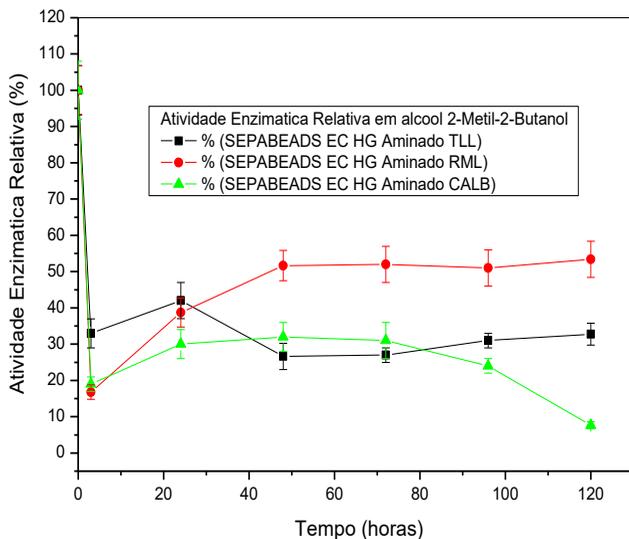
Relatam-se aqui os resultados da reação de estabilidade com o solvente 2-metil-2-butanol P.A, para os derivados Sepabeads EC, como se pode observar nas Figuras 40, 41 e 42.

Os resultados demonstraram que na presença do solvente polar, esses derivados tiveram uma estabilidade baixa, conforme se observou na medida dos valores abaixo de 60% de atividade enzimática relativa.

Para o derivado Duolite A 568, os resultados também foram semelhantes. Para o derivado Lewatit 1600-CALB, a atividade enzimática relativa apresentou resultados superiores a 80%. Esses resultados demonstraram que esses derivados tiveram um rendimento da atividade enzimática relativa em relação ao de 2-metil-2-butanol P.A., com valores todos abaixo de 50 % em relação aos derivados diante do solvente ciclohexano. Parece, nesse caso, pela forma como os derivados perdem atividade, que o efeito sobre o derivado Sepabeads (morfologia, composição química) ocorre por causa da presença desses solventes, e por isso houve resultados muito baixos de atividade enzimática.

O resultado da estabilidade com ácido oleico para o derivado Sepabeads EC-TLL, Sepabeads EC-RML e Sepabeads EC-CALB, com o solvente 2-metil-2-butanol à temperatura de 40 °C, foi muito baixo para os três derivados, pelo fato de o solvente 2-metil-2-butanol ter um caráter polar e, assim, explica-se o seu baixo desempenho. O resultado está ilustrado na Figura 40.

Figura 40 – Estabilidade da atividade enzimática relativa diante de 2-metil-2-butanol com os derivados Sepabeads EC-TLL, Sepabeads EC-RML e Sepabeads EC-CALB à temperatura de 40 °C (n = 3)

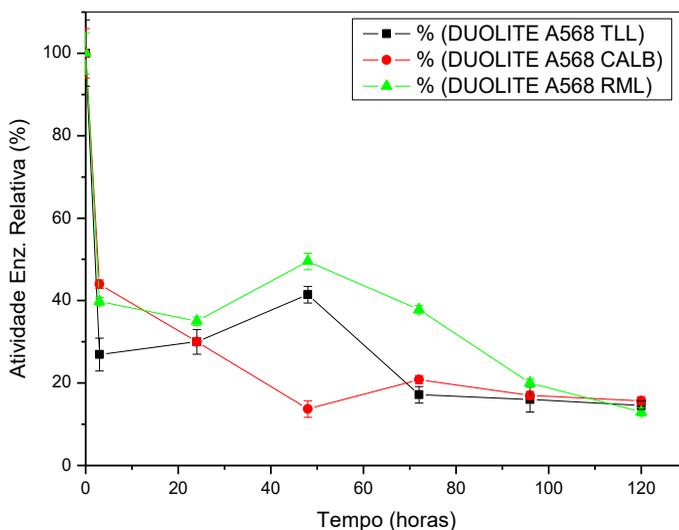


Fonte: Elaborada pelo autor.

A mesma explicação do baixo desempenho das estabilidades

aplica-se aos derivados Duolite A 568-TLL, Duolite A 568-RML e Duolite A 568-CALB, embora o suporte de Duolite A 568 seja de caráter hidrofóbico, diferentemente do suporte Sepabeads aminado, que possui ligações covalente multipontuais muito estáveis, mas o solvente em estudo influenciou pelo baixo desempenho, abaixo de 50 % de atividade enzimática relativa.

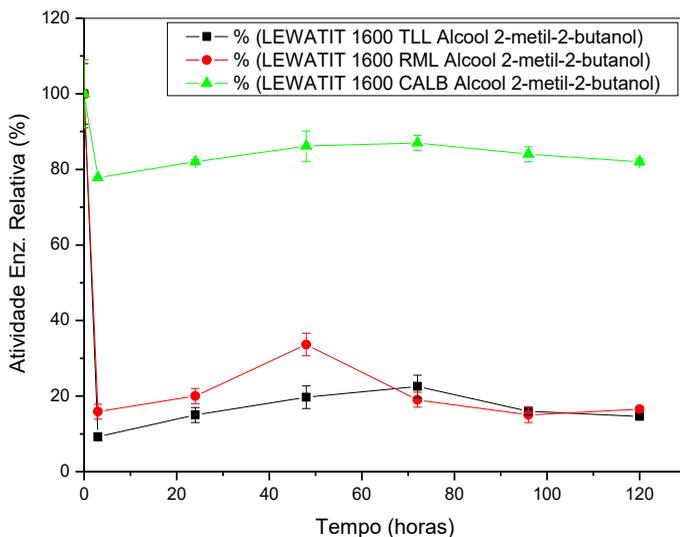
Figura 41 – Estabilidade da atividade enzimática relativa diante de 2-metil-2-butanol com os derivados Duolite A568-TLL, Duolite A568-RML e Duolite A568-CALB à temperatura de 40 °C (n = 3)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os derivados Lewatit-RML e Lewatit-TLL, houve resultados de estabilidade muito ruins, isto é, abaixo de 30% em 120 horas de reação, exceto para o derivado Lewatit-CALB, que apresentou um desempenho em torno de 80% em 120 horas de reação. O resultado do bom desempenho do derivado Lewatit-CALB, completamente diferente dos demais, deve-se ao fato de o suporte Lewatit 1600 ser bastante hidrofóbico e a enzima CALB possuir uma grande densidade de grupos lisinas em sua superfície. Esse fenômeno está ilustrado na Figura 42.

Figura 42 – Estabilidade da atividade enzimática relativa diante de 2-metil-2-butanol com os derivados Lewatit-TLL, Lewatit-RML e Lewatit-CALB à temperatura de 40 °C (n = 3)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Realizou-se o mesmo estudo com os mesmos derivados e também nas mesmas condições, com a diferença de que os derivados reagiram na presença de solvente ciclohexano P.A, à temperatura de 40 °C, que é um solvente de caráter muito apolar. Os resultados obtidos para os derivados Sepabeads EC HG-TLL, RML e CALB demonstraram uma grande estabilidade desses derivados em relação aos derivados preparados por adsorção iônica e por ligação covalente multipontual, na presença de solvente 2-metil-2-butanol (Lewatit VP OC1600, Duolite A568 e Sepabeads EC HG).

A explicação para esse fato pode ser que isso ocorra pela melhor interação das lipases em reações que tenham solventes apolares e, por isso, esses derivados tiveram os melhores rendimentos. Segundo a literatura, com o aumento do coeficiente de partição (*Log P*), essas reações são mais estáveis e apresentam melhores rendimentos devido à baixa polaridade no meio reacional. Esses efeitos foram estudados por ZAKS e RUSSEL (1988), KLIBANOV (1989) LI et al. (2007). Demonstram-se esses resultados nas Figuras 40 a 44. KAREL et al. (2011) e MENDES et al. (2011) pesquisaram a estabilidade de Sepabeads EC com enzimas CALB, TLL e PFL e obtiveram uma grande

termoestabilidade com esse derivado, conforme ilustrado nas figuras 43 a 45.

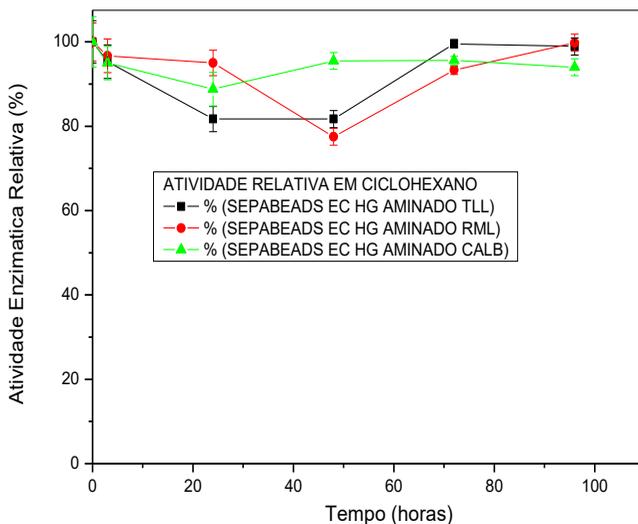
Realizou-se, neste trabalho, a imobilização com Sepabeads EC-TLL de modo multipontual, e esse processo envolveu a ligação covalente sobre suportes preexistentes altamente ativados com resíduos presentes na superfície da enzima, promovendo uma regidificação na estrutura da enzima quando imobilizada (GUISÁN, 1988; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2008).

A ligação covalente de enzima em suportes sólidos preexistentes é uma das estratégias mais utilizadas por causa, principalmente, das seguintes propriedades conferidas aos derivados enzimáticos obtidos por este sistema (VOLPATO, 2009; KLIBANOV, 1989):

- a) Caráter covalente, portanto a estabilidade da ligação.
- b) Estabilidade adicional que se pode obter quando a interação for multipontual, levando a uma maior resistência à desativação, a efeitos de temperatura, solventes orgânicos ou pH.
- c) Fácil manipulação do derivado, e com isso a possível modificação das propriedades químicas ou catalíticas.
- d) Os derivados podem ser utilizados em reatores contínuos, empacotados, de leito fluidizado ou tanque agitado.

O resultado para a estabilidade enzimática relativa para os três derivados de Sepabeads nas condições de reação com ciclohexano 10% e à temperatura de 40 °C foram acima de 80 % em 90 horas de reação. Os resultados demonstraram uma grande estabilidade desses derivados em presença do solvente ciclohexano e também uma grande estabilidade térmica. Esse desempenho mostra o quanto esses derivados de Sepabeads apresentam uma boa estabilidade em meio orgânico por possuírem ligações covalentes multipontuais e também uma alta rigidez na ligação. Esses derivados foram aaminados e assim possuem uma grande densidade de grupos aminos em sua superfície. A Figura 43 ilustra esse comportamento.

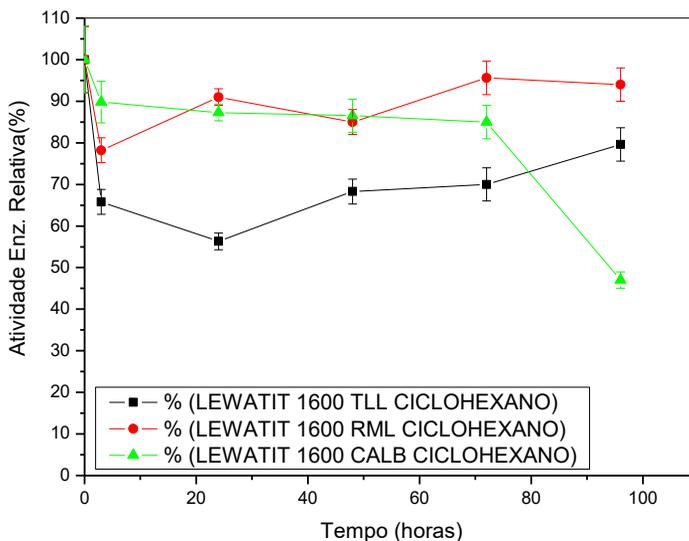
Figura 43 – Estabilidade da atividade enzimática relativa diante de ciclohexano com os derivados Sepabeads EC-TLL, Sepabeads EC RML e Sepabeads EC-CALB à temperatura de 40 °C (n = 3)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados para os derivados Lewatit VOP 1600-CALB, Lewatit VOP 1600-TLL e Lewatit VOP 1600-RML mostram que houve um melhor desempenho para Lewatit VOP 1600-RML, em torno de 90% nas primeiras 60 horas de reação, aumentando para 95% de atividade enzimática relativa em 90h de reação. Para o derivado Lewatit VOP 1600-CALB, a atividade enzimática relativa chegou a 85% em 70 horas de reação, caindo depois para os 50%. A explicação para o bom desempenho desses derivados está no fato de a reação ser em meio orgânico, que o ciclohexano torna propício à reação e também ao favorecimento da termoestabilidade das lipases em meio orgânico. A Figura 44 ilustra esse comportamento.

Figura 44 – Estabilidade enzimática relativa diante de ciclohexano com os derivados Lewatit-TLL, Lewatit-RML e Lewatit-CALB à temperatura de 40 °C (n = 3)

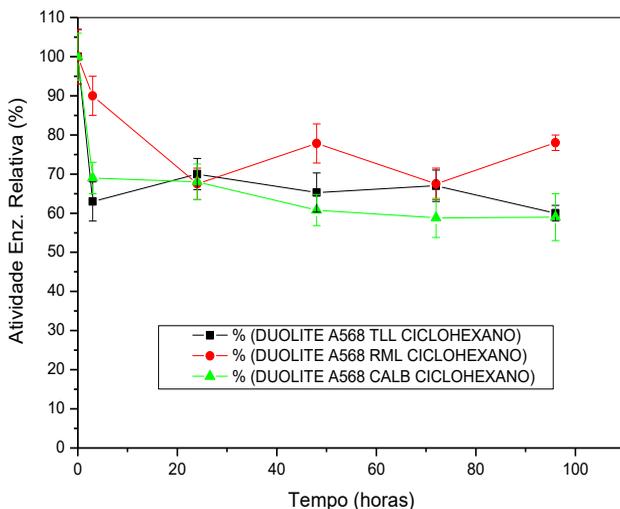


Fonte: Elaborada pelo autor.

Os três derivados, Duolite A568-RML, Duolite A568-TLL e Duolite A568-CALB tiveram um desempenho um pouco irregular, com atividade enzimática relativa em torno de 70 a 80 % em 90 horas de reação (Figura 45).

Com isso conclui-se que, de todos os derivados investigados, o melhor comportamento foi o dos três derivados, Sepabeads-TLL, Sepabeads-RML e Sepabeads-CALB, por serem de ligação covalente multipontual, o que confere uma alta estabilidade a solventes orgânicos (ciclohexano) e uma alta estabilidade térmica.

Figura 45 – Estabilidade da atividade enzimática relativa diante de ciclohexano com os derivados Duolite A568-TLL, Duolite A568- RML e Duolite A568- CALB à temperatura de 40 °C (n = 3)

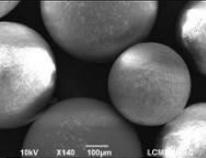
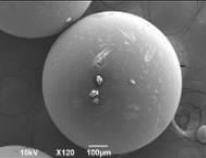
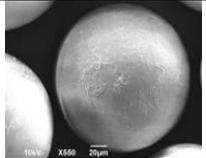
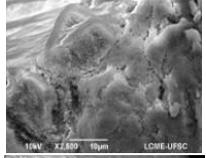
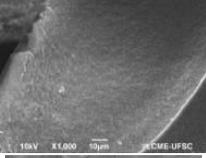
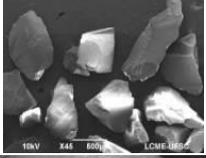
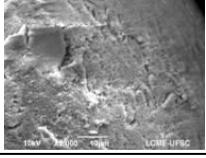
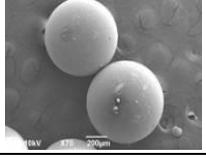
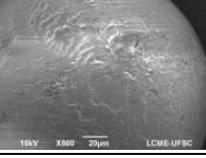


Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.14 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES COM OS DERIVADOS PREPARADOS E UTILIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Realizaram-se as análises de imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos derivados estudados, e a Tabela 10 mostra os suportes imobilizados com três lipases e imobilizadas de forma iônica, adsorção hidrofóbica e por ligações covalentes. Essas imagens mostram a superfície desses derivados com a modificação após o processo de imobilização.

Tabela 10 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos derivados imobilizados

Suportes para imobilização	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)		
	CALB B	TLL	RML
Lewatit VP OC 1600 Adsorção hidrofóbica			
Duolite A568 Adsorção iônica			
Sepabeads EC HG Covalente multipontual			

Fonte: Elaborada pelo autor

A seguir apresentam-se os resultados de rendimento da produção de biodiesel com os três derivados preparados nas razões molares de 6:1 (Etanol absoluto / óleo de girassol) e 9:1 (Etanol absoluto/ óleo de girassol) em ciclohexano 10% na temperatura de 45 °C. A finalidade foi avaliar o desempenho desses derivados em duas razões molares distintas.

Os resultados de uma maneira geral demonstraram que os derivados enzimáticos imobilizados por adsorção iônica, na reação com razão molar de RM 6:1 em presença de ciclohexano, tiveram mais estabilidade. Os resultados de produção de ésteres com derivados com Lewatit VP OC1600 e Duolite A 568 tiveram valores de rendimentos de ésteres muito maiores com razões molares de 6:1 (etanol absoluto/óleo de girassol) com 10% de cossolvente ciclohexano, à temperatura de 45 °C, como é demonstrado pelas figuras 48 a 52.

Para a reação com os três derivados, de Duolite A 568-CALB, Duolite A 568-RML e Duolite A 568 -TLL, o melhor rendimento foi para o derivado Duolite A 568-TLL, que teve rendimento de ésteres até 100 horas de reação de 90%, caindo para cerca de 35% em 225 horas de

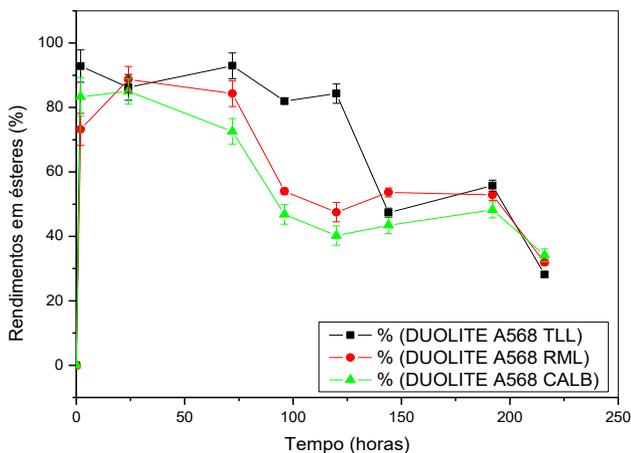
reação, seguido do derivado Duolite A 568-RML, que teve rendimento de 85% em 125 horas de reação.

O derivado Duolite A 568-CALB teve rendimento de 85% em 25 horas de reação, diminuindo a 75% em 75 horas de reação, e finalmente caindo para 50% em 200 horas. O suporte Duolite A 568 é uma resina iônica com alto grau de adoração (adsorção hidrofóbica).

Todos os três derivados tiveram rendimentos superiores a 80% em 75 horas de reação, sendo o derivado Duolite A568-TLL o mais estável em até 125 horas de reação, alcançando 85% de rendimento.

O resultado mostra que o mesmo efeito de estabilidade aconteceu para os três derivados de Duolite A568 sendo mais estável nessas condições em até 75 horas de reação, e depois o rendimento decresce para todos os derivados, talvez pela razão molar de 9:1, em que há um excesso de etanol na reação de obtenção de biodiesel. Esta conclusão está ilustrada na Figura 46.

Figura 46 – Reação com derivados Duolite A568-TLL, Duolite A568-RM e Duolite A568-CALB com clolohexano a 10% e razão molar 9:1 a 45 °C (óleo de girassol/etanol absoluto) (n = 3)

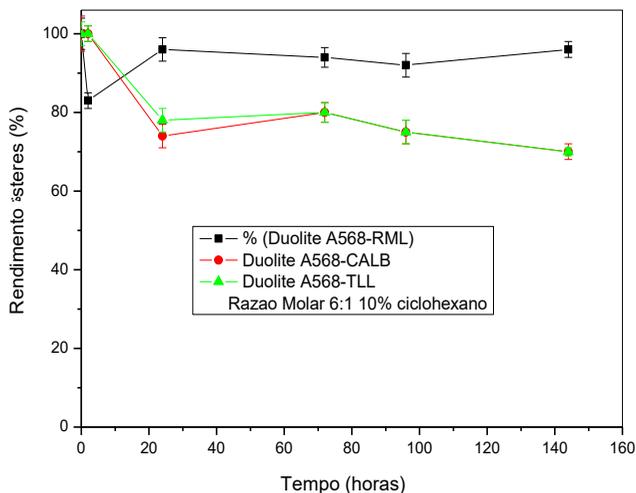


Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os mesmos três derivados, mas com a condição de razão molar de 6:1, os rendimentos foram mais estáveis. O derivado Duolite A568-TLL teve rendimento de cerca de 95% até 150 horas de reação. Os derivados Duolite A568-TLL e Duolite A568-CALB tiveram o mesmo comportamento de rendimento de cerca de 80% até 75 horas de reação.

A explicação para a grande estabilidade desses derivados nessa condição está no fato da diminuição da razão molar, que foi de 6:1 (etanol absoluto / óleo de girassol). Esta conclusão está ilustrada na Figura 47.

Figura 47 – Reação dos derivados Duolite A568-TLL, Duolite A568-RM e Duolite A568-CALB com ciclohexano a 10% e razão molar 6:1: óleo de girassol/etanol absoluto à temperatura de 45 °C (n = 3)

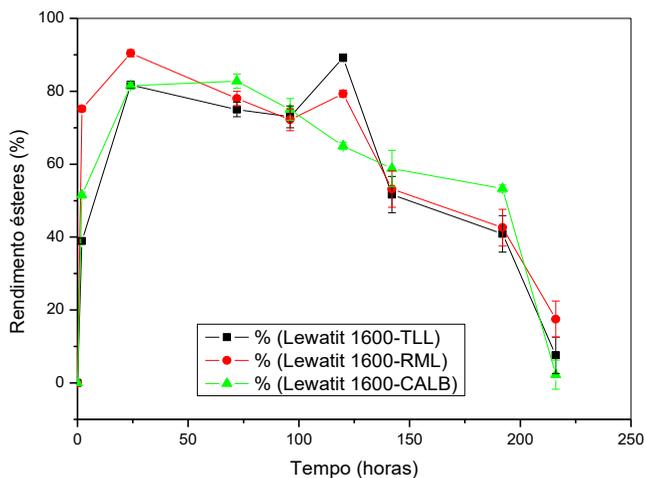


Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os derivados Lewatit-TLL, Lewatit-CALB e Lewatit-RML, é possível notar que, à medida que se diminuiu a razão molar (etanol absoluto/óleo de girassol), o rendimento na produção dos respectivos ésteres aumentou de maneira quase geral com todos os derivados testados; e quando essa razão subiu para 9:1, os rendimentos, que estavam entre 80% e 90% em 120 horas de reação, caíram igualmente em quase todos os derivados estudados (Figura 48).

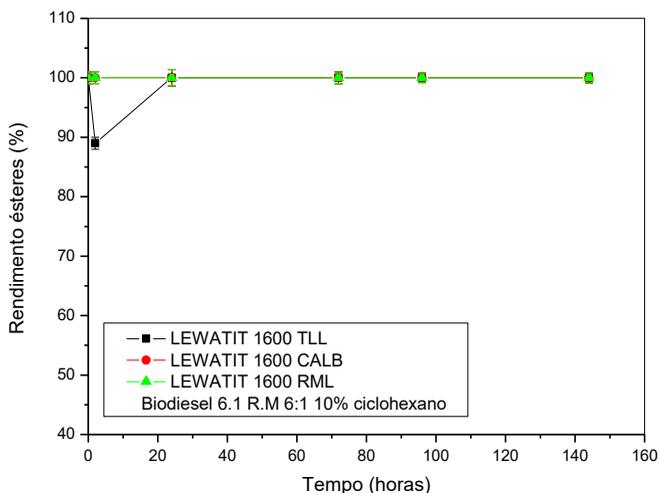
Os resultados com Lewatit 1600 com razão molar de RM 6:1 indicaram melhores valores de conversão de biodiesel, como se demonstra na Figura 49.

Figura 48 – Lewatit-TLL, Lewatit-RML e Lewatit-CALB ciclohexano a 10% e razão molar 9:1: (óleo de girassol/etanol absoluto) na síntese de ésteres à temperatura de 45 °C (n = 3)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 49 – Reação dos derivados Lewatit-TLL, Lewatit-RM e Lewatit-CALB diante de ciclohexano a 10% e razão molar 6:1 em óleo de girassol/etanol absoluto à temperatura de 45 °C (n = 3)



Fonte: Elaborada pelo autor.

A produção de ésteres com derivados com Lewatit VP OC1600 e Duolite A 568 tiveram resultados bem próximos de 100% e maiores rendimentos nas razões molares de 6:1 (etanol absoluto/óleo de girassol) com 10% de cossolvente ciclohexano (Figura 51).

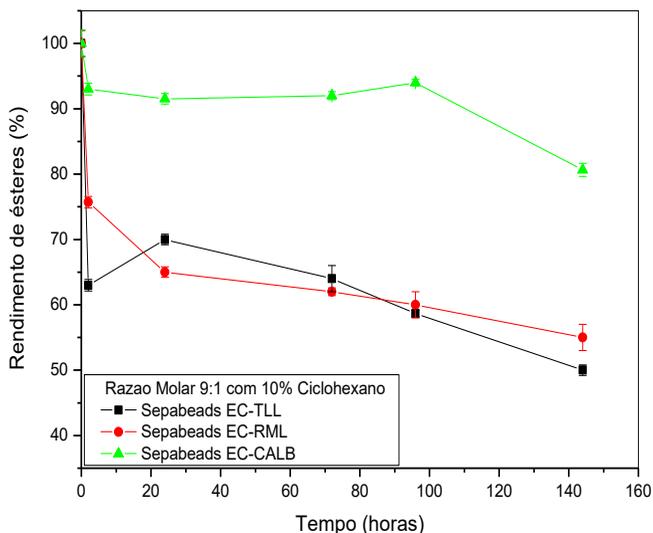
O melhor resultado para os derivados estudados ocorreu com Lewatit VP OC1600 com as três enzimas imobilizadas (Figura 49). Observa-se que até 150 minutos, de uma forma quase generalizada, conseguiram-se rendimentos muito próximos a 100%.

A explicação está no fato de a natureza da resina Lewatit VP OC 1600 ser de natureza muito hidrofóbica e possuir uma grande capacidade de adsorção em seus poros, isto é, ter uma grande área superficial, aliado à presença de um solvente muito apolar, favorecendo o rendimento de 100% em 150 horas de reação.

O melhor resultado obtido para estes três derivados foi o de Sepabeads EC-CALB, porque a enzima CALB possui uma boa densidade de grupos lisinas na sua superfície e, conseqüentemente, pode se ligar melhor com o suporte, possuindo uma maior quantidade de sítios catalíticos nesse derivado, e também pelo fato de a natureza da ligação covalente multipontual ser muito estável, na presença de solvente muito apolar (ciclohexano). Houve uma estabilidade adicional que se pode obter quando a interação for multipontual, levando a uma maior resistência à desativação, a efeitos de temperatura, solventes orgânicos ou pH e, conseqüentemente, a reação da obtenção de biodiesel teve um rendimento de cerca de 95 % em 100 horas de reação com o derivado Sepabeads EC-CALB.

Houve rendimentos bem inferiores para os demais derivados com Sepabeads TLL, que teve rendimento de 70% até 30 horas de reação, diminuindo depois até chegar aos 50% no final de 140 horas e de 65% de rendimento para Sepabeads RML no mesmo tempo de reação. A explicação para este resultado é que essas enzimas são muito diferentes em sua constituição molecular, possuindo densidades de lisinas muito diferentes e também pelo fato de a reação possuir uma razão molar de 9:1, tendo um excesso de etanol que talvez afetasse o rendimento da reação. Os resultados estão reportados na Figura 50.

Figura 50 – Reação de Sepabeads-TLL, Sepabeads EC-RML e Sepabeads-CALB com clolohexano a 10% e razão molar 9:1: (óleo de girassol/etanol absoluto) à temperatura de 45 °C (n = 3)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Num estudo realizado sobre imobilização, KAREL et al. (2011) e MENDES et al. (2011) pesquisaram a estabilidade de Sepabeads EC com CALB, TLL e PFL e obtiveram uma grande termoestabilidade nesses derivados. RODRIGUEZ-LAFUENTE et al. (2010) estudaram a etanólise de óleo de soja com Lipozyme TL IM comercial e o derivado de Lewatit-TLL imobilizado para a produção de biodiesel. Eles compararam a reação desses derivados com a reação de etanólise e obtiveram resultados de conversão com Lewatit-TLL de 100% em presença de n-hexano e, na ausência desse solvente, obtendo-se uma conversão de 75%, o que demonstrou a enorme influência que têm os diferentes solventes nas conversões de rendimentos das reações de síntese de biodiesel.

## 5 CONCLUSÃO

Esta tese procurou demonstrar o enorme potencial das enzimas imobilizadas e o papel muito importante que elas desempenham nos processos industriais, usando a biocatálise para obtenção de produtos de alto valor comercial agregado na indústria química e farmacêutica.

As metodologias de imobilização que foram utilizadas de forma geral neste trabalho foram eficientes e os objetivos foram alcançados.

Os resultados de imobilizações covalentes nas esferas de nanocelulose bacteriana mostraram que são ótimos suportes porque possuem grupamentos (-OH) e são fáceis de funcionalizá-las em meio básico com ligações covalentes muito fortes com agentes funcionalizantes, como carbodiimida (EDC) ou glutaraldeído.

De uma maneira geral, para imobilizar todas as lipases deve-se usar suportes por interação hidrofóbica, e esse feito permite realizar modificações no nível da superfície da enzima, que pode ser uma pequena modificação química, facilitando assim a introdução de mais grupamentos aminos na superfície destas, o que, *a posteriori*, será importante para aumentar a interação entre esses grupamentos (aminos) introduzidos com os grupamentos aldeídos do suporte, durante a imobilização covalente multipontual. Com esses mecanismos, conseguem-se derivados imobilizados com níveis de estabilização muito elevados, não somente termicamente falando, mas também perante solventes orgânicos, ideais para reações em que os substratos necessitem de concentrações crescentes de solventes para melhorar a distribuição síntese/hidrólise e, conseqüentemente, a distribuição substrato/produto.

Os estudos de imobilização de lipases comerciais da Novozymes®, como Palatase (RML), Lipolase (TLL) e CALB, em vários tipos de suportes por adsorção iônica, hidrofóbica e/ou covalente tiveram resultados promissores e demonstraram viabilidade do seu uso em reações com solventes e sem solventes orgânicos.

Quanto a produção de biodiesel em sistema de batelada utilizando os biocatalisadores (derivados) que foram imobilizados em diversos suportes, os resultados foram os melhores para biocatalisadores de natureza que continham ligações covalentes multipontuais, com ligações covalentes muito fortes, e o melhor resultado foi para o biocatalisador Sepabeads EC-CALB em ciclohexano 10% solvente de natureza apolar com razão molar de 9:1 (Etanol absoluto:óleo de girassol), à temperatura de 45 °C.

E para biocatalisadores de natureza hidrofóbica, imobilização por adsorção; Lewatit-TLL, Lewatit-RM e Lewatit-CALB com solvente ciclohexano 10% de caráter mais apolar na razão molar de 6:1 (Etanol absoluto: óleo de girassol) à temperatura de 45 °C.

## 5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao estudo realizado, recomendamos as seguintes sugestões:

- Pesquisar mais o processo de imobilização de enzimas, na busca de suportes que não tenham problemas de colmatção de seus poros quando se trabalha com substratos com grandes densidades e com viscosidade elevada, e o aumento da vida média dos respectivos catalisadores, estocagem, etc.
- Pesquisar com mais profundidade a reação de etanólise de óleo de girassol em biorreator de leito fixo, variando o tempo de residência do substrato; estudar várias razões molares, o uso de reciclo no biorreator com os catalisadores enzimáticos adequados.
- Estudar a reação de etanólise de maneira geral com variadas temperaturas.
- Fazer uma pré-reação de esterificação do óleo vegetal e usar o produto para a etanólise em biorreator de leito fixo; pesquisar outro tipo de reator e buscar alternativas para fazer com que a concentração de glicerina produzida não seja o fator limitante da reação.

## REFERÊNCIAS

AARTHY, M.; SARAVANAN, P.; GOWTHAMAN, K. M.; ROSE, C.; KAMINI, R. M. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: an overview. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 92, n. 8, p.1591-1601, 2014.

ACOSTA, A. et al. Kinetically controlled synthesis of monoglycerol esters from chiral and prochiral acids methyl esters catalyzed by immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 507-512, 2011.

ADLERCREUTZ, P. Biocatalysis in non-conventional media. In: STRAATHOF, A. J. J.; ADLERCREUTZ, P. (Ed.). *Biocatalysis*. Newark: Harwood Academic Publishers, 2000. p. 295-316.

ADLERCREUTZ, P. R.; BARROS; WEHTJE, E. Immobilization of enzymes for use in organic media. *Annals NY Accad. Sci.*, v. 795, p. 197-200, 1996.

ALMEIDA, João R. M.; FÁVARO, Léia C. L.; QUIRINO, Betania F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5, n. 48, p. 1-16, 2012.

ANTCZAK, MIROSLAWA SZCZESNA et al. Enzymatic biodiesel synthesis-Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, n. 34, p. 1185-1194, 2009.

ARAGON, C. C. et al. Production of xylo-oligosaccharides by immobilized-stabilized derivatives of endo-xyylanase from *Streptomyces halstedii*. *Process Biochemistry*, v. 48, p. 478-483, 2013.

ARAÚJO, J. C. **Caracterização e evolução do biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético**. 1995. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

ASHBY, Richard D. et al. Glycerine and levulinic acid: renewable co-substrates for the fermentative synthesis of short-chain poly (hydroxyalkanoate) biopolymers. *Bioresource Technology*, v. 118, p. 272-280, aug. 2012.

BARBOSA, O. et al. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. *Process Biochemistry*, v.47, p. 1220-1227, 2012.

BARBOSA, O. et al. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Biotechnology Advances*, v.33, p.435-456, 2015.

BENASSI, M. V. et al. Immobilization and biochemical properties of a  $\alpha$ -xylosidase activated by glucose/xylose from *Aspergillus niger* USP-67 with transxylosylation activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 89, p. 93-101, 2013.

BERNAL, C. et al. Immobilisation and stabilisation of b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* using a glyoxyl support. *International Dairy Journal*, v. 28, p. 76-82, 2013.

BOLIVAR, M. J. et al. Heretofuntional supports for the one step purification, immobilization and stabilization of large multimeric enzymes: Amino Gyoxy Versus Amino -Epoxy Supports. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1692-1698, 2010.

BOLIVAR, M. J. et al. Stabilization of a highly active but unstable alcohol dehydrogenase from yeast using immobilization and post-immobilization techniques. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 679-686, 2012.

BORNSCHEUER, UWE T. Industrial Biotransformations. *Biotechnology Set*, p.275-294, 10 maio 2001. Wiley-Blackwell.DOI: 10.1002/9783527620999.ch6i.

BRADFORD, MARION M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Biocatalizadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 36, 2006.

CAO, LINQIU; LANGEN, LUUK VAN; SHELDON, R. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 387-394, aug. 2003.

CHATZIFRAGKOU, Afroditi et al. Biorefinery development through utilization of biodiesel industry by-products as sole fermentation feedstock for 1,3 propanediol production. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 167-175, may 2014.

CHIOU, SHAO-HUA, WU, WEN-TENG. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v. 25, n. 2, p. 197-204, jan. 2004.

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

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

CRUZ JÚNIOR, Américo. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B em Quitosana para Obtenção de Biodiesel por Transesterificação do Óleo de Mamona**. 2007. 109 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Centro Tecnológico, UFSC, Florianópolis, 2007.

DINÇER, A.; BECERIK, S; AYDEMIR, T. Immobilization of tyrosinase on chitosan–clay composite beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 815-820, 2012.

DORDICK, Jonathan S. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v.11,n.4, p.194-21,1989.

DORS, G. **Etanolise enzimática do óleo de palma visando à produção de biodiesel em sistema contínuo**. 2011. 233 f. Tese (Doutorado Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Centro Tecnológico, UFSC, Florianópolis, 2011.

ESA, FAESAH; TASIRIN, M.S; RAHMAN, A.N. overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, v. 2 , p. 113 – 119, 2014.

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal Of Molecular Catalysis B: enzymatic*, n. 62, p. 197-212, 2010.

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent submit dissociation. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 45 p. 405-418, 2009.

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal Of Molecular Catalysis B: enzymatic*, n. 62, p. 197-212, 2010.

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent submit dissociation. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 45, p. 405-418, 2009.

FUKUDA, H, et al. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends in Biotechnology*, v.26,n.12,p.668-673,2008.

FUKUDA, H, et al. Biodiesel fuel production by transesterification of oil. *J. Biosci. Bioeng*, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.

FUKUDA, Hideki, et al. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, n. 1, p.2-12, 2009.

GOY, R. C.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. P. Produção de esferas de quitosana. *Revista Brasileira de Biotecnologia*, São Paulo, v. 33, p. 30-34, 2004.

GUISÁN, J. M. Immobilization of Enzymes and Cells. In: GUI SÁN, J. M. G. (Ed.). **Second Edition**. *Serie Methods in Biotechnol 22. The Humana Press Inc*. Totowa, New Jersey, 2006.

GUISÁN, José M. Dehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, n.6, p. 375-382, jun. 1988.

GULDHE, A.; SINGH, B.; MUTANDA, T.; PERMAUL, K.; BUX, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: novel and sustainable approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 41, p. 1447-1464, 2015.

HAMA, Shinji et al. Lipase Localization in *Rhizopus oryzae* Cells Immobilized. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, n. 4, p. 328-333, 2006.

HAMA, Shinji et al. Process engineering and optimization of glycerol separation in a packed-bed reactor for enzymatic biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 02,n.22, p.10419-10424,2011.

HUNG, T. et al. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 26, p. 69-78, 2003.

HU, WEI LI; CHEN, SHIYAN; YANG, Jingxuan; LI, Zhe; WANG, Huaping. Review: functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, v.101, p. 1043-1060, 2014.

HSU, A. F., et al. Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 36, p. 181–186, 2002a.

HSU, A.F. et al. Transesterification activity of lipases immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix. *Biotechnol. lett.*, v. 26, p. 917–921, 2004b.

ILLANES, A. **Enzymes biocatalysis, principles and applications.** Dordrecht: Springer Science Business Media B.V., 2008. 391 p.

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

KAPOOR, Manali; GUPTA, Munishwar Nath. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, v.47, n.4, p.555-569, apr. 2012.

KATCHALSKI-KATZIR, Ephraim; KRAEMER, Dieter M. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 10, p. 157-176, 2000.

KATOH, Shigeo; YOSHIDA, Fumitake. *Biochemical Engineering*: a textbook for engineers, chemists and biologists. Weinheim: Wiley-vch, 2009. 285 p.

KILDEEVA, N. R. et al. About mechanism of Chitosan Cross-linking with Glutaraldehyde. *Russian Journal Bioorganic Chemistry*, n. 35, p. 360, 2009.

KLIBANOV, Alexander M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends in Biochemical Sciences*, v.14,n.4, p.141-144,1989.

KLIBANOV, Alexander M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in Biotechnology*, v. 15, n. 3, p. 97-101, mar. 1997.

KNOTHE, G. Oxidative stability of biodiesel. In: KNOTHE, G.; KRAHL, J.; VAN GERPEN, J. (Ed.). *The biodiesel handbook*. G. Champaign: AOCS Press, 2005b, p. 122-126.

KNOTHE, G. et al.(Ed.). *The biodiesel handbook*. Champaign: AOCS Press, 2005.

KOUTINAS, Apostolis A. et al. Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*, v.116,p.566-577,2014.  
LI, Wei; DU, Wei; DEHUA, Liu. *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell catalyzed methanolysis of crude and acidified rapeseed oils for biodiesel production in tert-butanol system. *Process Biochemistry*, n. 42, p. 1481-1485, 2007.

LIMA, F. A. et al. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized  $\alpha$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. *Process Biochemistry*, v. 48, p. 443-452, 2013.

LIN, Ning; DUFRESNE, Alain. Nanocellulose in biomedicine: current status and future prospect. *European Polymer Journal*, v. 59, p. 302-325, 2014.

LIU, Yu-Peng et al. Efficient production of dihydroxyacetone from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Gluconobacter frateurii*. *Bioresource Technology*, v.142, p.384-389, 2013.

LÓPEZ-GALLEGO, Fernando et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *Journal of Biotechnology*, n. 116, p. 1-10, 2005.

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. *Biociência e Desenvolvimento*, n. 32, p. 38-46, 2004.

MARTINS, B. A. et al. Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene-divinylbenzene beads. *Bioresource Technology*, v. 134, p. 417-422, 2013.

MATEO, C. et al. Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 274-280, 2006.

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

MATEO, C. et al. Review: improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 40, p. 1451-1463, 2007b.

MATEO, C. et al. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 456-462, 2005.

MENDES, Adriano Aguiar. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009. 225 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Paulo, 2009.

MIRANDA, Michele. Assessment of the morphological, biochemical, and kinetic properties for *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Hydrous Niobium Oxide to be used in the biodiesel synthesis. *Enzyme Research*, v. 2011, 2011.

MITTLELBACH, M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 67, p. 168-170, 1990.

MOHAMMADKAZEMI, FARANAK; AZIN, MEHRDAD; ASHARI, ALIREZA. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydrate Polymers*, v.117, p.518-523, 2015.

NASRATUN, M. et al. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Chitosan Beads for Transesterification Reaction. *American Journal of Applied Sciences*, v. 9, n. 6, p. 1653-1657, 2009.

NELSON, L. A.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 73, p. 1191-1211, 1996.

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

NUNES, L. L. et al. Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent attachment. *Process Biochemistry*, v. 48, p. 118-123, 2013.

OLIVEIRA, D. M. et al. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. *Appl. Biochem. Biotechnol*, v. 113, n. 116, p. 771-780, 2004.

PÁEZ, B. CAMACHO. et al. Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, n. 6, p. 845-853, nov. 2003.

PALOMO, J. M. et al. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase interactions. *J. Chromatography A.*, v. 1038, p. 267-273, 2004.

PANDEI, A. **Handbook of plant-based biofuels**. Boca Raton: CRC Press, 2009.

PAPANIKOLAOU, Seraphim et al. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1, 3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 1, p. 60-71, jan. 2008.

PEDERSEN, S.; CHRISTENSEN, M. W. Immobilized biocatalysts. Applied biocatalysis. In: STRAATHOF, A. J. J.; ADLERCREUTZ, P. (Ed.). **Applied biocatalysis**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000. p. 213-228.

PEREIRA, Daniela Gerevini; KILIKIAN, Beatriz Vahan. Effect of yeast extract on growth kinetics of *monascus purpureus* symposium. In: SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS ABAB, 22., 2000. Glatinburg. **Abstracts...** Glatinburg: New Jersey: Humana Press, 2001, p. 311-316.

PIZARRO, C. et al. Influence of different immobilization techniques for *Candida cylindracea* lipase on its stability and fish oil hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 111-118, 2012.

POPPE, A. K. et al. Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 94, p. 51-56, 2013.

POPPE, A. K. et al. Research review paper: enzymatic reactors for biodiesel synthesis: present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 511-525, 2015.

POSPISKOVA, K.; SAFARIK, I. Low-cost, easy-to-prepare magnetic chitosan microparticles for enzymes immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p. 545-548, 2013.

QIN, He et al. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, n. 1, p. 41-46, 2008.

REETZ, M. T. Entrapment of biocatalysts in hydrophobic sol-gel materials for use in organic chemistry. **Adv. Mater**, v. 9, p. 943-953, 1997.

RIVALDI, Juan Daniel et al. Metabolism of biodiesel-derived glycerol in probiotic *Lactobacillus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 97, p. 1735-1743, 2013.

ROBLES-MEDINA, A. et al. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production: *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 398-408, 2009.

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

RODRIGUES, D. S. et al. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, n. 51, p. 100-109, 2008.

RODRIGUES, R.; RODRIGUES, C. Two step ethanolysis: a simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalysed by an immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochemistry*, n. 45, p. 1268-1273, 2010.

RODRIGUEZ, Rafael, C. Positive effects of multipoint covalent immobilization in the reactivation of partially inactivated derivatives of lipase from *thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 44, p. 386-393, 2010.

ROMERO, O. et al. Reactivation of penicillin acylase biocatalysts: effect of the intensity of enzyme-support attachment and enzyme load. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 74, p. 224-229, 2012.

ROSSET, Isac G. Enzymatic esterification of oleic acid with aliphatic alcohols for the biodiesel production by *Candida antarctica* Lipase. *Catal Lett*, v. 143, p. 863-872, 2013.

ROSSET, Isac G. **Produção de biodiesel empregando biocatálise via reações de esterificação e transesterificação.** Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

RUIZ, M. et al. Solid-phase modification with succinic polyethyleneglycol of aminated lipase B from *Candida antarctica*: effect of the immobilization protocol on enzyme catalytic properties. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 512-523, 2013.

RYWINSKA, Anita et al. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. **Biomass and Bioenergy**, v. 48, p. 148-166, 2013.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 2004.

SALIS, A. et al. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **J. Biotechnol**, v. 119, p. 291-299, 2005a.

SALIS, A. et al. Commercial lipase immobilization on Accurel MP1004 porous polypropylene. **Biocatal. Biotransf**, v. 23, p. 381-386, 2005b.

SALIS, A. et al. Characterisation of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilisation. **J. Mol. Catal. B: Enzym**, v. 24, n. 25, p. 75-82, 2003c.

SALIS, A. et al. The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1646, p. 145-151, 2003d.

SALIS, A.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Enzymes for biocatalysis in non aqueous media. Biocatalysis: Chemistry and Biology. A. Trincone. **Kerala, Research Signpost**, p.29-53, 2005.

SAMUKAWA, T. et al. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuelproduction from plant oil. **J. Biosci. Bioeng**, v. 90, p. 180-183, 2000.

SELMİ, B.; THOMAS, D. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent free medium. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 75, p. 691-695, 1998.

SEO, D-J. et al. Immobilization of chitinases from *Streptomyces griseus* and *Paenibacillus illinoisensis* on chitosan beads. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 391-394, 2012.

SEONG, Pil-Je et al. Enzymatic coproduction of biodiesel and glycerol carbonate from soybean oil and dimethyl carbonate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 6-7, p. 505-509, may. 2011.

SÉVERAC, Etienne et al. Election of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 48, n. 1, 5, p. 61-70, jan. 2011.

SÉVERAC, Etienne et al. Continuous lipase-catalyzed production of esters from crude high-oleic sunflower oil. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 8, p. 4954-4961, apr. 2011.

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Enzymatic transesterification for biodiesel productionn. *Indian J. Biochem. Biophys*, v. 40, p. 392-399, 2003.

SHENG-CHI, Wu,; YING-KE, Lia. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 54, p. 103-108, 2008.

SHIEH, C. J.; LIAO, H. F. LEE, C. C. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. *Biores. Technol*, v. 88, p. 103-106, 2003.

SHIMADA, Y. et al. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 76, p. 789-793, 1999.

SHIMADA, Y. et al. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, v. 17, p. 133-142, 2002.

SHIMADA, Y. et al. Enzymatic enrichment of arachidonic acid from *Mortierella* single-cell oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 75, n. 12, 1998.

SHU, Qing et al. Synthesis of biodiesel from cottonseed oil and methanol using a carbon-based solid acid catalyst. *Fuel Processing Technology*, v. 90, n. 7-8, p. 1002-1008, 2009.

SILVA, A.J. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal*, v. 60, p. 16-24, 2012.

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

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

TAN, Tianwei et al. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. *Biotechnology Advances*, n. 28, p. 628-634, 2010.

TARIQ, Muhammad; ALI,Saqib; KHALID, Nasir. Activity of homogeneous and heterogeneous catalysts, spectroscopic and chromatographic characterization of biodiesel: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 6303-6316, 2012.

TEIXEIRA, Camilo Barroso; MADEIRA JÚNIOR, José Valdo; MACEDO, Gabriela Alves. Biocatalysis combined with physical Technologies for development of a green biodiesel process. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 33, p. 333-343, 2014.

TEO, Chee Loong et al. Biodiesel production via lipase catalysed transesterification of microalgae lipids from *Tetraselmis sp.* *Renewable Energy*, v. 68, p. 1-5, 2014.

TING , W. J. et al. Appication of binary immobilized *Candida rugosa* a lipase for hydrolysis of soybean oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, n. 42, p. 32-38, 2006.

TING, Wei-Jia. et al. An enzymatic/acid-catalyzed hybrid process for biodiesel production from soybean oil. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, v. 39, p. 203-210, 2008.

TUTER, M. et al. Synthesis of fatty acid esters from acid oils using lipase B from *Candida antarctica*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* v. 106, p. 513-517, 2004.

URRUTIA, P. et al. Immobilization of *Bacillus circulans* beta-galactosidase and its application in the synthesis of galacto-oligosaccharides under repeated-batch operation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 77, p. 41-48, 2013.

UPPENBERG, Jonas et al. Crystalization and Preliminary X- Ray Studies of Lipase B from *Candida antarctica*. **J.mol.bio**, Bagsvoerd, n. 235, p.790-792, 20 set. 1994. Dinamarca.

VAN GERPEN, J. et al. **Biodiesel production technology**. *Golden: National Renewable Energy Laboratory*, 2004. 110 p.

VOLPATO, Giandra. **Produção, purificação e imobilização de lipases de *Staphylococcus warneri* EX17 produzidas em glicerol**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

WANG, D.; XU, Y.; SHAN, T. Effects of oils and oil-related substrates on the syntetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media: **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 30-37, 2008.

WATANABE, Y. et al. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 78, p. 703-707, 2001.

WATANABE, Y. et al. of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. **J. Mol. Catal. B, Enzym**, v. 17, p. 151-155, 2002.

WATANABE, Y., et al. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* Lipase. **JAOCS**, v. 77, n. 4, 2000.

XU, Y. et al. Novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. **Biotechnol. Lett.**, v. 25, p. 1239-1241, 2003.

XU, Y. et al. Of soybean oil to biodiesel fuel using lipozyme TL IM in a solvent-free medium. **Biocatal. Biotransf**, v. 22, p. 45-48, 2004.

YANG, Liu et al. Microbial recycling of glycerol to biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 1-8, dec. 2013.

YAO, W. et al. In vitro enzymatic conversion of  $\alpha$ -aminobutyric acid immobilization of glutamate decarboxylase with bacterial cellulose membrane (BCM) and non-linear model establishment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p. 258-264, 2013.

YESILOGLU, Y. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 81, p. 157–160, 2004.

ZAKS, Aleksey; RUSSELL, Alan J. Enzymes in organic solvents: properties and applications. *Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 4, p. 259-269, 1988.

ZENG, Jing. Study on the effect of cultivation parameters and pretreatment on *Rhizopus oryzae* cell-catalyzed transesterification of vegetable oils for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, n. 43, p. 15-18, 2006.

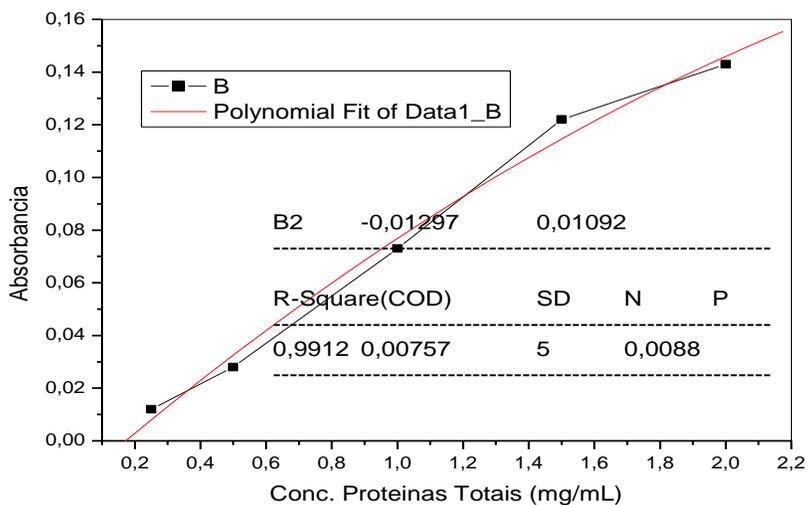
ZHANG, Y. et al. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Biores. Technol*, v. 89, p. 1-16, 2003.

ZHANG, Yong et al. Analysing the status, obstacles and recommendations for WCOs of restaurants as biodiesel feedstocks in China from supply chain' perspectives. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 60, p. 20-37, mar. 2012.

ZHENG, P. et al. Immobilized  $\alpha$ -glucosidase on magnetic chitosan microspheres for hydrolysis of straw cellulose. *Process Biochemistry*, v. 48, p. 683-687, 2013.



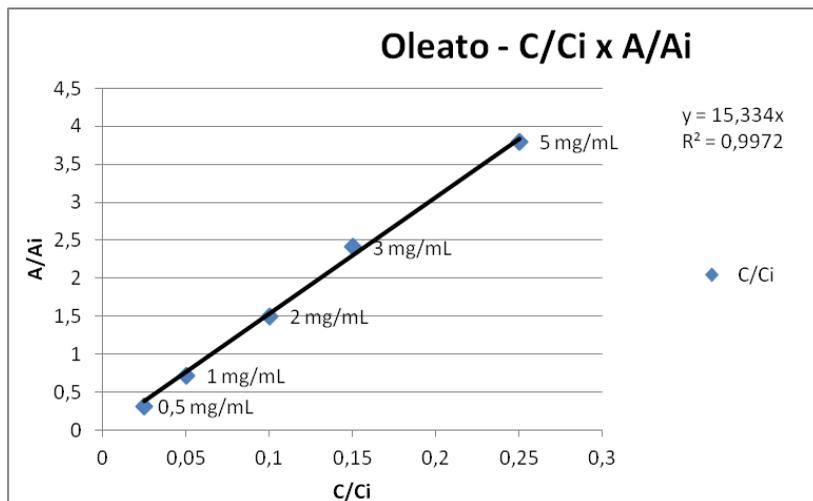
### APÊNDICE A: Curva de proteínas totais



\* Comprimento de onda 595 nm.

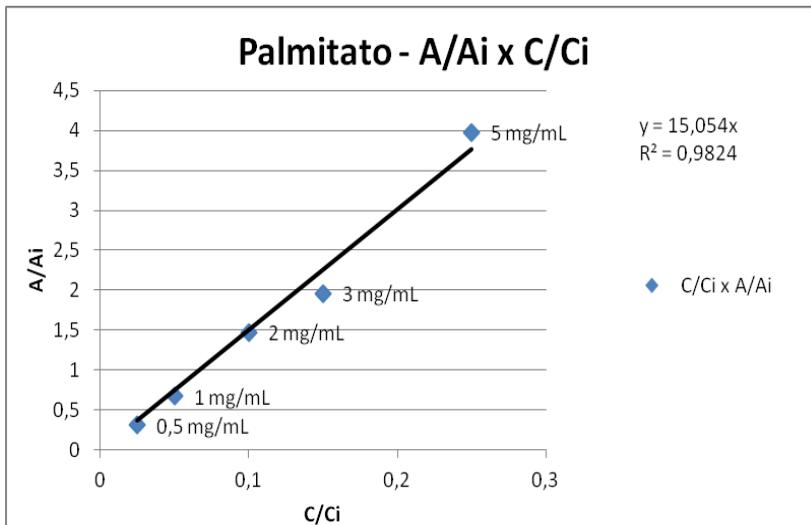


## APÊNDICE B: Curvas de Calibração de padrões de ésteres de ácidos graxos (CLAE).



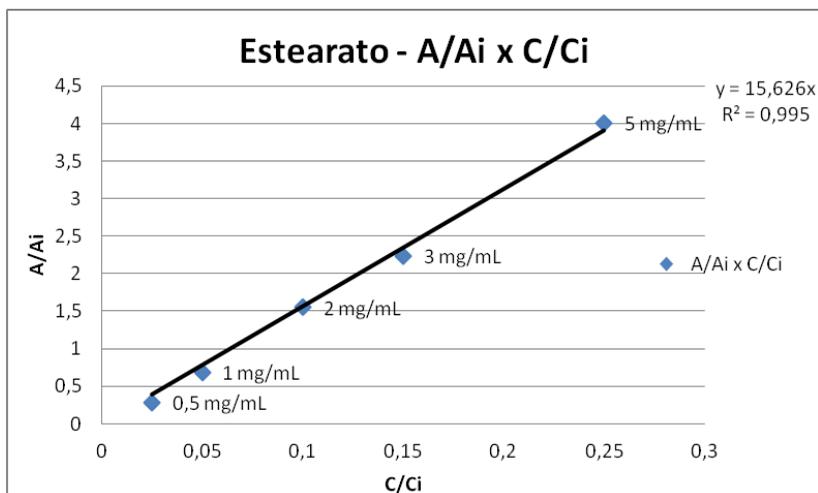
Ai	A	A/Ai
1935836,4	613479,2	0,31690653
2022521,2	1456670,6	0,72022513
2074315,5	3103559,4	1,49618484
2013805,6	4857779,7	2,41223865
2129702,8	8086704,1	3,79710451

Ci (mg/mL)	C (mg/mL)	C/Ci
20	0,5	0,025
	1	0,05
	2	0,1
	3	0,15
	5	0,25



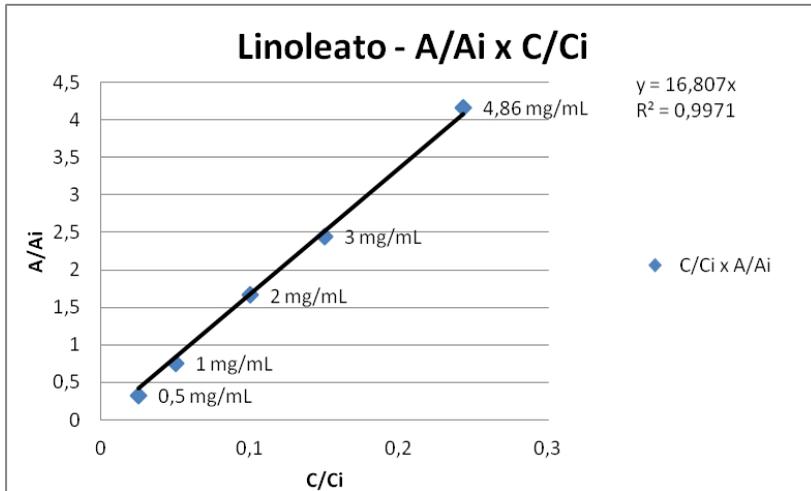
Ai	A	A/Ai
1912994	593909,6	0,310460775
2095884,8	1406735,9	0,671189514
2179170,5	3205031,2	1,470757428
2192328,3	4299921,2	1,961349128
1983732,8	7891901	3,97830847

Ci (mg/mL)	C (mg/mL)	C/Ci
20	0,5	0,025
	1	0,05
	2	0,1
	3	0,15
	5	0,25



Ai	A	A/Ai
1953328,8	547896,9	0,280493944
1999181,5	1366829,9	0,683694752
1957639,8	3035895,2	1,550793563
1962655,4	4391910,8	2,237739136
2049025,1	8207451,4	4,005539708

Ci (mg/mL)	C (mg/mL)	C/Ci
20	0,5	0,025
	1	0,05
	2	0,1
	3	0,15
	5	0,25



Ai	A	A/Ai
2139245,3	703813,6	0,32900089
2143557	1621568,9	0,75648509
2115472,7	3519134,2	1,66352144
2273687,5	5567985,9	2,44887914
2172479,9	9042295,5	4,16219984

Ci (mg/mL)	C (mg/mL)	C/Ci
20	0,5	0,025
	1	0,05
	2	0,1
	3	0,15
	4,86	0,243