

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAÍS FABIANA CHAN SALUM

PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11

PARA A SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS

CURITIBA

2010

THAÍS FABIANA CHAN SALUM

PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11  
PARA A SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell

Coorientadora: Prof. Dra. Nadia Krieger

CURITIBA

2010

## TERMO DE APROVAÇÃO

THAÍS FABIANA CHAN SALUM

### Produção e imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* LTBE11 para síntese de ésteres etílicos

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



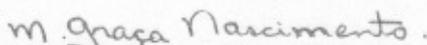
Prof. Dr. David Alexander Mitchell (Orientador)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dr. Jaime Paba Martinez  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisella Maria Zanin  
Departamento de Engenharia Química – UEM



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria da Graça Nascimento  
Departamento de Química – UFSC



Prof. Dr. Jesus Cordova  
Departamento de Química – UFPR

Curitiba, 22 de fevereiro de 2010.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Professor David Alexander Mitchell e Professora Nadia Krieger pela oportunidade e pela orientação neste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado nos primeiros meses.

À CAPES pela bolsa de doutorado e pela bolsa de estágio de doutorado no exterior.

Ao Dr. Pierre Villeneuve do CIRAD (*Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement*, Montpellier, França) pela oportunidade e pela atenção durante meu estágio de doutorado.

Aos amigos de laboratório: Alessandra, Aline, Alysson, Arnaldo, Arquimedes, Cryshelen, Cíntia, Christiane, Cristiane, Dayane, Doumit, Ednéia, Érika, Joel, Kátia, Malu, Marcelo, Rodrigo, Safi, Valéria, Virgínia e Vivian pelas discussões, sugestões, ajuda nos experimentos, paciência, por tudo o que aprendi com eles e principalmente pela amizade.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos pela ajuda, empréstimos de materiais e equipamentos e pelos momentos de descontração.

Aos colegas da turma de mestrado pelas colaborações e pelos agradáveis momentos que passamos juntos.

À equipe do Dr. Pierre Villeneuve: Bruno, Nathalie, Clara, Georges, Jérôme e Michel pelos ensinamentos, ajuda nos experimentos, pelo ótimo ambiente de trabalho e companhia nos cafezinhos.

Aos colegas do CIRAD, em especial aos do laboratório: Luis, Marlène, Mickael e Catherine pela amizade, momentos de lazer e ensinamentos sobre a língua francesa.

Aos brasileiros maravilhosos que tive a sorte de conhecer em Montpellier e que me fizeram sentir em casa: Antonio Oliveira (que me apoiou, dividiu muitas coisas comigo, me ensinou muitas coisas e ainda há de me ensinar muitas outras), Antônio Bo e Carlinha (meus queridos “colocs” que me agüentaram vários meses sob o mesmo teto), Dani (obrigada pela amizade e também pelos serviços de costura!), Carol, Paulo e Bizzo, pela amizade, conselhos e passeios.

À coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).

Às professoras Gláucia Martinez e Sílvia Cadena Stuer pelos ensinamentos durante meus estágios em docência.

Ao professor Jaime Paba pelo acompanhamento do meu trabalho e sugestões.

Ao LACAUT (Laboratório de Análise de Combustíveis Automotivos), onde fiz as análises de cromatografia gasosa.

A todos os meus amigos e familiares, em especial meus pais Jorge e Se Hong e minha irmã Marcela, que sempre me ajudaram e me apoiaram em todos os momentos.

Infelizes os homens que têm todas as idéias claras.

Louis Pasteur

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi produzir a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 e estudar a sua utilização em reações de síntese de ésteres, especialmente ésteres que são utilizados como biodiesel. Em diferentes etapas, quatro diferentes preparações enzimáticas foram utilizadas. Três foram preparadas a partir de um extrato lipolítico bruto produzido por fermentação submersa: lipase encapsulada em micelas, lipase livre liofilizada e lipase imobilizada em um suporte de polipropileno (Accurel EP-100). A quarta preparação foi um sólido fermentado liofilizado contendo atividade lipolítica, produzido por fermentação no estado sólido. Quando as três preparações obtidas a partir da fermentação submersa foram comparadas em reações de esterificação em *n*-heptano como cossolvente, a lipase imobilizada em Accurel apresentou a maior conversão em éster. Os efeitos da quantidade de lipase imobilizada e da atividade de água no meio foram então estudados. Foi possível obter 100% de esterificação em 3 h. A atividade de água na faixa de 0,11 a 0,95 não afetou a conversão em éster significativamente. A reutilização da lipase imobilizada em reações seqüenciais foi testada. Durante 11 reações 100% de conversão foi obtida em 6 h. Após 24 reações a conversão obtida após 6 h caiu para 50%. Para a produção da lipase por fermentação no estado sólido, vários substratos foram testados: tortas de soja, milho e mamona, bagaço de cana-de-açúcar e misturas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de semente de girassol. A maior atividade lipolítica, 234 U de atividade de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) por grama de substrato seco foi obtida com uma mistura 1:1 (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de semente de girassol. Este sólido fermentado foi liofilizado e utilizado em reação de esterificação, com *n*-heptano como cossolvente. O seu desempenho, em termos de conversão em éster por unidade de atividade de hidrólise do *p*NPP, foi comparável com aquela obtida com a lipase imobilizada em Accurel EP-100. O sólido fermentado foi então selecionado para a utilização na transesterificação de óleos, com o objetivo de produzir ésteres utilizados como biodiesel. O melhor resultado obtido em frascos agitados para a reação livre de cossolvente (contendo somente óleo de soja e etanol) foi a conversão de 50% em 96 h, obtida a 37°C com 1% (m/m) de água no meio reacional e razão molar de etanol para óleo de soja de 3:1. Reações foram então realizadas em reator de leito fixo, pelo qual o meio reacional foi circulado. Neste caso o melhor resultado foi uma conversão de 95% em 46 h, obtida a 50°C, com 1% (m/m) de água no meio reacional, razão molar de etanol para óleo de soja de 3:1, com o etanol sendo adicionado em duas etapas. No teste de reutilização do sólido fermentado em reações seqüenciais a conversão original em 47 h foi mantida nas três primeiras reações, caindo para 50% da conversão original após nove reações. Este sistema tem bom potencial para reduzir o custo do processo de transesterificação enzimática para a produção do biodiesel por duas razões. Primeiro, o sólido fermentado pode ser adicionado diretamente ao meio de reação, evitando a necessidade de etapas caras do processo como a recuperação e imobilização da lipase. Segundo, o uso de meios reacionais livres de cossolvente evita a necessidade de um sistema de recuperação do cossolvente.

Palavras-chave: Lipase. *Burkholderia cepacia* LTEB11. Ésteres. Biodiesel. Imobilização. Fermentação no estado sólido.

## ABSTRACT

The objective of this work was to produce the lipase of *Burkholderia cepacia* LTEB11 and study its use in reactions involving the synthesis of esters, especially esters suitable for use as biodiesel. At different stages, four different enzymatic preparations were used. Three were prepared from a crude lipolytic extract produced by submerged culture: lipase encapsulated in micelles, free lipase in lyophilized form and lipase immobilized on a polypropylene support (Accurel EP-100). The fourth preparation was a lyophilized fermented solid containing lipolytic activity, produced by solid-state fermentation. When the three preparations originating from submerged culture were compared in esterification reactions carried out with *n*-heptane as a co-solvent, the lipase immobilized on Accurel gave the higher conversion. The effects of the amount of immobilized lipase and the water activity of the medium were then studied. It was possible to obtain 100% esterification in 3 h. Water activity in the range of 0.11 to 0.95 did not affect the conversion significantly. Reuse of the immobilized lipase in sequential batches was tested. During 11 batches 100% conversion was obtained in 6 h. After 24 batches the yield obtained after 6 h of reaction had fallen to 50%. For the production of lipase by solid-state fermentation, several substrates were tested, namely soybean, corn and castor bean cakes, sugarcane bagasse and mixtures of sugarcane bagasse and sunflower seed meal. The highest yield of lipolytic activity, 234 U of *p*NPP-hydrolyzing activity per gram of dry solids, was obtained with a 1:1 (by mass) mixture of sugarcane bagasse and sunflower seed meal. This fermented solid was lyophilized and used in esterification reaction, with *n*-heptane as a co-solvent. Its performance, in terms of conversion per unit of *p*NPP-hydrolyzing activity, was comparable with that obtained with the lipase immobilized on Accurel EP 100. The fermented solid was therefore selected for use in the transesterification of oils, with the aim of producing esters suitable for use as biodiesel. The best result obtained in shake flasks for reaction media free of co-solvents (i.e. containing only soybean oil and ethanol) was a conversion of 50% in 96 h, obtained at 37°C with 1% (m/m) water in the reaction medium and a molar ratio of ethanol to soybean oil of 3:1. Reactions were then carried out in a fixed bed through which the reaction medium was circulated. In this case the best result was a conversion of 95% in 46 h, obtained at 50°C with 1% (m/m) water in the reaction medium, a molar ratio of ethanol to soybean oil of 3:1, with the ethanol being added in two steps. In a test of reutilization of the fermented solid in sequential batches the yield at 47 h of reaction was maintained for the first three batches, with the yield at 47 h falling to 50% of the original yield after nine batches. This system has good potential to reduce the costs of the enzymatic transesterification process of biodiesel production, for two reasons. Firstly, the fermented solid can be added directly to the reaction medium, avoiding the need for expensive processing steps such as lipase recovery and immobilization. Secondly, the use of a reaction medium free of co-solvent means that it is not necessary to have a co-solvent recovery system.

Key-words: Lipase. *Burkholderia cepacia* LTEB11. Esters. Biodiesel. Immobilization. Solid-State Fermentation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REAÇÃO DE HIDRÓLISE CATALISADA POR LIPASES .....	18
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> . .....	19
FIGURA 3 - (a) ESTRUTURA DE UMA MICELA REVERSA. (b) ESTRUTURA DO SURFACTANTE DIOCTIL SULFOSUCCINATO DE SÓDIO (AOT). .....	31
FIGURA 4 – REAÇÕES REVERSÍVEIS CATALISADAS POR LIPASES .....	36
FIGURA 5 – ALTERAÇÕES NA EMISSÃO DE POLUENTES QUANDO DIFERENTES PERCENTAGENS DE BIODIESEL SÃO ADICIONADAS AO DIESEL. ....	39
FIGURA 6– FLUXOGRAMA DA ESTRUTURA DO TRABALHO.....	48
FIGURA 7 – CONTROLE DA ATIVIDADE DE ÁGUA POR PRÉ-EQUILÍBRIO DOS SUBSTRATOS, SOLVENTE E BIOCATALISADOR SEPARADAMENTE EM SOLUÇÕES SALINAS SATURADAS. ....	57
FIGURA 8 – REATOR DE LEITO FIXO UTILIZADO PARA REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO, CONTENDO O SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO PELA <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 E OS SUBSTRATOS ÓLEO DE SOJA E ETANOL. ....	62
FIGURA 9 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO PALMITATO DE <i>p</i> -NITROFENILA POR LIPASES.....	64
FIGURA 10 - ESTRUTURA DO COMPLEXO FORMADO ENTRE O ÍON $\text{Cu}^{2+}$ E OS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM SOLUÇÃO.....	67
FIGURA 11 – REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO COMPOSTO COLORIMÉTRICO 3,5 DIACETIL-1,4-DIIDROLUTIDINA NO MÉTODO DE SOLONI.....	70
FIGURA 12 – ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DA LIPASE PRODUZIDA POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 IMOBILIZADA EM ACCUREL EP-100, COMO FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA OFERECIDA PARA A IMOBILIZAÇÃO.....	73
FIGURA 13 – CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE PRODUZIDA POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 EM ACCUREL EP-100.....	74
FIGURA 14 – CINÉTICA DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM <i>n</i> -HEPTANO, CATALISADA POR DIFERENTES PREPARAÇÕES DA LIPASE PRODUZIDA POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	76
FIGURA 15 – INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE LIPASE IMOBILIZADA EM ACCUREL EP-100 NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM <i>n</i> -HEPTANO: .....	77
FIGURA 16 – INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DE ÁGUA ( $a_w$ ) NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM <i>n</i> -HEPTANO, CATALISADA PELA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 IMOBILIZADA EM ACCUREL EP-100. ....	78

FIGURA 17 – CINÉTICA DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM <i>n</i> -HEPTANO, CATALISADA PELA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 E <i>Burkholderia cepacia</i> DA AMANO, AMBAS IMOBILIZADAS EM ACCUREL EP-100.....	80
FIGURA 18 – REUTILIZAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA EM ACCUREL EP-100 NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM <i>n</i> -HEPTANO.....	81
FIGURA 19 – ATIVIDADE DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.....	85
FIGURA 20 – COMPARAÇÃO ENTRE A LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 IMOBILIZADA EM ACCUREL EP-100 E O SÓLIDO FERMENTADO PELA MESMA BACTÉRIA NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO.....	89
FIGURA 21 – EFEITO DO ETANOL NA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 EM MEIO AQUOSO FRENTE À TRIBUTIRINA SEM EMULSIFICANTE.....	90
FIGURA 22 - INFLUÊNCIA DA RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÓLEO NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	94
FIGURA 23 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	95
FIGURA 24 - INFLUÊNCIA DO TEOR DE ÁGUA NO MEIO REACIONAL NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	97
FIGURA 25 – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	99
FIGURA 26 – INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE ETANOL EM ETAPAS NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	100
FIGURA 27 – INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE ÁGUA NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	102
FIGURA 28 - INFLUÊNCIA DO FLUXO DOS SUBSTRATOS NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	103
FIGURA 29 – REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO.....	105

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – EXEMPLOS DE ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO .....	23
TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DE LIPASES BACTERIANAS .....	25
TABELA 3 – EXEMPLOS DE ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES UTILIZANDO LIPASES.....	37
TABELA 4 – PERCENTAGEM DO NÚMERO DE PUBLICAÇÕES REPORTANDO AUMENTO, REDUÇÃO E SIMILARIDADE NAS EMISSÕES DE POLUENTES QUANDO SE UTILIZA O BIODIESEL COMPARADO À UTILIZAÇÃO DO DIESEL.....	40
TABELA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE O PROCESSO ENZIMÁTICO E O PROCESSO ALCALINO CONVENCIONAL PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	42
TABELA 6 - EXEMPLOS DE ESTUDOS DE SÍNTESE DE BIODIESEL UTILIZANDO LIPASES EM REATORES DE BATELADA.....	44
TABELA 7 - EXEMPLOS DE ESTUDOS DE SÍNTESE DE BIODIESEL UTILIZANDO LIPASES EM REATORES DE LEITO FIXO.....	46
TABELA 8 – ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES POR ESTERIFICAÇÃO EM MEIO DE COSSOLVENTE ORGÂNICO UTILIZANDO LIPASES IMOBILIZADAS .....	83
TABELA 9 – ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS.....	87
TABELA 10 – ATIVIDADE RESIDUAL DA LIPASE CONTIDA NO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 APÓS INCUBAÇÃO EM ETANOL E EM MEIO AQUOSO.....	91
TABELA 11 – SÍNTESE DE ÉSTERES ALQUÍLICOS EM FRASCOS AGITADOS UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11.....	92
TABELA 12 – ATIVIDADE RESIDUAL DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS APÓS 9 UTILIZAÇÕES PARA A REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO .....	107
TABELA 13 - ESTUDOS DE SÍNTESE DE BIODIESEL POR TRANSESTERIFICAÇÃO EM MEIO LIVRE DE COSSOLVENTE UTILIZANDO LIPASES IMOBILIZADAS .....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$a_w$  – atividade de água

AOT – dioctil sulfosuccinato de sódio

CCD – cromatografia em camada delgada

FS – fermentação submersa

FES – fermentação no estado sólido

g/mol – gramas por mol

LB – meio de cultura Luria Bertani

log P – logaritmo do coeficiente de partição bifásico *n*-octanol/água

LTEB – Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise

*p*NPP – palmitato de *p*-nitrofenila

$p_w$  – pressão parcial da água

$p^{\circ}_w$  – pressão parcial da água pura

rpm – rotações por minuto

U.gSS<sup>-1</sup> – unidades por grama de substrato seco

m/m – massa/massa

m/v – massa/volume

v/v – volume/volume

$\omega_0$  – razão molar entre a água e o surfactante

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b><u>INTRODUÇÃO</u></b> .....	<b>15</b>
1.1	OBJETIVO GERAL .....	17
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>2</b>	<b><u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u></b> .....	<b>18</b>
2.1	LIPASES: DEFINIÇÃO E ASPECTOS ESTRUTURAIS .....	18
2.2	PRODUÇÃO DE LIPASES.....	20
2.2.1	<i>Fermentação no Estado Sólido</i> .....	21
2.3	CARACTERÍSTICAS DAS LIPASES BACTERIANAS .....	24
2.4	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	26
2.4.1	<i>Conceito, vantagens e técnicas de imobilização de enzimas</i> .....	26
2.4.2	<i>Imobilização de lipases</i> .....	27
2.5	REATORES ENZIMÁTICOS .....	29
2.6	BIOCATÁLISE UTILIZANDO LIPASES.....	30
2.6.1	<i>Sistemas orgânicos</i> .....	30
2.6.1.1	Micelas reversas .....	31
2.6.1.2	Sistema livre de solvente.....	32
2.6.1.3	Fatores que influenciam a atividade das lipases em meios orgânicos.....	33
2.6.1.3.1	Influência do solvente .....	33
2.6.1.3.2	Influência da quantidade de água.....	34
2.7	APLICAÇÕES DE LIPASES EM BIOCATÁLISE .....	35
2.8	BIODIESEL .....	38
2.8.1	<i>Processos catalisados por lipases</i> .....	42
<b>3</b>	<b><u>MATERIAIS E MÉTODOS</u></b> .....	<b>48</b>
3.1	PRODUÇÃO DA LIPASE.....	49
3.1.1	<i>Microrganismo</i> .....	49
3.1.1.1	Preparação do inóculo .....	49
3.1.2	<i>Fermentação submersa</i> .....	49
3.1.3	<i>Fermentação no estado sólido</i> .....	50
3.1.3.1	Substratos.....	50
3.1.3.2	Condições de crescimento do microrganismo .....	51
3.1.3.3	Extração da lipase para determinação da atividade lipolítica .....	51
3.2	BIOCATÁLISE UTILIZANDO A LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	52
3.2.1	<i>Preparação do extrato lipolítico</i> .....	52
3.2.2	<i>Imobilização da lipase em Accurel EP 100</i> .....	53
3.2.2.1	Procedimento de imobilização .....	53
3.2.2.2	Determinação da quantidade de proteína a ser imobilizada .....	53
3.2.2.3	Cinética de imobilização.....	54
3.2.3	<i>Secagem e delipidação das preparações enzimáticas</i> .....	55
3.2.4	<i>Procedimento padrão para reações de esterificação em n-heptano</i> .....	55

3.2.5	<i>Comparação entre diferentes preparações enzimáticas em reações de esterificação.....</i>	56
3.2.6	<i>Reações de esterificação utilizando a lipase de Burkholderia cepacia LTEB11 imobilizada em Accurel EP-100.....</i>	56
3.2.6.1	<i>Influência da concentração de lipase imobilizada adicionada ao meio reacional .....</i>	56
3.2.6.2	<i>Influência da atividade de água (<math>a_w</math>) inicial no meio reacional .....</i>	57
3.2.6.3	<i>Comparação entre a lipase de Burkholderia cepacia LTEB11 e a lipase de Burkholderia cepacia comercial imobilizadas .....</i>	58
3.2.6.4	<i>Reutilização da lipase imobilizada .....</i>	58
<b>3.3</b>	<b>BIOCATÁLISE UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE Burkholderia cepacia LTEB11 .....</b>	<b>59</b>
3.3.1	<i>Produção e caracterização do sólido fermentado.....</i>	59
3.3.2	<i>Quantificação de lipídios no sólido fermentado .....</i>	59
3.3.3	<i>Comparação entre a lipase de Burkholderia cepacia LTEB11 imobilizada em Accurel EP-100 e o sólido fermentado .....</i>	60
3.3.4	<i>Efeito do etanol na atividade lipolítica do sólido fermentado .....</i>	60
3.3.5	<i>Estabilidade da atividade lipolítica do sólido fermentado.....</i>	60
3.3.6	<i>Reações de transesterificação em frascos agitados.....</i>	61
3.3.7	<i>Reações de transesterificação em reator de leito fixo .....</i>	61
3.3.7.1	<i>Reutilização do sólido fermentado .....</i>	63
3.3.7.2	<i>Determinação da atividade residual do sólido fermentado após a reutilização .....</i>	63
<b>3.4</b>	<b>MÉTODOS ANALÍTICOS.....</b>	<b>64</b>
3.4.1	<i>Determinação da atividade lipolítica .....</i>	64
3.4.1.1	<i>Método da hidrólise do pNPP em meio aquoso .....</i>	64
3.4.1.2	<i>Método da hidrólise do pNPP em meio orgânico .....</i>	65
3.4.1.3	<i>Método titulométrico.....</i>	65
3.4.2	<i>Métodos de análise das reações de esterificação e transesterificação .....</i>	66
3.4.2.1	<i>Método de Lowry-Tinsley .....</i>	66
3.4.2.2	<i>Cromatografia Gasosa (CG) .....</i>	67
3.4.3	<i>Quantificação de proteínas.....</i>	68
3.4.4	<i>Cromatografia em camada delgada (CCD).....</i>	68
3.4.5	<i>Preparação e análise de ésteres metílicos de ácidos graxos .....</i>	68
3.4.6	<i>Dosagem de glicerol .....</i>	69
3.4.6.1	<i>Método de Soloni .....</i>	70
3.4.6.2	<i>Cromatografia Gasosa.....</i>	71
<b>4</b>	<b><u>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</u></b>	<b><u>72</u></b>
<b>4.1</b>	<b>BIOCATÁLISE UTILIZANDO A LIPASE DE Burkholderia cepacia LTEB11 PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....</b>	<b>72</b>
4.1.1	<i>Imobilização em Accurel EP-100 .....</i>	72
4.1.1.1	<i>Efeito da quantidade de proteína imobilizada na atividade lipolítica .....</i>	72
4.1.1.2	<i>Cinética de imobilização .....</i>	74
4.1.2	<i>Comparação entre diferentes preparações enzimáticas em reação de esterificação – escolha da preparação enzimática .....</i>	75
4.1.3	<i>Reações de esterificação utilizando a lipase de Burkholderia cepacia LTEB11 imobilizada em Accurel EP-100.....</i>	77

4.1.3.1	Influência da quantidade de lipase imobilizada adicionada ao meio reacional.....	77
4.1.3.2	Influência da atividade de água ( $a_w$ ) do meio reacional.....	78
4.1.3.3	Comparação entre lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 e a lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> comercial imobilizadas.....	79
4.1.3.4	Reutilização da lipase imobilizada .....	80
<b>4.2</b>	<b>BIOCATÁLISE UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11 .....</b>	<b>84</b>
4.2.1	<i>Estudos de produção da lipase.....</i>	84
4.2.2	<i>Determinação da atividade lipolítica do sólido fermentado.....</i>	87
4.2.3	<i>Quantificação de lipídios no sólido fermentado .....</i>	88
4.2.4	<i>Comparação entre a lipase imobilizada em Accurel EP-100 e o sólido fermentado em reação de esterificação.....</i>	88
4.2.5	<i>Efeito do etanol na atividade lipolítica do sólido fermentado .....</i>	90
4.2.6	<i>Efeito do etanol e de solução tampão na estabilidade da lipase contida no sólido fermentado .....</i>	91
4.2.7	<i>Reações de transesterificação em frascos agitados.....</i>	91
4.2.7.1	Ensaio preliminares.....	91
4.2.7.2	Otimização da reação de transesterificação em ausência de co-solvente ..	93
4.2.7.2.1	Influência da razão molar álcool:óleo.....	93
4.2.7.2.2	Influência da temperatura .....	95
4.2.7.2.3	Influência do teor de água no meio reacional .....	96
4.2.8	<i>Reações de transesterificação em reator de leito fixo .....</i>	97
4.2.8.1	Influência da temperatura de reação .....	98
4.2.8.2	Influência da adição de álcool ao meio reacional em etapas.....	100
4.2.8.3	Influência da quantidade de água no meio reacional.....	101
4.2.8.4	Influência da velocidade de fluxo dos substratos através do reator.....	103
4.2.8.5	Reutilização do sólido fermentado .....	105
4.2.8.6	Determinação da atividade residual do sólido fermentado após a reutilização.....	106
4.2.8.7	Dosagem de glicerol no meio reacional e no sólido fermentado.....	107
<b>5</b>	<b><u>CONCLUSÕES .....</u></b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b><u>PERSPECTIVAS.....</u></b>	<b>114</b>
	<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u></b>	<b>115</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores biológicos que possuem diversas vantagens em relação aos catalisadores químicos, como a alta seletividade para determinados substratos, a sua versatilidade (podem atuar em amplas faixas de pH e temperatura) e a sua biodegradabilidade. Dentre as enzimas mais utilizadas estão as lipases (glicerol éster hidrolases E. C. 3.1.1.3), que são muito empregadas pela indústria química, farmacêutica, alimentícia, cosmética, entre outras. Entretanto, a aplicação de enzimas em solventes orgânicos tem sido dificultada pela baixa atividade catalítica comparada à obtida em meio aquoso e pelo seu alto custo de produção. Por outro lado, técnicas como a imobilização do biocatalisador em suportes sólidos têm provado serem úteis para aumentar a atividade enzimática em ambientes aquo-restritos, além de possibilitar a reutilização da enzima, o que contribui para diminuir os seus custos de produção, incentivando o uso de enzimas em processos industriais.

As lipases têm as aplicações clássicas baseadas em processos que utilizam reações de hidrólise de triacilgliceróis, mas a sua utilização em meios orgânicos (ambientes aquo-restritos), tem possibilitado o seu uso em reações de síntese de ésteres. Os ésteres são amplamente utilizados em diversas áreas, por exemplo, como aditivos em combustíveis, emolientes em cosméticos, drogas, biopolímeros e herbicidas.

Dentre os ésteres de interesse industrial, os ésteres etílicos e metílicos de ácidos graxos são compostos que vêm ganhando importância atualmente, dada a sua participação na composição de biocombustíveis, como o biodiesel. Esse tipo de combustível vem sendo produzido industrialmente, embora ainda não amplamente por processo enzimático, apesar de este apresentar diversas vantagens em relação ao processo químico. Entretanto, muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de viabilizar a produção de biodiesel utilizando lipases. Para isso, é necessário reduzir os custos do processo enzimático, o que pode ser atingido com a produção de enzimas com alta atividade e estabilidade em meios aquo-restritos e que apresentem possibilidade de reutilização. Dentro deste contexto, a fermentação no estado sólido (FES) pode desempenhar um papel importante na redução dos custos de produção de enzimas.

Convencionalmente, as lipases são produzidas por microrganismos por processos de fermentação submersa (FS), que apresentam as vantagens de maior facilidade de controle do processo e bons rendimentos para a produção de enzimas extracelulares. Por outro lado, a fermentação no estado sólido, na qual se utiliza substratos sólidos umedecidos - vem sendo estudada e tem demonstrado ser uma maneira econômica de produzir várias enzimas, incluindo lipases e esterases. A economia do processo deve-se à possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais como substrato. Se a aplicação destes resíduos em bioprocessos, por um lado, fornece substratos alternativos de baixo custo, por outro lado, ajuda na resolução de problemas de poluição causados pelo despejo de resíduos agroindustriais na natureza. Assim, a FES torna-se economicamente interessante em países que são grandes produtores agrícolas, como o Brasil. Outra vantagem da FES é que ela não gera efluentes líquidos. Além disso, estudos recentes mostraram a possibilidade de utilização do substrato fermentado contendo a enzima diretamente no meio reacional, ou seja, sem haver a necessidade de extração da enzima do sólido fermentado e da sua imobilização, aliando em uma só etapa a produção e a imobilização do biocatalisador.

Dentro deste contexto, este trabalho visou contribuir para o estudo de processos de obtenção de lipases que viabilizem sua utilização para a síntese de ésteres, notadamente os ésteres etílicos que compõem o biodiesel, estudando-se a utilização do substrato fermentado por FES diretamente no meio de reação e comparando-o com o biocatalisador imobilizado convencionalmente.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a aplicação da lipase da cepa nativa de *Burkholderia cepacia* LTEB11 em reações de síntese de ésteres etílicos.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial da utilização da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em suporte de polipropileno (Accurel EP-100) na síntese de ésteres etílicos, por meio de reações de esterificação, utilizando como substratos o álcool etílico e o ácido oleico em *n*-heptano como cossolvente, e estudar os parâmetros que influenciam no rendimento da reação, como a quantidade de enzima no meio reacional e a atividade de água;
- Estudar a possibilidade de reutilização da lipase imobilizada para reações de síntese de ésteres;
- Estudar a produção da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 por fermentação no estado sólido (FES) utilizando resíduos agro-industriais;
- Comparar o desempenho do sólido fermentado seco produzido por FES utilizado diretamente no meio reacional com a lipase imobilizada em Accurel EP-100 em reação de esterificação entre o ácido oleico e etanol;
- Avaliar o efeito da temperatura, quantidade de água no meio reacional, razão molar entre os substratos e presença do cossolvente em reações de transesterificação entre o óleo de soja e o etanol em frascos agitados utilizando-se o sólido fermentado contendo a lipase produzida por FES;
- Avaliar o efeito da temperatura, quantidade de água do meio reacional, adição de álcool em etapas e fluxo dos substratos em reações de transesterificação em biorreator de leito fixo em coluna utilizando-se o sólido fermentado;
- Avaliar a possibilidade de reutilização do sólido fermentado para reações de síntese de ésteres.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LIPASES: DEFINIÇÃO E ASPECTOS ESTRUTURAIS

Lipases (glicerol éster hidrolases E. C. 3.1.1.3) são enzimas que têm como função natural a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol (FIGURA 1). Entretanto, em ambientes aquo-restritos, as lipases têm se mostrado muito ativas em reações de esterificação, transesterificação, inter-esterificação, alcoólise e aminólise (BARON *et al.*, 2005; FORESTI; FERREIRA, 2005; FERNANDES *et al.*, 2007).

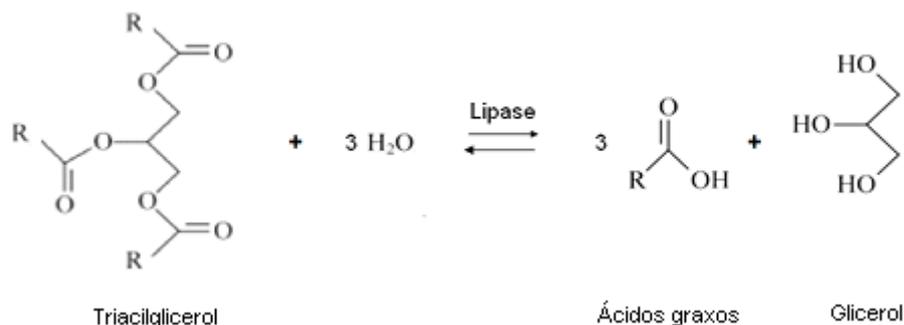


FIGURA 1 – REAÇÃO DE HIDRÓLISE CATALISADA POR LIPASES

A ação catalítica das lipases é bastante complexa e a estrutura da enzima ao redor do sítio ativo varia significativamente de uma lipase para outra. Entretanto, existem motivos estruturais que são comuns para todas as lipases: a tríade catalítica, formada por resíduos de serina, histidina e aspartato (ou glutamato) (JAEGER *et al.*, 1994) e um dobramento característico na conformação  $\alpha/\beta$  hidrolase, que também é encontrado em esterases, proteases e haloperoxidases (OLLIS *et al.*, 1992).

A FIGURA 2 mostra a estrutura tridimensional da lipase de *Burkholderia cepacia* (anteriormente denominada *Pseudomonas cepacia*). Além dos resíduos do sítio ativo, outra região importante é o sítio de ligação de  $\text{Ca}^{+2}$ , que está coordenado por seis átomos de oxigênio, sendo quatro átomos da proteína e duas de moléculas de água. Acredita-se que este seja um importante sítio para forçar a permanência de

algumas ligações peptídicas na conformação *cis*, o que beneficiaria a proteína na manutenção de algumas ligações de hidrogênio (SCHRAG *et al.*, 1997).

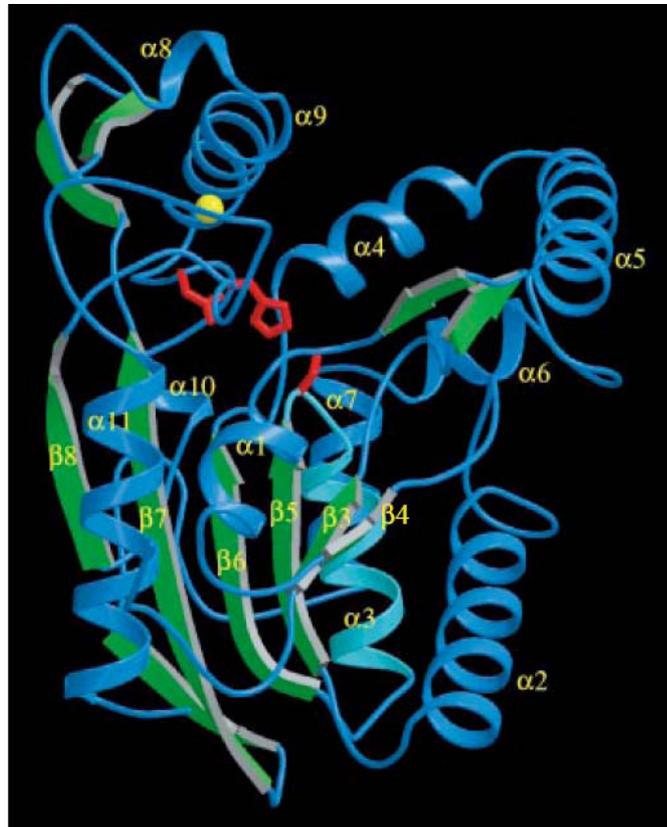


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia*. AS FITAS  $\beta$  ESTÃO REPRESENTADAS COMO SETAS (EM VERDE) E AS  $\alpha$  - HÉLICES EM AZUL. A POSIÇÃO DO ÍON  $\text{Ca}^{+2}$  ESTÁ INDICADA EM AMARELO E OS RESÍDUOS DA TRIÁDE CATALÍTICA ESTÃO MOSTRADOS EM VERMELHO. FONTE: SCHRAG *et al.* (1997)

Na maioria das lipases, existe uma parte da molécula da enzima que cobre o sítio ativo com uma curta  $\alpha$ -hélice, e é chamada *flap* ou *lid* (tampa). O lado da “tampa” voltado para o sítio catalítico, assim como as cadeias protéicas ao redor deste, são compostos principalmente por cadeias laterais hidrofóbicas. Em ambientes aquosos, sem o seu substrato natural, a “tampa” está cobrindo o sítio catalítico, a lipase é 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 mudanças dramáticas na estrutura enzimática, levando à forma “aberta” da lipase, deixando a enzima ativa. Esta mudança na estrutura tridimensional da lipase em interfaces água/óleo é conhecida como “ativação interfacial”. Exemplos de exceções são as lipases de *Burkholderia glumae*, *Candida*

*antarctica B* e *Pseudomonas aeruginosa*, que não possuem o efeito da ativação interfacial, apesar de conterem a “tampa hidrofóbica” (JAEGER; REETZ, 1998). Outras lipases, como a de *Staphylococcus hyicus*, mostram ativação interfacial somente com alguns substratos (VERGER, 1997). Por outro lado, as cutinases não apresentam a *lid* e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica (CYGLER; SCHRAG, 1997). Assim, a presença da “tampa” e o fenômeno da ativação interfacial, ao contrário do que se considerava há alguns anos, não são critérios adequados para se classificar uma enzima como lipase. A definição atualmente aceita é simples: lipase é uma carboxilesterase que catalisa a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (JAEGER; REETZ, 1998).

Lipases podem ser diferenciadas das esterases por catalisarem reações com triacilgliceróis de cadeias com mais de 10 carbonos, tendo-se a trioleína como substrato padrão, enquanto as esterases catalisam a hidrólise de triacilgliceróis com cadeias de menos de 10 carbonos, tendo-se a tributirina como substrato padrão (RHEE *et al.*, 2005). O tamanho exato da cadeia carbônica do substrato para que a enzima seja considerada uma lipase verdadeira, entretanto, não é um fator bem definido. Enquanto Rhee *et al.* (2005), por exemplo, consideram que uma lipase é verdadeira quando hidrolisa substratos com cadeias carbônicas maiores do que 10, outros autores consideram lipases verdadeiras aquelas que atuam em substratos com cadeias com mais de 8 carbonos (COTE; SHARECK, 2008). As lipases, entretanto, são também capazes de hidrolisar os substratos das esterases, embora o inverso não ocorra.

## 2.2 PRODUÇÃO DE LIPASES

As lipases são produzidas por muitos microrganismos, plantas e animais. Assim como as outras enzimas, as lipases microbianas são mais utilizadas do que enzimas derivadas de plantas ou animais, devido à possibilidade de altos rendimentos, à facilidade de manipulação genética, ao suprimento regular devido à ausência de flutuações sazonais e ao rápido crescimento dos microrganismos em meios relativamente baratos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Os microrganismos produtores de lipases incluem as bactérias, os fungos e leveduras, e têm sido encontrados em diversos ambientes, como efluentes industriais, fábricas de processamento de óleo vegetal, indústrias de laticínios, solos contaminados com óleo, óleos de sementes e alimentos em decomposição (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

A produção de lipases e de enzimas em geral em escala industrial se faz majoritariamente por fermentação submersa, onde os meios de cultivo são líquidos contendo diversos nutrientes solubilizados. As técnicas de cultivo submerso têm se beneficiado dos avanços na instrumentação e controle de processos e são muito adequadas para o cultivo de microrganismos recombinantes, que vêm sendo crescentemente empregados para a produção de enzimas. A produção industrial de enzimas geralmente ocorre em fermentadores com capacidade de 10.000 a 100.000 L, operados de modo descontínuo (batelada). Tais fermentadores são munidos de camisas ou serpentinas internas para as necessidades de aquecimento e refrigeração e de sistemas de medidas (sensores de pH, temperatura, oxigênio dissolvido). As fermentações em batelada para produção de enzimas têm duração da ordem de 30 a 150 h (SANT'ANNA, 2001).

### *2.2.1 Fermentação no Estado Sólido*

Outro tipo de fermentação que pode ser utilizado para produzir enzimas é a fermentação no estado sólido (FES). Esta envolve o crescimento de microrganismos em partículas sólidas úmidas, em situações nas quais os espaços entre as partículas contêm uma fase contínua gasosa e um mínimo de água visível. Apesar de gotas de água poderem estar presentes entre as partículas, e poder haver finos filmes de água na superfície da partícula, a fase aquosa é descontínua e a maior parte do espaço inter-partículas é preenchida pela fase gasosa, facilitando o processo de transferência de oxigênio (LONSANE *et al.*, 1985).

Em FES, geralmente um polímero constitui a estrutura sólida, que pode ou não ser degradada pelo microrganismo durante a fermentação. Quando suportes inertes (espuma de poliuretano, por exemplo) ou substratos pobres em nutrientes

(como o bagaço de cana-de-açúcar) são utilizados, uma solução nutriente é absorvida na matriz (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006).

A grande vantagem da FES é a possibilidade de utilização de resíduos agro-industriais como substrato, que são, em geral, ricos em carboidratos e outros nutrientes. Assim, a FES é de especial interesse em países com abundância em resíduos agro-industriais, visto que estes podem ser utilizados como substratos de baixo custo (GOMBERT *et al.*, 1999). Os resíduos utilizados são muitas vezes provenientes da extração de óleo de sementes (tortas ou farelos) ou bagaços provenientes da indústria de processamento do amido, da cana-de-açúcar ou de cítricos, entre os mais citados (KRISHNA, 2005).

Processos em larga escala para a produção de alimentos fermentados tradicionais (como molho de soja, por exemplo) por FES têm sido realizados há muitos anos. Entretanto, a FES para a produção de produtos como enzimas, biopesticidas e outros metabólitos vem sendo estudada apenas mais recentemente (KHANAHMADI *et al.*, 2006), e ainda, geralmente, em escala laboratorial.

A produção de lipases por FES em escala laboratorial vem sendo relatada por muitos autores, que têm utilizado os mais diversos resíduos agro-industriais, como pode ser observado na TABELA 1.

Verifica-se que a grande maioria dos trabalhos que relatam a produção de lipases por FES utiliza fontes fúngicas. Fungos e leveduras são microrganismos reconhecidamente mais adequados para o cultivo em fermentação no estado sólido, pois são mais adaptados ao crescimento em fase sólida, onde os valores de atividade de água ( $a_w$ ) são baixos (SINGHANIA *et al.*, 2009). Assim, bactérias eram consideradas inadequadas ao cultivo por FES devido à sua necessidade de maior quantidade de água no meio de cultivo. Atualmente, porém, alguns trabalhos têm provado que culturas bacterianas cultivadas por FES podem resultar em produções de lipases bastante ativas. Um exemplo é a lipase de *B. cepacia* LTEB11 (cepa utilizada no presente trabalho) (TABELA 1), que já foi produzida em farelo de milho adicionado de 5% de óleo de milho, obtendo-se uma atividade de hidrólise do *p*NPP (palmitato de *p*-nitrofenila) de  $108 \text{ U.gSS}^{-1}$  (unidades por grama de substrato seco) (FERNANDES *et al.*, 2007), e em farelo de semente de girassol, obtendo-se uma atividade de cerca de  $240 \text{ U.gSS}^{-1}$  (FERNANDES, 2007).

TABELA 1 – EXEMPLOS DE ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

MICROORGANISMO	MEIO DE CULTIVO	TEMPO DE CULTIVO (h)	ATIVIDADE (U.gSS <sup>-1</sup> )* E METODOLOGIA	REFERÊNCIAS
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	farelo de milho suplementado com óleo de milho	72	108 (hidrólise do pNPP**)	Fernandes <i>et al.</i> (2007)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	farelo de semente de girassol	72	240 (hidrólise do pNPP**)	Fernandes (2007)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PseA	torta de pinhão-manso	120	625 (hidrólise do pNPP**)	Mahanta, Gupta e Khare, (2008)
<i>Candida rugosa</i> DSM-2031	mistura de torta de coco e farelo de trigo	72	-	Benjamin e Pandey (2001)
<i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 18942	castanha moída suplementada com glucose, uréia, tiamina, biotina e sais	11	69 (hidrólise tributirina - pH-Stat)	Dominguez <i>et al.</i> (2003)
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 2594	torta de gergelim	72	363,6 (hidrólise do óleo de oliva)	Kamini, Mala e Puvanakrishnan (1998)
<i>Aspergillus niger</i> NCIM 1207	farelo de soja suplementado com óleo de oliva, extrato de levedura, peptona e sais	120	630 (hidrólise do pNPP**)	Mahadik <i>et al.</i> (2002)
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 2594	mistura de torta de gergelim e farelo de trigo	72	384,3 (hidrólise do óleo de oliva)	Sandana Mala <i>et al.</i> (2007)
<i>Penicillium restrictum</i>	torta de babaçu suplementado com peptona e óleo de oliva	24	30,3 (hidrólise do óleo de oliva)	Gombert <i>et al.</i> (1999)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	torta de babaçu suplementado com melaço de cana-de-açúcar	72	90 (hidrólise do pNPL***)	Gutarra <i>et al.</i> (2009)
<i>Penicillium sp.</i>	torta de soja	48	186 (hidrólise do óleo de oliva)	Vardanega <i>et al.</i> (2009)
<i>Penicillium sp.</i>	farelo de soja	48	-	Wolski <i>et al.</i> (2009)
<i>Rhizopus homothallicus</i>	bagaço de cana-de-açúcar suplementado com óleo de oliva, lactose, uréia e sais	12	1500 (hidrólise da tricaprilina - pH-Stat)	Diaz <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhizopus chinensis</i> CCTCC M201021	mistura de farelo e farinha de trigo suplementada com lactose, peptona, óleo de oliva e sais	72	24,4 (hidrólise do pNPP**)	Sun, Xu e Wang (2009)

NOTA: \*U/gSS: UNIDADES POR GRAMA DE SUBSTRATO SECO, \*\*pNPP: PALMITATO DE *p*-NITROFENILA e \*\*\* pNPL: LAURATO DE *p*-NITROFENILA

Como pode ser visualizado na TABELA 1, as atividades lipolíticas obtidas por FES variam desde valores de cerca de 20 U.gSS<sup>-1</sup> até valores bem altos como 1.500 U.gSS<sup>-1</sup>. Entretanto, a comparação entre as atividades lipolíticas obtidas é complicada, visto que diferentes metodologias são utilizadas, diferentes substratos e diferentes condições de análise (emulsificantes, pH, temperatura). As metodologias geralmente utilizadas para a determinação da atividade lipolítica são a hidrólise de ésteres de *p*-nitrofenila, que é um método colorimétrico, e a hidrólise de triacilgliceróis, que consiste em um método titulométrico, onde muitas vezes utiliza-se tituladores automáticos (pH-Stat).

### 2.3 CARACTERÍSTICAS DAS LIPASES BACTERIANAS

As características bioquímicas e moleculares de algumas lipases bacterianas estão mostradas na TABELA 2. De maneira geral, a massa molecular de lipases bacterianas varia entre 20 e 70 kDa. Lipases bacterianas apresentam a máxima atividade em valores de pH neutros ou alcalinos, e possuem estabilidade em uma ampla faixa de pH (4 a 11).

Lipases bacterianas apresentam a máxima atividade em temperaturas que variam de 30 a 60°C. Entretanto, também são relatadas exceções desta faixa de temperatura, é o caso do *Bacillus sp.* THLO27 (DHARMSTHITI; LUCHAI, 1999) e da *Burkholderia sp.* (RATHI *et al.*, 2000), que apresentam atividade máxima em 70 e 90°C, respectivamente.

A termoestabilidade das lipases é uma das características requeridas para aplicação industrial, uma vez que muitos processos usam temperaturas em torno de 50°C. Embora se tenha estudado a termoestabilidade de lipases, não há padronização das metodologias, tornando difícil a comparação e o estabelecimento de regras gerais. Além disso, a estabilidade das enzimas varia entre os gêneros, as espécies e até entre isoformas produzidas por uma mesma cepa. O que se observa na TABELA 2 é que muitas lipases são ativas a altas temperaturas (acima de 50°C), entretanto às vezes por tempos muito curtos.

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DE LIPASES BACTERIANAS

FONTE	MASSA MOLECULAR, pH E TEMPERATURA ÓTIMA	ESTABILIDADE AO pH E À TEMPERATURA	SELETIVIDADE PELO SUBSTRATO	REFERÊNCIAS
<i>Acinetobacter sp.</i> RAG-1	33 kDa; pH 9; 55 °C	ativa em temperaturas acima de 70 °C	preferência por cadeias acílicas médias (C6, C8)	Snellman, Sullivan e Colwell (2002)
<i>Bacillus subtilis</i> 168	19 kDa; pH 9,9–10,0; 35 °C	estável em pH 12; 100% de atividade residual após 30 min a 40 °C	preferência por ácidos graxos C8; 1,3 - regioespecífica	Lesuisse, Schanck e Colson (1993)
<i>Bacillus sp.</i> 398	50 kDa; pH 8,2; 65 °C	estável em pH 4 - 11 e temperaturas acima de 60 °C	tricaprilina e caproato de <i>p</i> -nitrofenila	Kim <i>et al.</i> (1994)
<i>Bacillus sp.</i> THLO27	69 kDa; pH 7; 70 °C	estável em pH 6 - 8; 80% de atividade residual após 1 h a 75 °C	preferência por ácidos graxos C4–C12; 1,3 - regioespecífica	Dharmsthiti e Luchai (1999)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	34 kDa; pH 6; 37 a 65 °C	estável em pH 5-8 por 1 h; 76% de atividade residual após 10 min a 60 °C	preferência por cadeias longas de ésteres de <i>p</i> -nitrofenila (C16)	Lima (2004)*
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25609	28 kDa; pH 9; 40 °C	estável por 12 h em pH 9 e 10; tempo de meia-vida de 46 min a 60 °C	-	Dalal <i>et al.</i> (2008)
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416	33kDa; pH 11; 60 °C	estável em pH 9-11,5; 72% de atividade residual após 1 h a 70 °C	preferência por cadeias médias de ésteres de <i>p</i> -nitrofenila (C12)	Wang, Yu e Xu (2009)
<i>Burkholderia sp.</i>	pH 11; 90 °C	estável em pH 8 -12; tempo de meia vida acima de 13 h a 90 °C	alta atividade contra óleo de mostarda e de linhaça	Rathi <i>et al.</i> (2000)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> F- 111	32 kDa; pH 6–10; 40 °C	estável em pH 6–10; estável acima de 70 °C	preferência por ésteres de <i>p</i> -nitrofenila C12 e C14	Lin <i>et al.</i> (1996)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	45 kDa; pH 8,5–9,5; 28 °C	estável em pH 5–11 por 24 h; estável a 50 °C na presença de Ca <sup>2+</sup>	alta atividade contra tributirina, tripropionina, trimiristina e caprilato de <i>p</i> -nitrofenila	Oh <i>et al.</i> (1999)
<i>Staphylococcus warneri</i> lipase 2	45 kDa; pH 7	estável em pH 6–8 por 24 h	alta atividade contra butirato de <i>p</i> -nitrofenila	Van Kampen <i>et al.</i> (2001)

NOTA: \* LIMA (2004) UTILIZOU A CEPA DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 (A MESMA UTILIZADA NESTE TRABALHO), ANTERIORMENTE IDENTIFICADA COMO *Bacillus megaterium*

Há alguns exemplos de lipases estáveis em temperaturas acima de 70°C, como as lipases de *Burkholderia sp.* (RATHI *et al.*, 2000) e *Acinetobacter sp.* RAG-1 (SNELLMAN; SULLIVAN; COLWELL, 2002).

Segundo Paques e Macedo (2006), quanto à seletividade, as lipases podem ser classificadas em três categorias: regioseletivas, tiposseletivas e enantioseletivas. Em relação à regioseletividade, as lipases podem ser regioespecíficas, hidrolisando somente ligações éster primárias (isto é, ligações nos carbonos 1 e 3 do glicerol), como por exemplo, as lipases de *B. subtilis* 168 (LESUISSE; SCHANCK; COLSON, 1993) e *Bacillus sp.* THLO27 (DHARMSTHITI; LUCHAI, 1999). As lipases tiposseletivas são seletivas em relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturação do grupo acila. A lipase de *B. cepacia* ATCC 25416 (WANG; YU; XU, 2009), por exemplo, tem preferência por cadeias médias de ésteres de *p*-nitrofenila (C12), enquanto a lipase de *B. cepacia* LTEB11 (LIMA, 2004), tem preferência por cadeias longas destes ésteres (C16). As lipases podem ainda ser enantioseletivas, quando possuem a habilidade de discriminar entre enantiômeros de uma mistura racêmica. A enantioseletividade das lipases depende largamente da estrutura do substrato, interações no sítio ativo e condições reacionais. As lipases podem ainda ser não-seletivas, atuando de forma randômica na molécula de triacilglicerol, ou podem apresentar mais de um tipo de seletividade.

## 2.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

### 2.4.1 Conceito, vantagens e técnicas de imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas é uma técnica de fixar enzimas (por meios físicos ou químicos) a suportes inertes insolúveis (VITOLLO, 2001a). Convencionalmente, enzimas são imobilizadas em matrizes sólidas, embora sejam também utilizados alguns polímeros que podem ser solúveis ou insolúveis dependendo do pH, temperatura ou adição de espécies químicas (MONDAL *et al.*, 2006).

Uma das vantagens da utilização de enzimas imobilizadas é a possibilidade de reutilização da preparação enzimática, que tem implicações no custo do processo catalisado enzimaticamente, além de possibilitar a execução de processos contínuos e a fácil separação da enzima dos produtos (SALIS *et al.*, 2005). Além disso, para o caso específico de lipases imobilizadas, muitas vezes são relatados aumentos de estabilidade térmica e ao pH e aumento da atividade enzimática.

Segundo Forde e Ó'Fágáin (2008), as técnicas de imobilização podem ser classificadas em quatro tipos básicos: ligação ao suporte, confinamento, encapsulamento e ligação inter cruzada. Os métodos classificados como "ligação ao suporte" pressupõem a ligação da enzima ao suporte por meio de ligações covalentes, iônicas ou adsorção (por interações iônicas, forças de "van de Waals", ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo ou interações hidrofóbicas), sendo esta última a mais amplamente utilizada. Os métodos baseados em confinamento da enzima envolvem a polimerização de materiais orgânicos ao redor da proteína, resultando no confinamento da enzima em uma matriz física. Apesar de ser um bom método para manter a conformação das enzimas, tem a desvantagem de dificultar a difusão dos substratos por entre os poros da matriz do suporte. O encapsulamento em meios porosos como sol-géis tem sido utilizado para melhorar a atuação de enzimas em meio orgânico. A síntese destes géis envolve a hidrólise de siloxanos, que polimerizam e condensam gerando um sólido. A enzima é adicionada ao meio reacional e é encapsulada no gel quando ele é formado. Por outro lado, os métodos baseados em ligações inter cruzadas (*crosslinking*) entre a enzima e o suporte pressupõem o estabelecimento de ligações covalentes. O reagente mais comumente utilizado para o *crosslinking* intermolecular é o glutaraldeído.

#### 2.4.2 Imobilização de lipases

Matrizes de natureza diversa têm sido utilizadas para imobilizar lipases, como por exemplo, o poliestireno (PETKAR *et al.*, 2006), o alginato (MONDAL *et al.*, 2006), a sílica gel (ZHANG; YANG; ZHU, 2005), a glioxil-agarose (PALOMO *et al.*, 2005), as resinas aniônicas (ZHAO; WEI; SONG, 2005), a alumina (LOZANO *et al.*, 2004), o polipropileno (SALIS *et al.*, 2008), a agarose (RODRIGUES *et al.*, 2008),

entre outros. Dependendo da natureza do suporte, a enzima estará “ligada” de forma diferente.

As lipases parecem ter uma tendência natural de serem adsorvidas em diferentes superfícies hidrofóbicas, como por exemplo, gotas de óleo (seu substrato natural), superfícies hidrofóbicas de suportes, bolhas de gás, proteínas hidrofóbicas e lipopolissacarídeos, embora sua hidrofobicidade, em geral, não seja maior do que a da maioria das enzimas (PALOMO *et al.*, 2005). O que ocorre é que lipases possuem “caminhos” hidrofóbicos, ou seja, resíduos de aminoácidos hidrofóbicos concentrados em uma determinada região, e que fazem com que haja uma interação desta região com o suporte hidrofóbico. Apesar dos diversos tipos de imobilização existentes, devido à hidrofobicidade relativamente alta de algumas regiões das lipases, a simples adsorção destas em suportes hidrofóbicos adequados tem sido a estratégia mais popular de imobilização deste tipo de enzima. Vários trabalhos sobre imobilização de lipases têm utilizado géis frágeis e de alto custo, baseados em matrizes hidrofílicas. Entretanto, o uso de lipases imobilizadas em tais géis restringe a sua aplicação industrial em larga escala. Lipases para a aplicação industrial precisam ser imobilizadas em suportes rígidos e estáveis (PETKAR *et al.*, 2006).

Uma vantagem da imobilização é que muitas vezes ela leva a um aumento da atividade das lipases. Persson *et al.* (2002) por exemplo, verificou uma maior atividade (400 vezes) comparada à enzima livre, quando imobilizou a lipase de *Humicola lanuginosa* em Accurel EP-100, atribuindo o resultado ao espalhamento da enzima pela ampla área superficial do suporte, prevenindo a agregação das moléculas, facilitando o acesso aos substratos.

Além disso, vários trabalhos têm mostrado que as lipases podem ser adsorvidas em suportes hidrofóbicos de forma que as áreas hidrofóbicas ao redor do sítio ativo são envolvidas na imobilização, deixando a lipase estabilizada em sua forma aberta, aumentando a atividade enzimática (MATEO *et al.*, 2007). Um exemplo é a lipase de *Mucor miehei*, que quando imobilizada em um suporte altamente hidrofóbico (*Octadecyl Sepabeads*) apresentou uma atividade 20 vezes maior do que a lipase livre (PALOMO *et al.*, 2002). Outra maneira de tentar imobilizar a lipase na sua forma aberta tem sido a imobilização na presença de detergentes. Isto pode ser obtido com lipases adsorvidas em suportes aminados. A lipase imobilizada é incubada na presença de detergentes, que estabilizam a forma aberta da lipase, e então se realiza o *crosslinking* dos grupos amino do suporte e da enzima

com o glutaraldeído, de forma a atingir uma rigidez da estrutura da enzima necessária para prevenir o movimento da tampa (MATEO *et al.*, 2007).

Outra característica bastante encontrada em lipases imobilizadas é o aumento da sua estabilidade térmica. Palomo *et al.* (2002), por exemplo, quando utilizou uma lipase de *Candida rugosa* imobilizada em um suporte hidrofóbico (*Octadecyl Sepabeads*), observou que a atividade manteve-se inalterada após 10 h a 45°C, enquanto a enzima livre foi totalmente inativada em 2 h nas mesmas condições. Uma lipase de *C. rugosa* imobilizada em polipropileno não apresentou desativação a 75°C após 2 h, enquanto a lipase livre apresentou uma atividade 50% menor nestas condições (FORESTI; ERRAZU; FERREIRA, 2005).

Por outro lado, o processo de imobilização também pode levar à inativação de certa fração de moléculas de lipase. Isto pode ocorrer devido à distorção da estrutura terciária da enzima causada pela interação enzima-suporte. Além disso, a lipase pode interagir com o suporte de forma que o sítio ativo fique escondido, impedindo que o substrato o alcance (SALIS *et al.*, 2008).

Diversos estudos de imobilização foram realizados com a lipase de *B. cepacia* LTEB11. Baron (2008) utilizou o extrato bruto obtido através de fermentação submersa deste microrganismo para a imobilização em diversos suportes: Accurel EP-100 (polipropileno em pó), Accurel EG-100 (polipropileno em *pellets*), poliestireno-divinilbenzeno em esferas, PET (politereftalato de etileno), polietileno de baixa densidade em pó, EVA (polietileno vinil acetato em *pellets*), alumina mesoporosa, sílica e HOZ-L (hidróxido de zinco-laurato). O suporte que apresentou a melhor eficiência de imobilização (100%) e melhor retenção de atividade em meio orgânico (193%) foi o Accurel EP-100, o que indica que a lipase foi eficientemente imobilizada, como também apresentou modificações estruturais favoráveis à catálise após a imobilização.

## 2.5 REATORES ENZIMÁTICOS

A princípio, quando se dispunha apenas de enzima na forma livre e solúvel, o único tipo de reator utilizável era o de batelada. Contudo, com o advento das enzimas imobilizadas, surgiu a possibilidade de utilização de outros tipos de

reatores. Segundo Vitolo (2001b), os reatores podem ser divididos em: a) reator de batelada, que geralmente ocorre em tanques, onde, terminada a reação, a enzima imobilizada pode ser separada da mistura final com relativa facilidade (filtração ou decantação, por exemplo); b) reator agitado contínuo, onde há entrada e saída contínua de fluido, e eventualmente certa quantidade de enzima pode ser arrastada no efluente, devendo-se, por isso, acoplar na saída um sistema que permita recuperá-la (filtração, por exemplo); c) reator de leito fixo, no qual a enzima imobilizada é empacotada, permanecendo estacionária, enquanto a solução de substrato é bombeada através dela; d) reator de leito fluidizado, no qual a enzima imobilizada encontra-se em suspensão no interior do reator, sendo a solução de substrato bombeada através dela.

## 2.6 BIOCATALÍSE UTILIZANDO LIPASES

Os sistemas utilizados como meios reacionais para catálise enzimática podem ser classificados em: (1) aquoso; (2) sistema aquoso-orgânico monofásico - água mais solvente orgânico miscível em água; (3) sistema aquoso-orgânico bifásico - água mais solvente orgânico imiscível em água; (4) sistema orgânico monofásico (pode ter um teor mínimo de água); (5) anidro; (6) micelas reversas; (7) sistema livre de cosolvente; (8) fase gasosa; e (9) líquidos iônicos (10) fluidos supercríticos (KRISHNA, 2002). Nos itens seguintes, serão descritos em mais detalhes os meios e sistemas reacionais que tiveram mais importância no presente trabalho.

### 2.6.1 Sistemas orgânicos

Ao contrário de muitas outras enzimas, as lipases têm mostrado altos níveis de atividade e estabilidade em meios não-aquosos (DIAZ *et al.*, 2006). Assim, elas têm sido muito utilizadas em reações de síntese nestes meios devido às vantagens que eles possuem em relação aos meios aquosos: a fácil recuperação dos substratos e produtos devido ao baixo ponto de ebulição da maioria dos solventes, a possibilidade de solubilização de substratos hidrofóbicos, o deslocamento do

equilíbrio termodinâmico a favor das reações de síntese, a possibilidade de ativação da enzima e aumento de sua estabilidade, a eliminação da possibilidade de reações laterais causadas pela água e a proteção contra contaminação microbiana (KRIEGER *et al.*, 2004, BARON *et al.*, 2005, GOTOR-FERNANDEZ; BRIEVA; GOTOR, 2006).

### 2.6.1.1 Micelas reversas

Uma micela reversa consiste de um micro-domínio aquoso que faz face às “cabeças” polares de uma molécula anfifílica, a qual rodeia este cerne, interagindo com o solvente orgânico (que se apresenta em maior quantidade) através das suas cadeias hidrofóbicas. Por isso é chamada de micela reversa, já que em um sistema micelar convencional (meio aquoso) a micela é formada de forma que as “cabeças” polares fiquem voltadas para fora (NAOE *et al.*, 2004).

Existem vários tipos de surfactantes que podem ser usados para promover a formação de micelas reversas, como por exemplo, o dioctil sulfosuccinato de sódio (AOT), o dodecil sulfato de sódio (SDS), o metil trioctil cloreto de amônio (TOMAC), a lecitina, o Tween e o Triton (CARVALHO; CABRAL, 2000). O grau de hidratação das micelas é comumente dado pelo parâmetro  $\omega_0$ , que é a razão molar entre a água e o surfactante ( $\omega_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$ ), por exemplo). A estrutura do surfactante AOT e de uma micela reversa são mostrados na FIGURA 3.

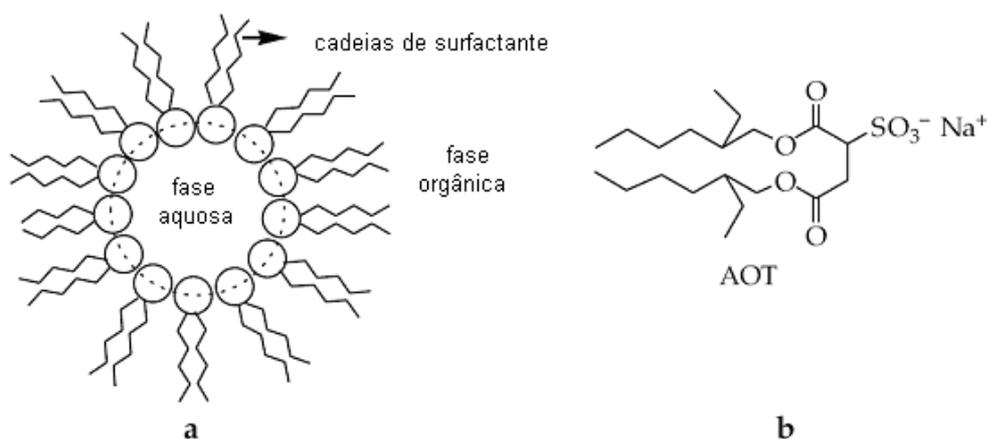


FIGURA 3 - (a) ESTRUTURA DE UMA MICELA REVERSA. (b) ESTRUTURA DO SURFACTANTE DIOCTIL SULFOSUCCINATO DE SÓDIO (AOT). FONTE: KRIEGER *et al.* (2004)

Micelas reversas têm sido utilizadas com sucesso em várias reações enzimáticas, especialmente no caso de lipases, que são ativadas na presença de uma interface, já que o sistema fornece uma ampla área interfacial, com a enzima “ancorando” no lado aquoso da interface da molécula anfifílica. Neste caso, existe ainda a vantagem de solubilização dos substratos no solvente orgânico (TALUKDER *et al.*, 2003). Além disso, como as enzimas ficam localizadas na “piscina” aquosa do interior das micelas, elas estão protegidas contra os efeitos deletérios do solvente, possuindo água suficiente para manutenção de sua estrutura cataliticamente ativa (PAVLIDIS *et al.*, 2009).

A grande desvantagem da utilização das micelas reversas é a dificuldade de recuperação do produto em larga escala devido à presença do surfactante e outros componentes do sistema, como proteína e água (KRIEGER *et al.*, 2004).

#### 2.6.1.2 Sistema livre de cossolvente

Outro sistema que tem sido muito utilizado em reações de esterificação e transesterificação utilizando lipases é o chamado “meio livre de cossolvente”, onde o meio reacional é constituído apenas pelos substratos da reação e o biocatalisador (FORESTI; ALIMENTI; FERREIRA, 2005; GIRALDO *et al.*, 2007). A utilização de lipases (e também de outras enzimas) para síntese em meios livres de cossolventes apresenta a vantagem de maximização da concentração dos substratos, evitando-se o custo do solvente inerte e de sua remoção no final da reação (FORESTI; ALIMENTI; FERREIRA, 2005), o que torna estes processos mais econômicos e menos impactantes para o meio ambiente (ZNIDARSIC-PLAZL; PLAZL, 2009). Este tipo de sistema tem sido empregado com bons rendimentos (acima de 92%) para reações de esterificação (CHANG; WU, 2007; GIRALDO *et al.*, 2007; ABDULLAH; SULAIMAN; KAMARUDDIN, 2009) e reações de transesterificação para produção de biodiesel (ISO *et al.*, 2001; SALIS *et al.*, 2005; HAJAR *et al.*, 2009).

### 2.6.1.3 Fatores que influenciam a atividade das lipases em meios orgânicos

#### 2.6.1.3.1 Influência do solvente

A estratégia mais interessante para a síntese de ésteres utilizando lipases é realizar a reação em sistema livre de cossolvente orgânico. Entretanto, quando isso não é possível, a escolha de um solvente adequado é de primordial importância (VILLENEUVE, 2007).

Muitas tentativas têm sido feitas para correlacionar as propriedades dos solventes orgânicos com o desempenho de uma enzima com o intuito de poder prever a influência do solvente na catálise enzimática. Entre os parâmetros listados com este propósito estão a constante dielétrica, o momento de dipolo, o logaritmo do coeficiente de partição bifásico *n*-octanol/água ( $\log P$ ), entre outros, sendo este último o mais utilizado (GRUNWALD, 2009).

Deve-se escolher um solvente inerte no qual os substratos sejam solúveis e a enzima seja ativa e não seja rapidamente desativada. Este é geralmente o caso de solventes com valores de  $\log P$  altos, como por exemplo, *n*-hexano e *n*-heptano. Estes solventes são amplamente utilizados em reações catalisadas por lipases. Entretanto, em geral, eles não são apropriados para reações onde dois substratos diferem muito entre si em termos de polaridade. Neste caso, solventes de média polaridade são frequentemente escolhidos (VILLENEUVE, 2007).

Os solventes orgânicos hidrofóbicos são conhecidos por proteger as enzimas da desnaturação por altas concentrações de álcoois, como o metanol e o etanol, quando estes são substratos da reação. Por outro lado, solventes orgânicos hidrofílicos costumam interagir fortemente com a camada essencial de água que envolve a enzima, desnaturando-a (ANTCZAK *et al.*, 2009). Entretanto, solventes hidrofílicos podem levar a altas conversões por se misturar ao álcool quando este é um dos substratos, reduzindo a concentração do álcool ao redor da enzima, evitando a desnaturação. Isso ocorre especialmente quando o solvente é polar, mas aprótico, não tendo, portanto, uma forte tendência de retirar a água de solvatação da enzima (FU; VASUDEVAN, 2009).

### 2.6.1.3.2 Influência da quantidade de água

Em reações em meios não aquosos, apesar de o meio reacional conter principalmente solvente orgânico e os substratos, alguma quantidade de água é necessária para manter a enzima ativa. As moléculas de água são essenciais porque elas promovem interações que permitem o dobramento da proteína em sua estrutura tridimensional nativa, cataliticamente ativa. Conseqüentemente, qualquer modificação nesta camada de hidratação pode promover uma redução da atividade enzimática (MA; PERSSON; ADLERCREUTZ, 2002; GAYOT; SANTARELLI; COULON, 2003; YE *et al.*, 2005). Por outro lado, em uma reação de síntese, a água na mistura reacional pode causar o deslocamento do equilíbrio da reação no sentido da hidrólise do éster (VILLENEUVE, 2007). Além disso, quando a enzima está imobilizada em um suporte hidrofílico, altas quantidades de água envolvendo a enzima podem dificultar a transferência do substrato hidrofóbico do meio reacional para a enzima (GAYOT; SANTARELLI; COULON, 2003).

Geralmente, a quantidade de água presente em um sistema é expressa em termos de atividade de água ( $a_w$ ). Os valores de  $a_w$  estão situados entre 0 e 1, sendo que na  $a_w$  de 1 já existe uma fase aquosa distinta e pura. A atividade de água é definida como a razão entre a pressão de vapor da água na amostra ( $p_w$ ) e a pressão de vapor da água pura ( $p_w^\circ$ ) (KVITTINGEN *et al.*, 1992):

$$a_w = p_w / p_w^\circ$$

Em um sistema de solventes orgânicos, a atividade de água pode ser controlada adicionando misturas de sais com um determinado teor de água ao solvente e aos substratos ou incubando separadamente a enzima, o solvente e os substratos, anteriormente ao início da reação, em cubas hermeticamente fechadas contendo soluções salinas saturadas (KVITTINGEN, 1994).

Há muitos relatos na literatura sobre o efeito da  $a_w$  na atividade catalítica de hidrolases em meios orgânicos. Estes estudos mostram que diferentes enzimas requerem diferentes atividades de água. Os casos extremos são as glicosidases, que frequentemente requerem uma atividade de água de ao menos 0,6, e as lipases, que podem ser ativas em valores muito próximos a zero (MA; PERSSON;

ADLERCREUTZ, 2002). Os melhores resultados para a maioria das lipases, entretanto, são obtidos com valores de  $a_w$  entre 0,25 e 0,45 (VILLENEUVE, 2007).

Além da enzima, a quantidade de água requerida para a máxima atividade depende também da polaridade do solvente utilizado: quanto mais hidrofílico for o solvente, mais água será necessária para atingir a atividade ótima. Isto indica que no caso dos solventes mais hidrofílicos, a enzima e o solvente competem pelas moléculas de água (GRUNWALD, 2009).

## 2.7 APLICAÇÕES DE LIPASES EM BIOCATÁLISE

As lipases são reconhecidas como o mais importante grupo de biocatalisadores em biotecnologia, devido à sua alta versatilidade, o que permite a sua aplicação em diferentes indústrias, como a alimentícia, de detergentes, farmacêutica, de couro, têxtil, cosmética e papeleira (REIS *et al.*, 2009). Assim como outras classes de enzimas, as lipases vêm sendo aplicadas em diversas áreas devido às suas vantagens em comparação com catalisadores químicos: mostram alta seletividade, atuam em condições brandas de pH e temperatura e são biodegradáveis (FORESTI; FERREIRA, 2005). Além disso, as lipases frequentemente exibem uma boa estabilidade, são ativas em uma ampla gama de solventes orgânicos e não necessitam de cofatores (BORNSCHEUER *et al.*, 2002).

A síntese de ésteres por lipases pode ser realizada por meio de reações de esterificação, interesterificação ou transesterificação (FIGURA 4).

As lipases estão entre os biocatalisadores mais utilizados na área de química orgânica (DIAZ *et al.*, 2006). Muitas pesquisas têm sido feitas utilizando lipases em reações de síntese de ésteres, como sínteses enantiosseletivas (SKOURIDOU *et al.*, 2004; LARISSEGGGER-SCHNELL *et al.*, 2006; MAJEWSKA; KAFARSKI; LEJCZAK, 2006), síntese de ésteres de aroma (ABBAS; COMEAU, 2003; KUMAR; MODAK; MADRAS, 2005), síntese de medicamentos (LOZANO *et al.*, 2004), síntese de biodiesel (SALIS *et al.*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2007), acilação de flavonóides a fim de aumentar sua hidrofobicidade (ARDHAOUI *et al.*, 2004), entre outras aplicações.

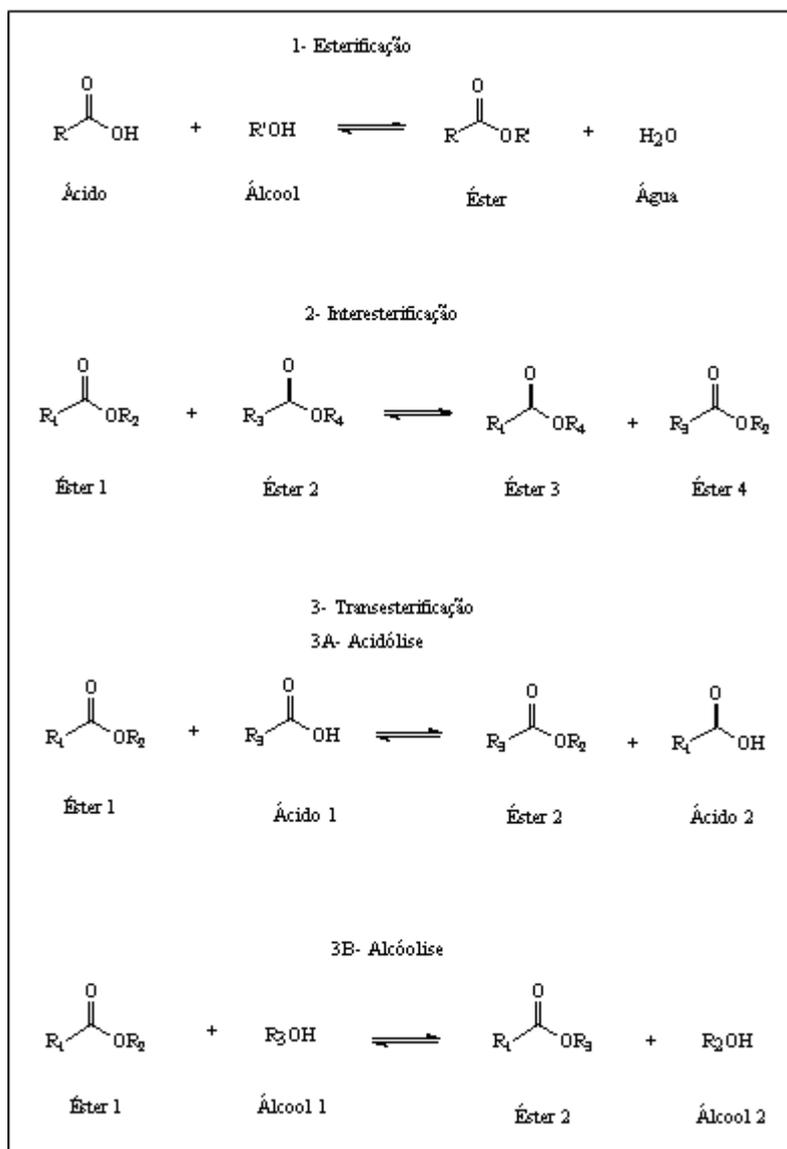


FIGURA 4 – REAÇÕES REVERSÍVEIS CATALISADAS POR LIPASES  
 FONTE: VILLENEUVE *et al.* (2000)

As lipases têm sido utilizadas com sucesso como catalisadores para a síntese de ésteres em ambientes aquo-restritos (TABELA 3). Para isso, geralmente são utilizadas lipases imobilizadas em meios que podem ou não conter cossolventes. Como pode ser observado na TABELA 3, porcentagens altas de conversão podem ser obtidas (muitas vezes acima de 90%) em tempos de reação que variam muito, dependendo da atividade e especificidade da lipase e do meio utilizado.

TABELA 3 – EXEMPLOS DE ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES UTILIZANDO LIPASES

LIPASE	SUPORTE	ÉSTER PRODUZIDO	COSSOLVENTE	REAÇÃO	TEMPO DE REAÇÃO (h)	CONVERSÃO (%)	REFERÊNCIA
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	farelo de semente de girassol	oleato de etila	<i>n</i> -heptano	esterificação	8	76	Fernandes (2007)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	farelo de milho	oleato de etila	<i>n</i> -heptano	esterificação	18	94	Fernandes <i>et al.</i> (2007)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	polipropileno em pó (Accurel EP-100)	oleato de etila	ausência	esterificação	48	76	Baron (2008)
<i>Burkholderia cepacia</i>	cerâmica (Amano)	oleato de butila	ausência	transesterificação	6	100	Salis <i>et al.</i> (2005)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	palmitato de glucose	acetona	esterificação	74	76	Chaiyaso, H-Kittikun e Zimmermann (2006)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	laurato de L-ascorbila	acetonitrila	esterificação	6,7	93	Chang <i>et al.</i> (2009)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	laurato de cinamila	tolueno	esterificação	2	60	Yadav e Dhoot (2009)
<i>Candida rugosa</i>	sílica mesoporosa	laurato de citronelila	<i>n</i> -hexano	esterificação	24	98	Abdullah, Sulaiman e Kamaruddin (2009)
<i>Candida sp.</i>	membrana têxtil	oleato de metila	<i>n</i> -hexano	transesterificação	12	81	Lu <i>et al.</i> (2009)
<i>Rhizopus chinensis</i>	ausência	caprilato de etila	<i>n</i> -heptano	esterificação	12,5	92	Sun, Xu e Wang (2009)
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	sílica	triacilgliceróis modificados	ausência	interesterificação	6	-	Silva <i>et al.</i> (2009)

Os ésteres obtidos por biocatálise podem ter diversas aplicações. Os produzidos a partir de ácidos graxos de cadeia curta têm aplicações na indústria alimentícia, de bebidas, cosméticos e medicamentos. Ésteres de ácidos graxos de cadeia longa têm sido usados como aditivos em combustíveis, alimentos, detergentes e cosméticos. Além disso, estes últimos são os principais constituintes do biodiesel (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; FERNANDES, 2007). Na indústria cosmética, por exemplo, ésteres como o miristato e o palmitato de isopropila são utilizados como emolientes em cremes e óleos de banho (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). A indústria alimentícia utiliza ésteres de aroma (ABBAS; COMEAU, 2003) e triacilgliceróis modificados, como por exemplo, triacilgliceróis enriquecidos com ácidos linoleicos conjugados (VILLENEUVE *et al.*, 2007). Vários medicamentos têm ésteres como princípio ativo ou reações de síntese de ésteres são utilizadas durante a síntese de drogas quirais (GOTOR-FERNANDEZ; BRIEVA; GOTOR, 2006). Outros tipos de ésteres que têm recebido bastante atenção por serem biodegradáveis e produzidos de fontes naturais e renováveis são os biopolímeros (poliésteres) (JAEGER; EGGERT, 2002). Alguns ésteres são também herbicidas, como o (S)-indanofan (JAEGER; EGGERT, 2002).

## 2.8 BIODIESEL

As fontes limitadas de combustíveis fósseis, o aumento do preço do petróleo e a crescente preocupação ambiental têm sido as diversas razões para a exploração de óleos vegetais para a produção de combustíveis alternativos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Segundo a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, o biodiesel é definido como um combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente os combustíveis de origem fóssil (BRASIL, 2005). No entanto, o único tipo de biodiesel já regulamentado no território brasileiro corresponde aos ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa derivados de óleos vegetais ou gordura animal (BRASIL, 2008).

O biodiesel além de originar-se de fontes renováveis também pode reduzir a emissão de poluentes no meio ambiente (JAEGER; EGGERT, 2002, KEGL, 2008), o que pode ser visualizado na FIGURA 5, muito embora possam haver controvérsias.

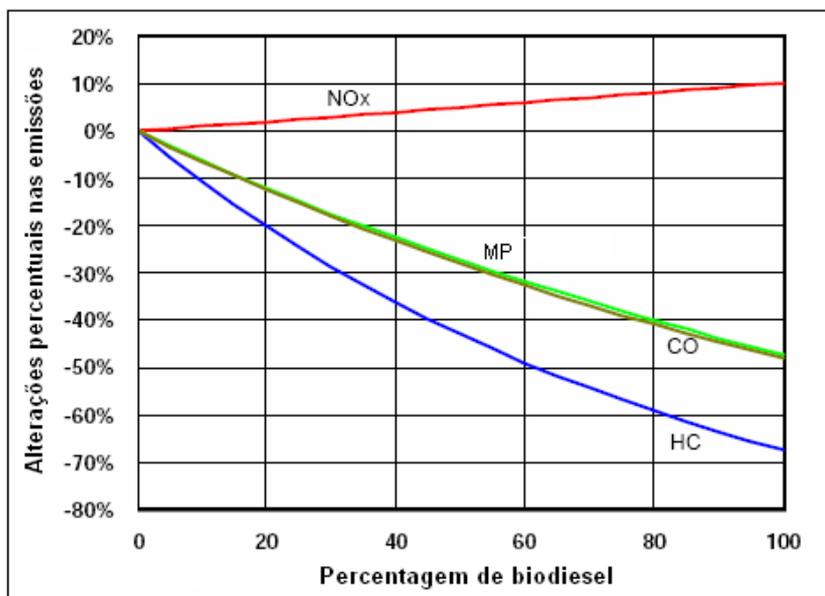


FIGURA 5 – ALTERAÇÕES NA EMISSÃO DE POLUENTES QUANDO DIFERENTES PERCENTAGENS DE BODIESEL SÃO ADICIONADAS AO DIESEL. NO<sub>x</sub>: ÓXIDOS DE NITROGÊNIO, MP: MATERIAL PARTICULADO, CO: MONÓXIDO DE CARBONO E HC: HIDROCARBONETOS

FORNTE: ASSESSMENT AND STANDARDS DIVISION (OFFICE OF TRANSPORTATION AND AIR QUALITY OF THE US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) (2002)

Uma grande disparidade de resultados tem sido encontrada na literatura no que diz respeito a emissões de poluentes em motores que utilizam o biodiesel. Isso ocorre devido a um grande número de diferentes motores testados, variações nas condições de operação e diferentes combustíveis utilizados (de fontes e qualidades diversas) (LAPUERTA; ARMAS; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, 2008). A TABELA 4 mostra a porcentagem do número de publicações que reportam aumento, redução e similaridade nas emissões de poluentes quando se utiliza biodiesel comparado à utilização do diesel.

Analisando-se a TABELA 4, observa-se que a grande maioria dos estudos mostra uma redução na emissão de poluentes gerada pelo biodiesel em comparação ao diesel. Além disso, é muito importante ressaltar que o biodiesel é praticamente um combustível neutro em relação às emissões de CO<sub>2</sub>, tendo em

vista que o CO<sub>2</sub> emitido corresponde àquele previamente fixado através da fotossíntese (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009).

TABELA 4 – PERCENTAGEM DO NÚMERO DE PUBLICAÇÕES REPORTANDO AUMENTO, REDUÇÃO E SIMILARIDADE NAS EMISSÕES DE POLUENTES QUANDO SE UTILIZA O BIODIESEL COMPARADO À UTILIZAÇÃO DO DIESEL

EMIÇÃO	AUMENTO	SIMILAR	REDUÇÃO
óxidos de nitrogênio	85	10	5
material particulado	3	2	95
hidrocarbonetos	1	3	95
monóxido de carbono	2	7	90

FONTE: LAPUERTA; ARMAS; RODRIGUEZ-FERNANDEZ (2008)

O conteúdo em energia e as propriedades físicas e químicas do biodiesel são similares ao diesel convencional, permitindo o seu uso sozinho ou em misturas com o diesel em qualquer motor a diesel sem a necessidade de modificações no sistema de ignição ou no injetor de combustível. Até o momento, o biodiesel é o único combustível alternativo que pode ser utilizado diretamente nos motores já existentes (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009).

O biodiesel pode ser constituído por ésteres sintetizados por meio de reações de esterificação ou transesterificação. Neste trabalho será abordada a síntese por reação de transesterificação, devido à produção de biodiesel industrial ser quase totalmente realizada por deste tipo de reação. A transesterificação é preferida à esterificação porque os triacilgliceróis são mais disponíveis do que os ácidos graxos livres (PINTO *et al.*, 2005). Entretanto, a produção do biodiesel por esterificação pode ser vantajosa em relação à transesterificação quando se utiliza ácidos graxos resultantes do refinamento de óleos, o que reduz o custo da matéria-prima (VIEIRA; DA SILVA; LANGONE, 2006).

A produção do biodiesel por transesterificação é realizada a partir de um triacilglicerol e um álcool (geralmente metanol ou etanol) (PARK *et al.*, 2008; RASHID; ANWAR, 2008). Para tornar isto possível, um catalisador é adicionado à reação. Nos processos industriais desenvolvidos atualmente, o catalisador é de origem química (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007). O co-produto glicerol formado na reação pode ser recuperado e purificado e tem amplas aplicações nas

indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética e de plásticos (HAAS *et al.*, 2006; BOUAID; MARTINEZ; ARACIL, 2007).

Os triacilgliceróis necessários para a produção do biodiesel podem ser provenientes de diversas fontes, como óleos vegetais (refinados, brutos ou utilizados em fritura), gordura animal e óleo de microalgas (CHISTI, 2007; RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008). Óleos com diferentes composições em ácidos graxos influenciam na qualidade do biodiesel produzido. O biodiesel produzido a partir de óleos com alto teor de ácidos graxos insaturados são menos viscosos e solidificam a temperaturas mais baixas, o que torna esse biodiesel mais adequado para utilização em temperaturas baixas. Entretanto, este biocombustível será mais susceptível à oxidação, terá um menor índice de cetano (relacionado à qualidade de ignição) e menores calores de combustão. Os álcoois mais frequentemente utilizados como aceptores de grupamentos acila são, particularmente o metanol e, em menor extensão o etanol. O metanol é mais utilizado por ser mais barato e mais reativo. Por outro lado, o etanol é menos tóxico e é renovável, ao contrário do metanol, que é atualmente produzido principalmente de fontes fósseis não-renováveis, como o gás natural. Outros álcoois também podem ser utilizados, como o propanol, butanol, isopropanol, *t*-butanol, entre outros, entretanto o seu custo é mais elevado (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009).

Os catalisadores utilizados para a produção de biodiesel podem ser classificados como: (a) básicos (como hidróxido de sódio ou potássio), (b) ácidos (como o ácido sulfúrico, fosfórico ou clorídrico), (c) catalisadores heterogêneos inorgânicos (como o óxido de cálcio ou magnésio) e (d) catalisadores enzimáticos (lipases). Atualmente, praticamente todo o biodiesel é produzido por processo alcalino (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009). Entretanto, a catálise alcalina possui diversos problemas: o consumo de energia é muito alto, a recuperação do co-produto é difícil e o catalisador alcalino solúvel precisa ser removido do produto (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006, VASUDEVAN; BRIGGS, 2008, FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009). Assim, a necessidade de tratamento do efluente alcalino gerado e o alto consumo de água durante a lavagem nos passos de purificação faz com que o processo alcalino tenha um impacto significativo no meio ambiente. Além disso, se o óleo contém pequenas quantidades de ácidos graxos livres, como os óleos provenientes de fritura de alimentos, por exemplo, há a formação de sabões (sais de ácidos graxos), o que leva a uma redução no

rendimento da reação, além de dificultar o processo de purificação. Óleos contendo ácidos graxos livres são melhor esterificados com catalisadores ácidos. Não há a formação de sabão, mas altas temperaturas e altas razões molares entre os substratos (acima de 30:1) são necessárias (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009). Entretanto, catalisadores ácidos são raramente utilizados em escala industrial devido à sua alta corrosividade, além de catalisar reações mais lentamente e com menores rendimentos quando comparados aos catalisadores básicos (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007).

### 2.8.1 Processos catalisados por lipases

A TABELA 5 mostra as vantagens e desvantagens da utilização das lipases para síntese do biodiesel em comparação ao processo alcalino.

TABELA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE O PROCESSO ENZIMÁTICO E O PROCESSO ALCALINO CONVENCIONAL PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

PROBLEMA	PROCESSO ENZIMÁTICO	PROCESSO ALCALINO
presença de ácidos graxos livres no óleo	ácidos graxos livres são transformados em biodiesel	ácidos graxos livres são transformados em sabão
presença de água no óleo	não é deletério para a lipase	pode hidrolisar o óleo, formando mais sabão
conversão em biodiesel <sup>a</sup>	alto, geralmente em torno de 90%	alto, geralmente >96%
recuperação do glicerol	fácil, glicerol de alta qualidade	complexa, glicerol de baixa qualidade
recuperação e reutilização do catalisador	fácil	difícil ou inviável
custo energético	baixo, faixa de temperatura entre 20-50 °C	médio, faixa de temperatura entre 60-80 °C
custo da catálise	alto	baixo
impacto ambiental	baixo	médio, efluentes alcalinos e salinos são gerados
produtividade do processo <sup>b</sup>	baixo	alto

FONTE: ROBLES-MEDINA *et al.* (2009)

NOTA: <sup>a</sup> PERCENTAGEM DO ÓLEO INICIAL TRANSFORMADO EM BIODIESEL

<sup>b</sup> MASSA DE BIODIESEL PRODUZIDA POR VOLUME DO REATOR E POR UNIDADE DE TEMPO

A transesterificação enzimática utilizando lipases tem potencial para superar os problemas da catálise alcalina. Enzimas não formam sabões e podem esterificar os ácidos graxos livres, o glicerol pode ser facilmente recuperado sem tratamento complexo, o consumo de energia no processo é mais baixo, há uma drástica redução na quantidade de efluentes e as enzimas podem ser reutilizadas (HARDING *et al.*, 2008; FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009; HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009). Além disso, a presença de água nas matérias-primas não é deletéria para as lipases, enquanto em um processo alcalino, a água pode hidrolisar o óleo, formando sabão (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009). A produção enzimática de biodiesel é possível utilizando tanto lipases extracelulares quanto lipases intracelulares. No caso das lipases intracelulares, as células inteiras podem ser imobilizadas (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008).

Assim, vários estudos têm sido realizados utilizando lipases para a produção de biodiesel. Alguns exemplos podem ser visualizados na TABELA 6, incluindo alguns onde se utilizou a lipase de *B. cepacia* LTEB11.

Na maioria dos trabalhos publicados, a transesterificação é realizada em reatores de batelada, onde a enzima é dispersa no meio reacional por meio de agitação em tanques reatores. Apenas alguns grupos têm realizado a transesterificação em reatores de leito fixo (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009). Alguns exemplos são mostrados na TABELA 7.

Como pode ser visto nas TABELAS 6 e 7, os trabalhos publicados mostram a utilização de suportes diversos, como resinas, géis e polímeros. O biocatalisador mais utilizado é a lipase de *C. antarctica* imobilizada em resina acrílica, uma lipase altamente ativa comercializada pela Novozymes com o nome de Novozym 435. Com relação aos substratos, o álcool mais empregado é o metanol, sendo também bastante utilizados o etanol, o *n*-propanol e o *n*-butanol. Os óleos empregados são de diversas fontes, como soja, oliva, milho e óleos provenientes de fritura de alimentos. Entre os cossolventes, o *n*-hexano e o *t*-butanol são uns dos mais empregados, mas muitos autores já vêm utilizando sistemas livres de cossolvente. As conversões relatadas variam desde as mais baixas, como 40% até 100%, o que ocorre também com os tempos de reação, que vão desde 1 h até mais de 100 h.

TABELA 6 - EXEMPLOS DE ESTUDOS DE SÍNTESE DE BIODIESEL UTILIZANDO LIPASES EM REATORES DE BATELADA (continua)

LIPASE	SUPORTE	ÁLCOOL	ÓLEO	COSSOLVENTE	CONVERSÃO (%)	TEMPO (h)	REFERÊNCIA
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	farelo de milho	etanol	milho	<i>n</i> -heptano	95	120	Fernandes <i>et al.</i> (2007)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	polipropileno em pó (Accurel EP-100)	etanol	mamona	ausência	96	8	Baron (2008)
<i>Burkholderia cepacia</i>	ausência	metanol	soja	ausência	80	90	Kaieda <i>et al.</i> , (2001)
<i>Burkholderia cepacia</i>	gel hidrofóbico	metanol	soja	ausência	67	1	Noureddini, Gao e Philkana (2005)
<i>Burkholderia cepacia</i>	gel hidrofóbico	etanol	soja	ausência	65	1	Noureddini, Gao e Philkana (2005)
<i>Burkholderia cepacia</i>	terra diatomácea (PS-D Amano)	<i>n</i> -butanol	trioleína	ausência	100	4	Salis <i>et al.</i> (2005)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	<i>n</i> -butanol	trioleína	ausência	40	50	Salis <i>et al.</i> (2005)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	metanol	soja	<i>t</i> -butanol	66	12	Ha <i>et al.</i> (2007)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	metanol	semente de algodão	<i>t</i> -butanol	97	24	Royon <i>et al.</i> (2007)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	etanol	soja	ausência	~100	7	Hernandez-Martin e Otero (2008)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	metanol	proveniente de fritura	ausência	89	4	Maceiras <i>et al.</i> (2009)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	metanol	girassol	ausência	99	50	Ognjanovic, Bezbradica e Knezevic-Jugovic, (2009)

TABELA 6- EXEMPLOS DE ESTUDOS DE SÍNTESE DE BODIESEL UTILIZANDO LIPASES EM REATORES DE BATELA (conclusão)

LIPASE	SUPORTE	ÁLCOOL	ÓLEO	COSSOLVENTE	CONVERSÃO (%)	TEMPO (h)	REFERÊNCIA
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	metanol	palma	<i>t</i> -butanol	92	10	Talukder <i>et al.</i> (2009)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	caulinite	<i>n</i> -propanol	trioleína	ausência	100	10	Iso <i>et al.</i> (2001)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	polipropileno em pó (Accurel MP-1004)	metanol	soja	ausência	96	49	Salis <i>et al.</i> (2008)
<i>Rizhomyces miehei</i>	resina aniônica	metanol	soja	<i>n</i> -hexano	92	6	Shieh, Liao e Lee (2003)
<i>Rizhomyces miehei</i>	resina aniônica	metanol	trioleína	<i>n</i> -hexano	96	24	Soumanou e Bornscheuer (2003)
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	matriz de silicato	etanol	oliva	ausência	77	24	Hsu <i>et al.</i> (2004)
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	sílica	metanol	proveniente de fritura	ausência	95	105	Yagiz, Kazan e Akin (2007)
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	sílica	metanol	milho	<i>t</i> -butanol	85	12	Wang, Wu e Zong (2008)

TABELA 7 - EXEMPLOS DE ESTUDOS DE SÍNTESE DE BIODIESEL UTILIZANDO LIPASES EM REATORES DE LEITO FIXO

LIPASE	SUPORTE	ÁLCOOL	ÓLEO	COSSOLVENTE	CONVERSÃO (%)	TEMPO (h)	SISTEMA	REFERÊNCIA
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	metanol	mistura de óleo de soja e colza	ausência	93	-	contínuo	Watanabe <i>et al.</i> (2000)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	metanol	proveniente de fritura	ausência	90	-	contínuo	Watanabe <i>et al.</i> (2001)
<i>Candida sp.</i>	membrana têxtil	metanol	proveniente de fritura	éter de petróleo	92	22	contínuo	Nie <i>et al.</i> (2006)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	metanol	semente de algodão	<i>t</i> -butanol	100	24	descontínuo	Royon <i>et al.</i> (2007)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	metanol	semente de algodão	<i>t</i> -butanol	95	-	contínuo	Royon <i>et al.</i> (2007)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	metanol	soja	<i>n</i> -hexano e <i>t</i> -butanol	75	0,5	contínuo	Shaw <i>et al.</i> (2008)
<i>Candida sp.</i>	membrana têxtil	metanol	proveniente de fritura	<i>n</i> -hexano	91	-	contínuo	Chen <i>et al.</i> , (2009)
<i>Candida Antarctica</i>	resina acrílica + esponja vegetal	metanol	canola	ausência	99	72	descontínuo	Hajar <i>et al.</i> (2009)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	metanol	proveniente de fritura	<i>t</i> -butanol	79	-	contínuo	Halim, Kamaruddin e Fernando (2009)
<i>Candida Antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	etanol	soja	propano comprimido	70	-	contínuo	Dalla Rosa <i>et al.</i> (2009)
<i>Rhizomucor mihei</i>	resina aniônica	1-butanol	girassol	<i>n</i> -hexano	95	-	contínuo	Dossat, Combes e Marty (1999)
<i>Rhizopus oryzae</i>	espuma de poliuretano	metanol	soja	ausência	91	50	descontínuo	Hama <i>et al.</i> (2007)

NOTA: OS TEMPOS DE REAÇÃO QUE NÃO ESTÃO NA TABELA NÃO FORAM MENCIONADOS NOS ARTIGOS

A produção do biodiesel em escala industrial utilizando lipases, no entanto, não tem sido adotada principalmente devido ao alto custo do biocatalisador, especialmente quando enzimas comerciais são utilizadas (LI; DU; LIU, 2007; RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008). Por este motivo, encontrar processos que reduzam o custo de aplicação do processo enzimático torna-se importante. A reutilização do biocatalisador pode ser uma das possibilidades na tentativa de reduzir o custo do processo biocatalítico. Isto pode ser possível pela imobilização das enzimas em suportes sólidos, as quais permitem também a utilização de processos contínuos (SALIS *et al.*, 2005). Outra alternativa seria produzir lipases ao invés de utilizar as lipases comerciais disponíveis. Além de reduzir o custo do biocatalisador, existem outros desafios que precisam ser superados: são frequentemente reportados baixos rendimentos (menores do que 70%) (SALIS *et al.*, 2005; HA *et al.*, 2007) ou tempos de reação muito longos (maiores do que 90 h) (YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007; KAIEDA *et al.*, 2001) e muitos processos utilizam solventes, que precisam ser removidos do produto, aumentando o custo do processo, além de dificultar a recuperação do produto (LI *et al.*, 2006; ROYON *et al.*, 2007; WANG; WU; ZONG, 2008). Outros problemas frequentemente relatados em relação à síntese do biodiesel usando lipases é a desnaturação da enzima quando em contato com o álcool e a inibição pelo glicerol formado durante a reação (VYAS; VERMA; SUBRAHMANYAM, 2010).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise da Universidade Federal do Paraná e no *Laboratoire de Lipotechnie*, no CIRAD (*Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement*), Montpellier, França, durante um estágio sanduíche de 7 meses, período durante o qual foram desenvolvidos os experimentos de transesterificação em leito fixo.

O fluxograma da estrutura do trabalho é mostrado na FIGURA 6.

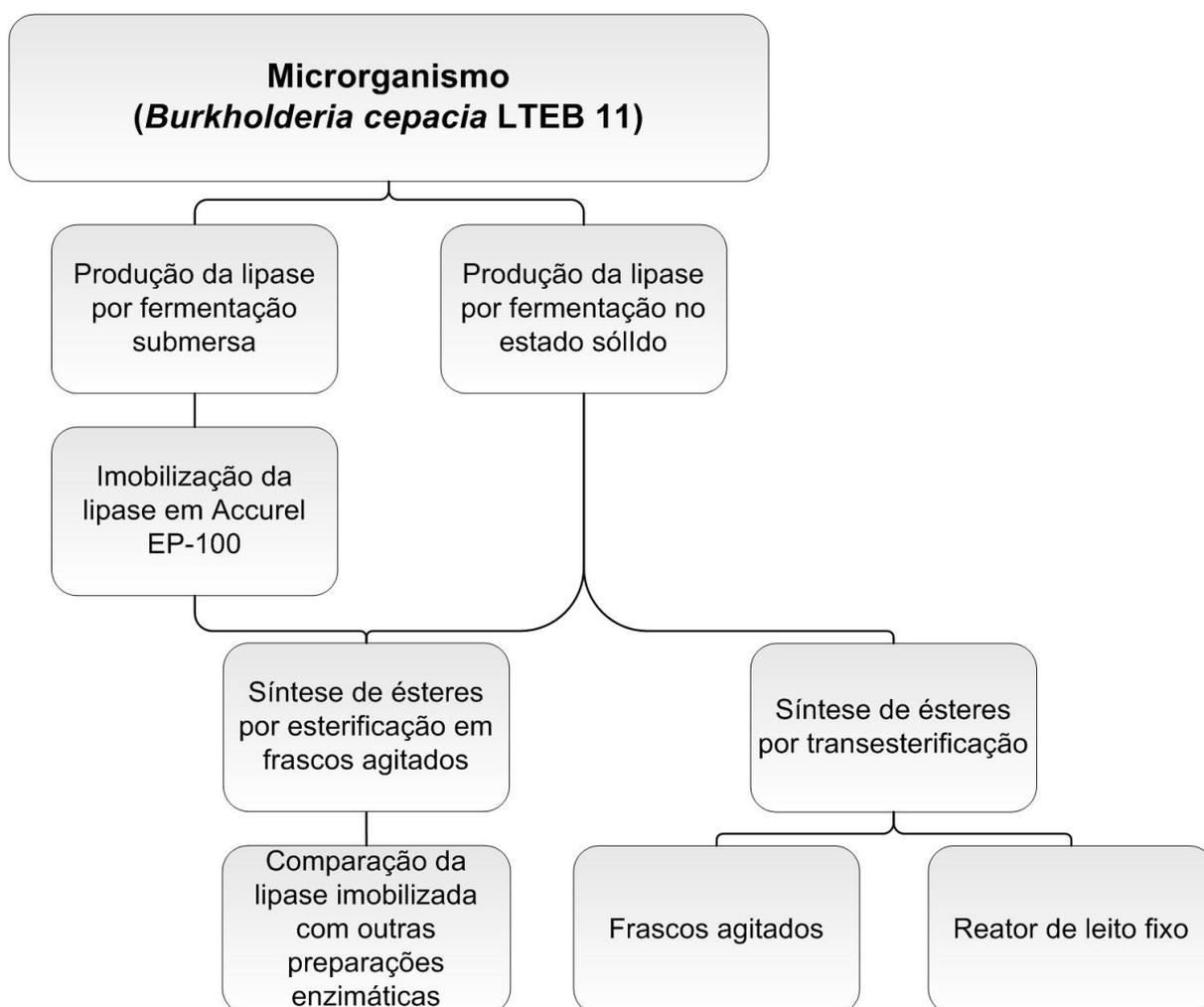


FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DA ESTRUTURA DO TRABALHO

## 3.1 PRODUÇÃO DA LIPASE

### 3.1.1 *Microorganismo*

O microrganismo utilizado foi a cepa de *Burkholderia cepacia* LTEB11 isolada no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise e caracterizada pelo IRD (ex-ORSTOM), Laboratoire de Microbiologie, Université de Provence, CESB/ESIL, Marseille, França. A cepa foi preservada em meio Luria Bertani (LB) com 40% (v/v) de glicerol a -18 °C.

#### 3.1.1.1 Preparação do inóculo

Para produzir o inóculo para as fermentações submersa e no estado sólido, 1 mL da solução estoque foi inoculado em 50 mL de meio LB em frasco Erlenmeyer de 250 mL e incubado a 29 °C e 200 rpm em agitador orbital até atingir uma absorbância de 0,8 no comprimento de onda de 600 nm, o que corresponde a um ponto inserido na fase exponencial de crescimento da bactéria (FERNANDES, 2007).

### 3.1.2 *Fermentação submersa*

Para a fermentação submersa, 1 mL da cultura crescida em meio LB (descrita em 3.1.1.1) foi inoculada em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL do meio composto de (em g.L<sup>-1</sup>): KNO<sub>3</sub> - 3,54; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 1,0; MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O - 0,5; NaCl - 0,38; FeSO<sub>4</sub>. 7 H<sub>2</sub>O - 0,01; extrato de levedura - 5 e 1% (v/v) de óleo de oliva. As culturas foram incubadas em agitador orbital a 200 rpm e 29 °C por 72 h (LIMA *et al.*, 2004).

### 3.1.3 Fermentação no estado sólido

#### 3.1.3.1 Substratos

Diversos substratos foram utilizados para a fermentação: torta de soja (Cocamar Cooperativa Agroindustrial, Maringá, Paraná), torta de milho (Caramuru Alimentos, Apucarana, Paraná), torta de mamona (A. Azevedo Indústria e Comércio de Óleos Ltda, São Paulo), bagaço de cana-de-açúcar (Usina de Álcool Melhoramentos, Jussara, Paraná). A farinha integral de girassol, aqui denominada de “farelo de semente de girassol”, foi preparada pela moagem de sementes adquiridas em mercado local, seguido de tamisação para obtenção de partículas de tamanho entre 0,85 e 1,7 mm. As sementes foram moídas em moinho de facas e após a tamisação o farelo continha a seguinte composição (em percentagem de massa): lipídios 25,9%; proteínas 18,0%; carboidratos totais - incluindo fibras 45,7%; e fibras 28,5%.

O bagaço de cana-de-açúcar (composto por: lipídios 0,5%; carboidratos solúveis menos de 0,1%; proteínas 0,9%, fibras 88,2%, umidade 9,0% e resíduo mineral fixo 2,0%), foi lavado por três vezes com água e seco a 60°C por 24 h. Foi então utilizado individualmente ou em misturas com o farelo de semente de girassol (50:50, 70:30 e 90:10, bagaço: farelo de semente de girassol, m/m).

A composição dos substratos farelo de semente de girassol e o bagaço de cana-de-açúcar foi realizada pelo CEPPA (Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da UFPR). O farelo de semente de girassol foi analisado segundo os métodos do Instituto Adolfo Lutz (2005). Para o bagaço de cana-de-açúcar, a umidade, resíduo mineral fixo e lipídios foram analisados segundo os métodos do Instituto Adolfo Lutz (2005), proteínas e fibras segundo os métodos da *Association of Analytical Communities* (AOAC) (2005) e os carboidratos calculados de acordo com a Resolução RDC n° 360 de 23 de dezembro 2003 (BRASIL, 2003).

### 3.1.3.2 Condições de crescimento do microrganismo

Os cultivos em estado sólido foram feitos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g de substrato. As tortas de soja e mamona (com 1% m/m de lipídios) e milho (com 1,4% m/m de lipídios), dados fornecidos pelo fabricante, foram adicionadas de óleo de soja comercial (Sadia), de modo a atingir 5% (m/m) de teor lipídico. Em seguida, os substratos foram adicionados de tampão fosfato ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,0) a fim de obter 55% (m/m) de umidade para as tortas (FERNANDES, 2007) e 75% (m/m) para o bagaço de cana-de-açúcar e suas misturas com farelo de semente de girassol (RODRIGUEZ *et al.*, 2006). O bagaço de cana-de-açúcar absorve muita água e, por isso, adicionou-se mais água a este substrato e suas misturas com farelo de semente de girassol do que aos outros substratos. A umidade dos substratos isolados e das suas misturas, após a adição da solução tampão, foi confirmada por um analisador de umidade Gehaka IV 2000, que consiste em uma combinação de uma balança semi-analítica e um secador por infravermelho. Pesou-se 8 g da amostra, que foi analisada a  $110^\circ\text{C}$  até massa constante (cerca de 30 min).

Os frascos foram autoclavados a  $121^\circ\text{C}$  por 20 min, inoculados com 1 mL do inóculo preparado como descrito em 3.1.1.1 e incubados em estufa bacteriológica a  $29^\circ\text{C}$ . O experimento foi realizado em triplicata para cada substrato e foram realizados controles sem o inóculo.

### 3.1.3.3 Extração da lipase para determinação da atividade lipolítica

O acompanhamento da produção da lipase ao longo do tempo de cultivo foi realizado pela determinação da atividade lipolítica do extrato obtido a partir do material fermentado. A cada intervalo de tempo, três frascos de cada substrato foram sacrificados. A enzima foi extraída do material fermentado adicionando-se aos frascos 50 mL (no caso das tortas) ou 100 mL (para o bagaço de cana-de-açúcar e misturas com farelo de semente de girassol) de solução de NaCl 2% (m/v). A mistura de sólido fermentado e a solução extratora foram mantidas em agitador orbital

durante 1 h, a 200 rpm e 29 °C (FERNANDES, 2007). O material foi filtrado em gaze e o sólido foi prensado manualmente para extração do líquido, que continha a lipase. O extrato resultante foi centrifugado a 10.000×g durante 10 min a 4 °C em centrífuga refrigerada (Jouan BR4). O sobrenadante assim obtido foi utilizado para determinação da atividade enzimática pelo método de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) em meio aquoso (item 3.4.1.1). A atividade lipolítica foi expressa com base na massa inicial de sólido seco a partir do qual o extrato foi preparado (unidades por grama de substrato seco – U.gSS<sup>-1</sup>).

### 3.2 BIOCATÁLISE UTILIZANDO A LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Para os estudos de biocatálise em reações de esterificação em meios aquo-restritos, foram utilizadas três preparações enzimáticas obtidas a partir do extrato bruto contendo a lipase de *B. cepacia* LTEB11 produzido por fermentação submersa: (1) extrato lipolítico bruto liofilizado e adicionado diretamente ao meio reacional; (2) extrato lipolítico bruto liofilizado e ressuspenso em tampão e adicionado em sistema micelar AOT (dioctilsulfosuccinato de sódio) 100 mmol.L<sup>-1</sup> em *n*-heptano, e (3) lipase imobilizada em Accurel EP-100 adicionada ao meio reacional.

#### 3.2.1 Preparação do extrato lipolítico

Após 72 h de fermentação, tempo no qual a atividade lipolítica foi máxima (LIMA *et al.*, 2004), o cultivo foi interrompido e centrifugado a 10.000×g por 10 min a 4 °C para a separação das células. O extrato bruto foi precipitado com sulfato de amônio (80% de saturação) em banho de gelo, e mantido sob agitação a 4 °C por 12 h. Centrifugou-se o extrato a 10.000×g por 10 min a 4 °C e o precipitado foi ressuspenso em volume mínimo de tampão fosfato pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup> e dialisado por 12 h contra o mesmo tampão a 4 °C, utilizando uma membrana de exclusão de 14.000 Da (o tampão foi trocado 2 vezes). O material foi armazenado a 4 °C, com a

adição de 0,02% (m/v) de azida sódica. No extrato lipolítico bruto, determinou-se a atividade lipolítica de hidrólise pelo método do *p*NPP em meio aquoso (item 3.4.1.1) e proteínas pelo método de Bradford (item 3.4.3). O extrato apresentou uma atividade de 60 U. mg<sup>-1</sup> e foi utilizado em toda esta etapa de trabalho.

### 3.2.2 Imobilização da lipase em Accurel EP 100

#### 3.2.2.1 Procedimento de imobilização

O procedimento de imobilização no suporte hidrofóbico de polipropileno Accurel EP-100<sup>®</sup> (Membrana GmbH, Obernburg, Germany) seguiu o proposto por Al-Duri e Yong (2000). O suporte foi inicialmente imerso em etanol por 30 min e então lavado com uma mistura água-etanol 50% (v/v) e em seguida com água destilada. O extrato lipolítico obtido como descrito em 3.2.1 foi adicionado ao suporte em proporções e condições requeridas em cada experimento. A mistura foi mantida em agitador orbital, a 200 rpm, 25°C. O suporte foi então removido da mistura por filtração a vácuo em papel de filtro qualitativo, seco em dessecador a vácuo por 16 h a 4°C e então armazenado a 4°C.

#### 3.2.2.2 Determinação da quantidade de proteína a ser imobilizada

Estudou-se a quantidade de enzima no suporte diluindo-se o extrato lipolítico em tampão e misturando-o ao suporte para a imobilização (de forma que o volume de extrato lipolítico foi sempre o mesmo), o que resultou em concentrações de 3,5 a 56 mg de proteína oferecidas por g de suporte. As misturas foram mantidas sob agitação orbital por 35 h. Após filtração e secagem dos suportes (item 3.2.2.1), determinou-se a atividade de cada porção de suporte com diferentes quantidades de proteína, a fim de verificar qual a quantidade de proteína deveria ser utilizada para que a atividade fosse máxima. A determinação foi realizada por meio da hidrólise do *p*NPP em meio de solvente orgânico (item 3.4.1.2), para evitar a dessorção da

enzima do suporte. Foi feito um controle sem adição do suporte, mantido nas mesmas condições de imobilização, a fim de se verificar a perda de atividade devido à agitação durante o processo de imobilização.

### 3.2.2.3 Cinética de imobilização

Após a determinação da quantidade de proteína no suporte na qual a atividade da enzima imobilizada foi máxima, foi estudado o tempo de contato entre a enzima e o suporte necessário para a máxima imobilização. A cinética de imobilização foi seguida pelo desaparecimento da atividade lipolítica e de proteínas no sobrenadante da mistura de extrato bruto e suporte. Foram realizados experimentos separados de imobilização com diferentes tempos: 2, 6, 12, 21, 25 e 35 h. Após cada experimento, o suporte foi separado da mistura por filtração a vácuo em papel de filtro qualitativo e lavado duas vezes com tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7 para a retirada do material não adsorvido no suporte. Determinou-se a atividade residual no sobrenadante e no tampão de lavagem pelo método de hidrólise do pNPP em meio aquoso (item 3.4.1.1) e quantidade de proteínas pelo do método de Bradford (item 3.4.3).

A eficiência da imobilização (E) foi calculada pela da equação (YADAV; JADHAV, 2005):

$$E = (At_i - At_f) \cdot 100 / At_i$$

onde:

At<sub>i</sub>: Atividade inicial total de hidrólise frente ao pNPP no extrato bruto antes da imobilização (U).

At<sub>f</sub>: Atividade final total de hidrólise frente ao pNPP no sobrenadante e tampão de lavagem após a imobilização (U).

### 3.2.3 Secagem e delipidação das preparações enzimáticas

O extrato lipolítico (item 3.2.1) foi liofilizado por 24 h a 0,1 mbar e -45°C em um liofilizador Jouan LP3. Este extrato liofilizado e a lipase imobilizada em Accurel EP-100 foram delipidados a fim de remover os lipídios derivados da fermentação, para evitar interferências nas reações de esterificação. Para isso, uma mistura de clorofórmio e butanol (9:1) foi adicionada às preparações enzimáticas. A mistura foi agitada por 10 min a 200 rpm a 25°C e então filtrada a vácuo em papel de filtro qualitativo, para a separação do biocatalisador. O filtrado foi analisado por CCD (cromatografia em camada delgada) conforme descrito em 3.4.4. O processo foi repetido até que não fossem mais detectados lipídios na placa de CCD. O extrato lipolítico liofilizado e a lipase imobilizada em Accurel EP-100 foram secos em dessecador a vácuo por 16 h e armazenados a 4°C.

O extrato lipolítico liofilizado e delipidado foi utilizado diretamente nas reações de síntese (por adição direta no solvente) ou ressuspenso em tampão fosfato, pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup>, no caso do encapsulamento em micelas reversas.

### 3.2.4 Procedimento padrão para reações de esterificação em *n*-heptano

As reações de esterificação foram realizadas utilizando-se 5 mL de meio orgânico (solução micelar ou *n*-heptano, ambos contendo a enzima), 70 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido oleico e 210 mmol.L<sup>-1</sup> de etanol (58% e 99,5% respectivamente, ambos marca Synth). Dado o baixo grau de pureza do ácido oleico, referiu-se ao produto de reação como “ésteres” e não como “oleato de etila”, visto que o reagente é composto também por outros ácidos graxos. O álcool utilizado nas reações foi previamente seco com sulfato de sódio anidro. A razão molar entre os substratos foi escolhida com base em estudos prévios (FERNANDES *et al.*, 2004). A mistura foi mantida em agitador orbital a 200 rpm a 37°C e a reação foi acompanhada em diferentes intervalos de tempo pela retirada de alíquotas de 100 µL do meio reacional, que foram analisadas quanto ao seu teor de ácido graxo residual pelo método de Lowry-Tinsley (1976), como descrito no item 3.4.2.1. A conversão em éster foi calculada

pelo do consumo de ácidos graxos do meio reacional. Foram realizados também controles sem a adição da lipase e com a adição do Accurel EP-100 sem a lipase imobilizada.

### 3.2.5 *Comparação entre diferentes preparações enzimáticas em reações de esterificação*

Os sistemas reacionais estudados foram obtidos por adição de diferentes preparações do biocatalisador ao *n*-heptano: (a) adição da enzima liofilizada (b) adição da enzima imobilizada e (c) encapsulamento em micelas reversas. Para este último procedimento, o extrato bruto liofilizado foi ressuspenso em tampão fosfato pH 7,0, 50 mmol.L<sup>-1</sup>. Esta solução (45 µL) foi injetada na solução micelar, sob forte agitação em vórtex, para formar 5 mL de solução micelar. O sistema micelar continha 100 mmol.L<sup>-1</sup> AOT (dioctil sulfosuccinato de sódio) em *n*-heptano com um  $W_0$  ([H<sub>2</sub>O]/[AOT]) de 5. Este sistema e este  $W_0$  já haviam sido utilizados com bons resultados para a síntese de ésteres (FERNANDES *et al.*, 2004). A concentração de proteínas foi ajustada para fornecer uma atividade total no meio reacional de 70 U (atividade de hidrólise, método do *p*NPP em meio aquoso, item 3.4.1.1) para todas as preparações. Os experimentos foram realizados de acordo com o item 3.2.4.

### 3.2.6 *Reações de esterificação utilizando a lipase de Burkholderia cepacia LTEB11 imobilizada em Accurel EP-100*

#### 3.2.6.1 *Influência da concentração de lipase imobilizada adicionada ao meio reacional*

As reações de esterificação foram realizadas nas condições descritas no item 3.2.4, com diferentes quantidades da enzima imobilizada: 100, 170, 300 e 450 mg, correspondentes, respectivamente, a 140, 232, 410 e 615 unidades totais de

atividade no meio reacional (atividade de hidrólise do pNPP em meio aquoso - item 3.4.1.1).

### 3.2.6.2 Influência da atividade de água ( $a_w$ ) inicial no meio reacional

A reação de esterificação foi realizada em diferentes valores de  $a_w$  iniciais. Para tanto, a enzima imobilizada foi liofilizada por 12 h, e, em seguida, para atingir o valor de  $a_w$  requerido, foram incubados a enzima imobilizada, o solvente e os substratos separadamente a 20°C, durante 48 h, em presença de diferentes soluções salinas saturadas (MA; PERSSON; ADLERCREUTZ, 2002), de acordo com a FIGURA 7. Os sais empregados foram LiCl ( $a_w$  0,11),  $Mg(NO_3)_2$  ( $a_w$  0,53) e  $KNO_3$  ( $a_w$  0,95). Como controle, foi realizada uma reação utilizando a enzima seca em dessecador por 16 h, sem controle da  $a_w$  inicial.

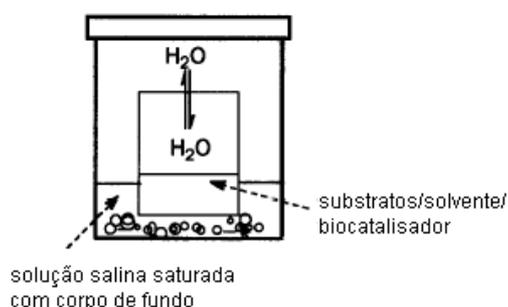


FIGURA 7 – CONTROLE DA ATIVIDADE DE ÁGUA POR PRÉ-EQUILÍBRIO DOS SUBSTRATOS, SOLVENTE E BIOCATALISADOR SEPARADAMENTE EM SOLUÇÕES SALINAS SATURADAS. FONTE: KVITTINGEN (1994)

Foram realizadas análises termogravimétricas (TG) da enzima imobilizada com a finalidade de correlacionar a quantidade de água com o valor de  $a_w$ , e assim, fazer-se também o controle de  $a_w$  inicial, ou seja, a verificação da confiabilidade do método de equilibrar o material imobilizado com diferentes soluções salinas. As análises foram realizadas usando um equipamento Mettler-Toledo TGA/SDTA851 e Software STARE. Amostras de 6 mg da enzima imobilizada em Accurel EP-100 foram adicionadas em um cadinho de alumina, que foi mantido em forno sob

atmosfera de  $O_2$  a  $15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A faixa de aquecimento foi de 25 a  $850^\circ\text{C}$ , usando gradiente de temperatura de  $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

### 3.2.6.3 Comparação entre a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 e a lipase de *Burkholderia cepacia* comercial imobilizadas

A lipase de *B. cepacia* comercial (Lipase PS Amano SD, Amano, Japão) foi imobilizada em Accurel EP-100 nas mesmas condições que a lipase de *B. cepacia* LTEB11. Imobilizou-se a mesma quantidade de unidades de atividade lipolítica (determinada pela hidrólise do *p*NPP em meio aquoso – item 3.4.1.1), e ambas as preparações foram utilizadas para a reação de esterificação. Para isso, utilizou-se 450 mg das lipases imobilizadas, 5 mL *n*-heptano,  $70 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido oleico e  $210 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de etanol. O meio reacional foi incubado a  $37^\circ\text{C}$  e 200 rpm.

### 3.2.6.4 Reutilização da lipase imobilizada

Repetições da reação de esterificação foram realizadas utilizando a mesma preparação de enzima imobilizada. Utilizou-se 170 mg da lipase imobilizada, 5 mL de *n*-heptano,  $70 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido oleico e  $210 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de etanol. Não foi realizado controle de  $a_w$  e a mistura foi mantida em agitador orbital a 200 rpm e  $37^\circ\text{C}$  durante 6 h.

A cada utilização, o biocatalisador era separado do meio reacional por filtração, lavado com *n*-heptano e seco em dessecador a vácuo por cerca de 16 h a  $4^\circ\text{C}$ . Esse procedimento foi repetido por 25 vezes. A cada vez que a amostra foi reutilizada, ela foi pesada e o volume do solvente e dos reagentes da reação foram corrigidos para um valor proporcional à quantidade do biocatalisador, visto que ocorreram pequenas perdas do material no processo. As conversões após cada reação foram expressas em relação à conversão obtida no primeiro ciclo.

Paralelamente ao estudo de reutilização da lipase imobilizada, realizou-se um controle, utilizando para a reação de esterificação amostras do biocatalisador imobilizado não submetidas à reutilização, a fim de verificar a perda de atividade

durante o armazenamento a 4°C, uma vez que estes experimentos foram realizados ao longo de 50 dias.

### 3.3 BIOCATÁLISE UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11

#### 3.3.1 *Produção e caracterização do sólido fermentado*

O sólido fermentado utilizado nestes experimentos foi produzido por fermentação da mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de semente de girassol (50:50 m/m) com umidade de 75%, a 29°C durante 96 h e apresentou uma atividade de hidrólise de  $234 \pm 11 \text{ U.gSS}^{-1}$ , determinada pelo método do pNPP em meio aquoso.

O sólido fermentado foi liofilizado por 24 h a 0,1 mbar e -45°C em um liofilizador Jouan LP3, e então delipidado (como descrito 3.2.3) a fim de remover os lipídios derivados da fermentação. O material foi então moído em moinho de facas e tamisado para obter partículas com tamanhos entre 0,63 mm e 2 mm.

#### 3.3.2 *Quantificação de lipídios no sólido fermentado*

Antes de iniciar as reações de síntese de ésteres, determinou-se a quantidade de lipídios remanescentes no sólido fermentado delipidado e não-delipidado, a fim de verificar a eficiência do método de delipidação, visto que lipídios remanescentes no sólido poderiam interferir nas reações. Para isso utilizou-se um extrator de lipídios Dionex ASE 200. As condições foram: temperatura de 50°C, pressão de 100 bar e éter de petróleo como solvente. Pesou-se cerca de 2,5 g de amostra e extraiu-se com 24 mL de solvente. A determinação foi realizada em triplicata.

### 3.3.3 *Comparação entre a lipase de Burkholderia cepacia LTEB11 immobilizada em Accurel EP-100 e o sólido fermentado*

Reações de esterificação foram realizadas nas condições otimizadas para a lipase immobilizada em Accurel EP-100 para fins de comparação das eficiências das duas preparações enzimáticas em termos de conversão em éster e tempo para a máxima conversão. As condições foram: 5 mL *n*-heptano, 70 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido oleico e 210 mmol.L<sup>-1</sup> de etanol. O meio reacional foi incubado a 37°C e 200 rpm. Utilizou-se 170 mg de cada preparação. Foi realizado um controle utilizando o sólido fermentado autoclavado. O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.3.4 *Efeito do etanol na atividade lipolítica do sólido fermentado*

Considerando que o etanol é um dos substratos das reações de síntese de ésteres utilizados neste trabalho, e que este álcool geralmente apresenta um efeito inibitório sobre a atividade enzimática (AL-ZUHAIR; LING; JUN, 2007; TRUBIANO; BORIO; ERRAZU, 2007), determinou-se a atividade lipolítica do sólido fermentado na reação de hidrólise da tributirina (sem emulsificante) em presença de diferentes concentrações de etanol no meio. Para tanto, utilizou-se o método titulométrico, como descrito no item 3.4.1.3, e substituiu-se parte do meio aquoso por etanol (Synth 99,5%) na faixa de 0 a 50% (v/v) de etanol no meio reacional. O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.3.5 *Estabilidade da atividade lipolítica do sólido fermentado*

Para o estudo da estabilidade da atividade lipolítica, incubou-se 1 g do sólido fermentado em 25 mL de etanol (99,5%) ou em solução tampão fosfato 0,5 mol.L<sup>-1</sup>, respectivamente, por 24 h em agitador orbital a 30°C, 180 rpm. Após o tempo de incubação, retirou-se o sólido do meio por filtração a vácuo em papel de filtro qualitativo, secou-se em dessecador a vácuo por 16 h a 4°C e determinou-se

sua atividade lipolítica pela reação de hidrólise da tributirina (sem emulsificante) pelo método titulométrico (item 3.4.1.3). O experimento foi realizado em triplicata.

### *3.3.6 Reações de transesterificação em frascos agitados*

Em frascos hermeticamente fechados, 30 mmol de óleo de soja (Sadia) ou mamona (Sigma-Aldrich) foram misturados com quantidades de álcool (metanol ou etanol - 100% e 99,5% respectivamente, ambos Synth) de modo a obter razões molares álcool:óleo de 3:1 a 12:1. A composição do óleo de soja foi determinada segundo item 3.4.5 e apresentou como ácidos graxos (em percentagem m/m): palmítico 11,5; esteárico 3,6; oleico 27,2; linoleico 52,5 e linolênico 5,2. A massa molecular calculada para o óleo de soja foi de 871,34 g/mol. A massa molecular do óleo de mamona foi considerada 926,72 g/mol. O etanol foi previamente seco com sulfato de sódio anidro. Em alguns casos, adicionou-se água (de 0,5 a 10%, m/m total dos substratos) ao meio reacional. As reações foram iniciadas com a adição de 1,5 g de sólido fermentado (equivalentes a 36 U de atividade de hidrólise de óleo de soja). Os frascos foram incubados em agitador orbital a 180 rpm. Em intervalos fixos de tempo, alíquotas do meio reacional (cerca de 100 mg) foram coletadas, secas com sulfato de sódio anidro e adicionadas de clorofórmio, que continha heptadecanoato de metila como padrão interno e analisadas por cromatografia gasosa, de acordo com o item 3.4.2.2.

Foram estudados os efeitos da temperatura (37 e 50°C) (estes experimentos foram realizados em duplicata), da razão molar álcool:óleo (3:1, 6:1, 9:1 e 12:1) e do teor de água no meio reacional (0,5; 1,0; 5,0 e 10,0% m/m total dos substratos). Foram realizados controles utilizando o sólido fermentado autoclavado.

### *3.3.7 Reações de transesterificação em reator de leito fixo*

Utilizou-se um reator de leito fixo (1,7 cm de diâmetro interno e 10 cm de altura) contendo 3 g de sólido fermentado (equivalente a 72 U de atividade de hidrólise de óleo de soja). O meio reacional consistiu de 24 mmol de óleo de soja

(Sigma-Aldrich) e 72 mmol de etanol (Carlo Erba – 99.8%), o que corresponde a 20,9 e 3,3 g, respectivamente. A composição do óleo de soja foi determinada segundo item 3.4.5 e apresentou como ácidos graxos (em percentagem m/m): palmítico 11,0; esteárico 4,2; oleico 22,7; linoleico 54,7 e linolênico 7,4. A massa molecular calculada para o óleo foi de 872,18 g/mol. O etanol foi previamente seco com sulfato de sódio anidro. A mistura reacional foi continuamente recirculada em um fluxo ascendente pelo do reator, utilizando-se uma bomba peristáltica (FIGURA 8). Todo o sistema foi mantido em estufa para a manutenção da temperatura requerida no experimento. Em diferentes intervalos de tempo, alíquotas de cerca de 10 mg do meio reacional foram coletadas do topo do reator e adicionadas de clorofórmio (obtendo-se uma concentração de cerca de 5 mg.mL<sup>-1</sup>). As soluções clorofórmicas foram secas com sulfato de sódio anidro e filtradas com filtro Millipore de tamanho de poro de 0,45 µm e analisadas por cromatografia gasosa, como descrito no item 3.4.2.2.



FIGURA 8 – REATOR DE LEITO FIXO UTILIZADO PARA REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO, CONTENDO O SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO PELA *Burkholderia cepacia* LTEB11 E OS SUBSTRATOS ÓLEO DE SOJA E ETANOL. O REATOR POSSUI 1,7 cm DE DIÂMETRO INTERNO E 10 cm DE ALTURA.

Foram estudados os efeitos dos seguintes parâmetros na velocidade da reação de transesterificação:

- (a) Temperatura de reação (37, 46 e 50 °C);
- (b) Adição do etanol em etapas - o álcool foi adicionado ao meio reacional em uma, duas ou três alíquotas iguais durante a reação. Quando adicionado em mais de uma etapa, a adição foi realizada quando a conversão começava a desacelerar (quando adicionado em uma etapa, todo o etanol foi adicionado no início da reação; quando em duas etapas, nos tempos 0 e 7 h e quando em três etapas, nos tempos 0; 22,5 e 49 h);
- (c) teor de água no meio reacional (0; 0,5; 1,0 e 2,0%, m/m total dos substratos);
- (d) velocidade do fluxo (0,25; 0,5; 1 e 2 mL.min<sup>-1</sup>).

#### 3.3.7.1 Reutilização do sólido fermentado

A reação de síntese do biodiesel foi repetida por nove vezes utilizando-se a mesma porção de sólido fermentado, ao longo de um período de 18 dias. Após cada reação, o produto foi escoado do reator, o sólido fermentado foi retirado e o excesso de material adsorvido na sua superfície foi removido por absorção em papel de filtro. O sólido foi então reutilizado para a síntese do biodiesel, como descrito no item 3.3.7. As reações foram realizadas a 50 °C, com adição de etanol em duas etapas, 1% de água (m/m total dos substratos) e fluxo de 1,5 mL.min<sup>-1</sup> durante 47 h (tempo necessário para que a reação entrasse em equilíbrio). As conversões após cada reação foram expressas em relação à conversão obtida no primeiro ciclo.

#### 3.3.7.2 Determinação da atividade residual do sólido fermentado após a reutilização

Após o estudo de reutilização do sólido fermentado, realizou-se a lavagem do sólido com *n*-hexano e em seguida com clorofórmio (foram realizadas 5 lavagens de 25 mL para cada solvente). Secou-se o sólido em capela à temperatura ambiente e determinou-se sua atividade lipolítica residual pelo método titulométrico (item 3.4.1.3), utilizando-se como substratos a tributirina, tricaprilina e trioleína.

### 3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.4.1 Determinação da atividade lipolítica

Para a determinação da atividade lipolítica utilizou-se três métodos: Método da hidrólise do *p*NPP em meio aquoso, Método da hidrólise do *p*NPP em meio orgânico e Método titulométrico.

##### 3.4.1.1 Método da hidrólise do *p*NPP em meio aquoso

Este método foi utilizado para determinar (a) a atividade lipolítica do extrato produzido por fermentação submersa e seguir a cinética de imobilização em Accurel EP-100 e (b) determinar a atividade do extrato lipolítico produzido a partir do sólido fermentado, a fim de seguir a cinética de produção da lipase por fermentação do estado sólido.

O método foi inicialmente descrito por Winkler e Stuckmann (1979) sendo modificado por Krieger (1995). Baseia-se na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol, de coloração amarela é seguida a 410 nm (FIGURA 9).

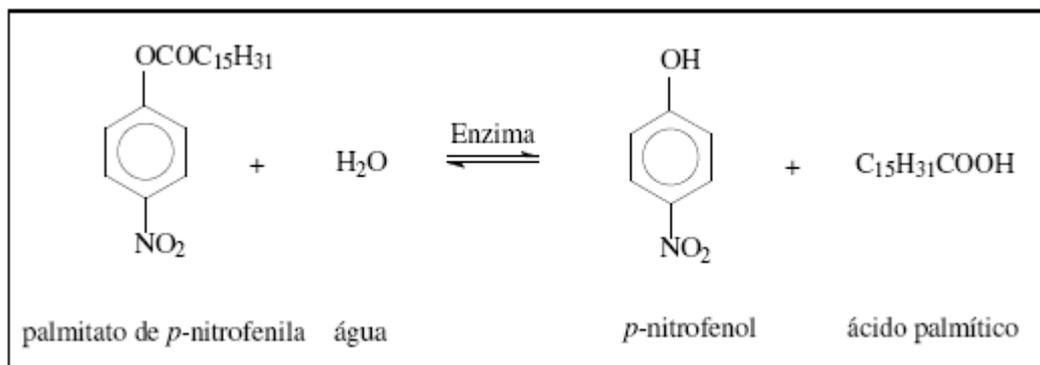


FIGURA 9 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO PALMITATO DE *p*-NITROFENILA POR LIPASES

Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de *p*NP (*p*-nitrofenol) por minuto. A atividade enzimática foi calculada a partir do coeficiente de absorvidade molar do *p*-nitrofenol, obtido a partir de uma curva de calibração do *p*-nitrofenol nas mesmas condições do ensaio. O coeficiente de absorvidade molar do *p*NP em pH 7,0 ( $9,78 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura. A determinação da atividade foi realizada a 37°C.

#### 3.4.1.2 Método da hidrólise do *p*NPP em meio orgânico

Este método foi utilizado para a determinação da atividade lipolítica da lipase imobilizada em Accurel EP-100, para evitar a eluição da enzima para o meio reacional.

Este método é uma adaptação do anterior, que permite quantificar o *p*-nitrofenol (*p*NP) produzido pela hidrólise enzimática do *p*NPP em meio orgânico (*n*-heptano) pela extração do *p*NP do meio orgânico para um meio aquoso básico (PENCREACH; BARATTI, 1996). Amostras de 100  $\mu\text{L}$  foram coletadas em intervalos de tempos diferentes e adicionadas a 1,8 mL de NaOH ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e 200  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Após a agitação em vórtex por 30 s, a amostra foi centrifugada a  $6.000 \times g$  por 10 min. Fez-se a leitura da fase aquosa a 410 nm. Os cálculos de concentração tiveram por base a curva de calibração do *p*NP, preparada nas mesmas condições do ensaio. A determinação da atividade foi realizada a 37°C. A definição de U é a mesma do item anterior (3.4.1.1).

#### 3.4.1.3 Método titulométrico

Este método foi utilizado para determinar a atividade do sólido fermentado liofilizado e delipidado pela de sua direta adição ao meio reacional. A determinação da atividade de lipases por titulometria (DIAZ *et al.*, 2006) baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis, na reação de hidrólise.

Dois diferentes meios reacionais foram utilizados. O primeiro meio continha 2,5 mmol.L<sup>-1</sup> de tampão Tris-HCl pH 7,0; 150 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl; 2 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> e 66 mmol.L<sup>-1</sup> de substrato (tributirina, tricaprilina ou trioleína), emulsificados com 3% (m/v) de goma arábica. A tributirina foi utilizada também adicionada diretamente no tampão Tris-HCl 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 7,0 com 150 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl (sem emulsificante). O segundo meio continha 100 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl; 1,9 mmol.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> e 3,3% v/v de óleo de soja emulsificado com 0,3% (m/v) de goma arábica.

Para cada ensaio, 20 mL de meio reacional e 0,25 g de sólido fermentado liofilizado e delipidado foram adicionados ao vaso de reação termostatizado (37 °C) com agitação magnética. A liberação de ácidos graxos livres foi monitorada durante 5 min por titulação, utilizando-se uma solução de NaOH 50 mmol.L<sup>-1</sup> em um titulador automático (Metrohm 718 Stat Titrino). Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 µmol de ácidos graxos por minuto, sob as condições do ensaio. A atividade lipolítica foi expressa com base na massa de sólido seco adicionado ao meio reacional (unidades por grama de substrato seco – U.gSS<sup>-1</sup>).

### 3.4.2 Métodos de análise das reações de esterificação e transesterificação

#### 3.4.2.1 Método de Lowry-Tinsley

Este método (LOWRY; TINSLEY, 1976) foi utilizado para quantificar o teor residual de ácidos graxos durante a reação de esterificação. Trata-se de um método colorimétrico que mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons Cobre II e os ácidos graxos livres, solúveis em fase orgânica (FIGURA 10). A concentração de ácido graxo no meio foi relacionada à absorvância por uma curva de calibração feita com ácido oleico em *n*-heptano nas mesmas condições do ensaio.

Para o ensaio, adicionou-se 100 µL da amostra a ser analisada em tubos de ensaio contendo 1,15 mL de tolueno. Após agitação em vórtex por 20 s, adicionou-se o reativo de cor (250 µL), que consiste em uma solução aquosa de acetato de

cobre II (5%), com pH 6,0-6,2 acertado previamente com piridina. A mistura foi agitada em vórtex por 20 s e centrifugada por 10 min a 3.000×g para separação das fases. A absorbância da fase orgânica foi lida a 715 nm.

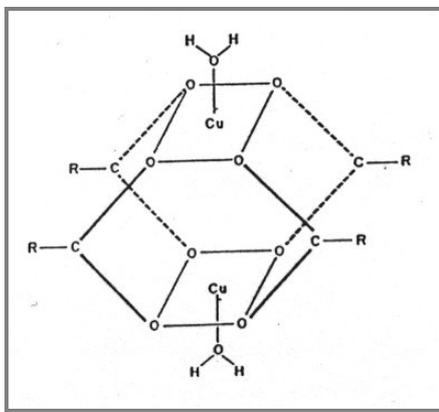


FIGURA 10 - ESTRUTURA DO COMPLEXO FORMADO ENTRE O ÍON  $\text{Cu}^{2+}$  E OS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM SOLUÇÃO

#### 3.4.2.2 Cromatografia Gasosa (CG)

Para os estudos de síntese do biodiesel em frascos agitados, as análises por cromatografia gasosa foram realizadas em um cromatógrafo Varian CP 3800, equipado com uma coluna Chrompack CP-SIL 5 CB (100% dimetilpolisiloxano), 60 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 1,00  $\mu\text{m}$  de espessura. As condições de análise foram: volume de injeção de 1  $\mu\text{L}$ , detector por ionização em chama a 300 °C, injetor a 250 °C, gás de arraste (He) 1 a 1,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , razão de *splitting* de 1/5 a 1/100. A programação de temperatura foi a seguinte: 10 min a 250 °C, 250 °C a 280 °C (20 °C. $\text{min}^{-1}$ ), 15 min a 280 °C.

Para as análises das reações de síntese do biodiesel em reator de leito fixo utilizou-se um cromatógrafo gasoso Fisons GC 8000 equipado com uma coluna HP1 SIM DIST (100% dimetilpolisiloxano), 15 m de comprimento, 0,52 mm de diâmetro interno e 0,15  $\mu\text{m}$  de espessura. As condições de análise foram: volume de injeção de 1  $\mu\text{L}$ , detector por ionização em chama a 350 °C, gás de arraste (He) a 7  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A programação de temperatura foi de 150 a 330 °C (10 °C. $\text{min}^{-1}$ ), 10 min a 330 °C.

### 3.4.3 *Quantificação de proteínas*

A dosagem de proteínas no extrato lipolítico produzido por fermentação submersa foi realizada de acordo com o método proposto por Bradford (1976). A concentração de proteínas foi calculada a partir de uma curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina (BSA).

### 3.4.4 *Cromatografia em camada delgada (CCD)*

A cromatografia em camada delgada foi realizada com os filtrados obtidos da delipidação das preparações enzimáticas a fim de verificar a presença de lipídios remanescentes no material após a delipidação. Utilizou-se placas de sílica gel (Merck), a fase móvel foi *n*-hexano: éter etílico: ácido acético 70:29:1 e a placa foi revelada com iodo. Trioleína e ácido oleico (Sigma-Aldrich) foram utilizados como padrões.

### 3.4.5 *Preparação e análise de ésteres metílicos de ácidos graxos*

Para análise da composição e cálculo da massa molecular dos óleos de soja Sigma-Aldrich e Sadia utilizados nas reações de transesterificação, foi realizada a metilação dos óleos (como descrito abaixo), e em seguida, analisou-se os ésteres metílicos por cromatografia gasosa.

Para a preparação dos ésteres metílicos do óleo de soja da marca Sigma-Aldrich, seguiu-se a norma NF T60-233 da *Association Française de Normalization* (AFNOR) (1977). Para isso, foram introduzidos em um balão 50 mg do óleo de soja e 3 mL de uma solução de metilato de sódio. O balão foi submetido a refluxo por 10 min. Adicionou-se então 3 mL de metanol hidrocloreídrico ao balão até a descoloração da fenolftaleína contida no reagente. O balão foi submetido a refluxo novamente por 10 min. Após o resfriamento da mistura, adicionou-se 8 mL de *n*-hexano e 10 mL de água destilada. Para análise por cromatografia gasosa, 1 µL da

fase orgânica solução foi injetada em um cromatógrafo gasoso Agilent 6890 equipado com uma coluna Supelcowax 10 de 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. As condições de análise foram: detector por ionização em chama a 270 °C, injetor a 250 °C, gás de arraste (He) 2 mL.min<sup>-1</sup>, razão de splitting 1/100. A programação de temperatura foi a seguinte: 2 min a 185 °C, 185 °C a 225 °C (4 °C.min<sup>-1</sup>), 3 min a 225 °C.

Para a preparação dos ésteres metílicos do óleo de soja da marca Sadia foram introduzidos em um balão, 10 mg do óleo de soja e 3 mL de uma solução de hidróxido de potássio. O balão foi aquecido a 60 °C por 15 min, sob agitação. Após resfriamento, adicionou-se 5 mL de BF<sub>3</sub> metanólico, sendo aquecido novamente por 3 min. Após novo resfriamento adicionou-se 8 mL de solução saturada de NaCl e 3 mL de *n*-hexano (HARTMANN; LAGO, 1973). Para análise por cromatografia gasosa, 1 µL da fase orgânica foi injetada em um cromatógrafo gasoso Varian 450-GC equipado com uma coluna CPWAX -57CB de 50 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,2 µm de espessura de filme. As condições de análise foram: detector por ionização em chama a 300 °C, injetor a 250 °C, gás de arraste (He) 3 mL.min<sup>-1</sup>, split razão de 1/20. A programação de temperatura foi a seguinte: 30 min a 200 °C.

#### 3.4.6 Dosagem de glicerol

O teor de glicerol no produto da reação de síntese do biodiesel em reator de leito fixo foi determinado pelo método de Soloni (1971) e por cromatografia gasosa.

O glicerol aderido ao sólido fermentado foi determinado pelo método de Soloni (1971). Para isso, o sólido fermentado foi adicionado de água destilada (2 g de sólido e 30 mL de água) e mantido em agitador orbital a 200 rpm, 25 °C por 15 min, e então dosou-se o glicerol no sobrenadante.

### 3.4.6.1 Método de Soloni

O teor de glicerol resultante da reação de transesterificação foi determinado pelo método químico de Soloni (1971), publicado em livro de técnicas laboratoriais (MOURA *et al.*, 1998). O fundamento do método baseia-se na oxidação do glicerol a formaldeído pelo metaperiodato de sódio. O formaldeído resultante reage com acetilacetona, em presença de amônia, formando um complexo de cor amarela (3,5-diacetil-1,4-diidrolutidina) (FIGURA 11), que é medido fotometricamente a 410 nm.

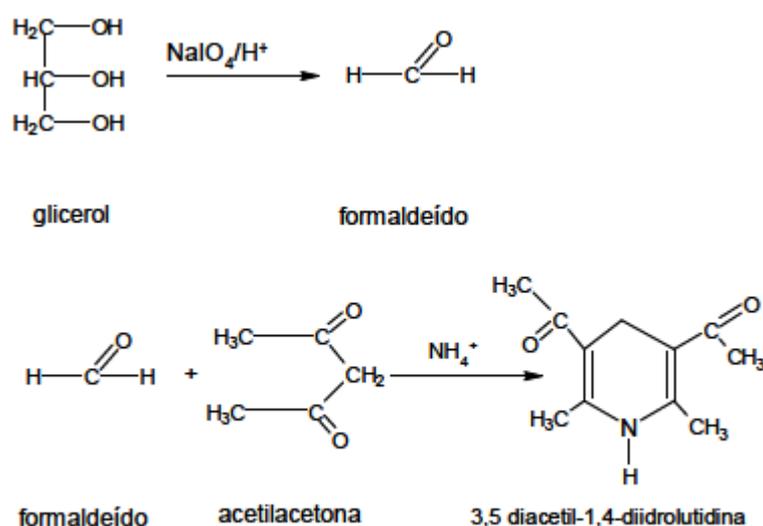


FIGURA 11 – REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO COMPOSTO COLORIMÉTRICO 3,5 DIACETIL-1,4-DIIDROLUTIDINA NO MÉTODO DE SOLONI

Em tubo de ensaio, misturou-se 0,25 mL amostra e 0,25 mL do reativo oxidante (solução de metaperiodato de sódio 0,86 mg.mL<sup>-1</sup> em ácido sulfúrico 1,4 mol.L<sup>-1</sup>). O tubo foi mantido em banho-maria a 56°C por 10 min. Acrescentou-se 2,5 mL do reativo cromogênio (solução de acetato de amônio (77 mg.mL<sup>-1</sup>), arsenito de sódio (4,9 mg.mL<sup>-1</sup>) e acetilacetona (4 µL.mL<sup>-1</sup>) em água destilada). Homogeneizou-se por inversão e deixou-se o tubo de ensaio em banho-maria a 56°C por mais 10 min. Resfriou-se e leu-se em espectrofotômetro a 410 nm. A concentração do glicerol foi calculada a partir de uma curva de calibração com o glicerol.

### 3.4.6.2 Cromatografia Gasosa

O método cromatográfico de dosagem do glicerol utilizado baseia-se na transformação do glicerol em derivados sililados mais voláteis na presença de piridina e N-Metil-N-trimetil-sililtrifluoracetamida, de acordo com a norma BS EN 14105:2003, *British Standards Institution* (BSI) (2003).

A 100 mg de amostra foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  de uma solução de butanotriol em piridina ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e 100  $\mu\text{l}$  de uma solução de tricaprina em piridina ( $8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (padrões internos). Então, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de N-Metil-N-trimetil-sililtrifluoracetamida, sendo o frasco agitado e armazenado por 15 min a temperatura ambiente. Adicionou-se então 8 mL de *n*-heptano.

Para análise por cromatografia gasosa, 1  $\mu\text{L}$  da fase orgânica foi injetado em um cromatógrafo gasoso Shimadzu equipado com uma coluna 100% dimetilpolisiloxano de 10 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,1  $\mu\text{m}$  de espessura. As condições de análise foram: detector por ionização em chama a 380°C e gás de arraste He. A programação de temperatura foi a seguinte: 1 min a 50°C, 50°C a 180°C ( $15^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), 180°C a 230°C ( $7^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), 230°C a 370°C ( $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), 5 min a 370°C.

Utilizou-se como padrões externos o glicerol, monoleína, dioleína e trioleína (Sigma-Aldrich).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 BIOCATÁLISE UTILIZANDO A LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A lipase foi produzida por fermentação submersa de acordo com o item 3.1.2. A partir do extrato bruto foram obtidas três preparações enzimáticas: extrato lipolítico bruto liofilizado, extrato lipolítico bruto liofilizado e ressuspenso em tampão e adicionado em sistema micelar e lipase imobilizada em Accurel EP-100. As três preparações foram utilizadas para síntese de ésteres.

#### 4.1.1 Imobilização em Accurel EP-100

A lipase foi imobilizada no suporte hidrofóbico de polipropileno Accurel EP-100, visto que este tem sido utilizado com sucesso para imobilização de lipases.

##### 4.1.1.1 Efeito da quantidade de proteína imobilizada na atividade lipolítica

O extrato lipolítico produzido por fermentação submersa apresentou uma atividade específica de  $60 \text{ U. mg}^{-1}$  (determinado pelo método de hidrólise do *p*NPP em meio aquoso – item 3.4.1.1) e foi utilizado nesta parte do trabalho para os ensaios de imobilização.

Para determinar a quantidade de proteína a ser oferecida ao suporte para a imobilização, fizeram-se diversas diluições do extrato lipolítico, de modo que 3,5 a 56 mg de proteína foram colocados em contato com 1 g de suporte para a imobilização (item 3.2.2.2). O controle realizado nas mesmas condições, mas sem a adição do suporte, mostrou que não há perda de atividade lipolítica devido à agitação. A eficiência de imobilização, calculada pelo desaparecimento da atividade lipolítica do sobrenadante, para todas as concentrações foi de cerca de 95%, o que

indica que quase toda a enzima foi removida da solução. Entretanto, um critério muito importante para a caracterização da preparação é a atividade da enzima imobilizada. Assim, determinou-se a atividade das preparações obtidas com diferentes concentrações de proteína (FIGURA 12). Para isso, utilizou-se o método de hidrólise do pNPP em meio orgânico (item 3.4.1.2), a fim de evitar a dessorção da enzima do suporte.

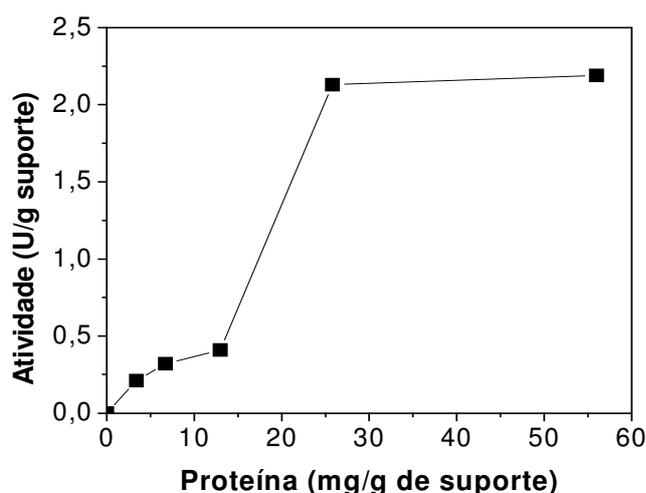


FIGURA 12 – ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DA LIPASE PRODUZIDA POR *Burkholderia cepacia* LTEB11 IMOBILIZADA EM ACCUREL EP-100, COMO FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA OFERECIDA PARA A IMOBILIZAÇÃO (MÉTODO pNPP MEIO ORGÂNICO). CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO: 25°C, 35 h, 200 rpm

Como pode ser visualizado na FIGURA 12, em quantidades de proteína de até 26 mg/g de suporte, o aumento da quantidade de lipase no suporte também levou a um aumento da atividade do catalisador imobilizado. Entretanto, em quantidades acima de 26 mg/g de suporte, a atividade por grama de suporte não foi alterada significativamente, ou seja, a atividade específica é reduzida, visto que se tem mais proteína imobilizada, mas com a mesma atividade. Assim, quando a quantidade de proteína é de 26 mg/g de suporte, a atividade específica é  $8 \cdot 10^{-2}$  U.mg<sup>-1</sup> de proteína e quando a quantidade é de 56 mg/g de suporte, a atividade cai para  $4 \cdot 10^{-2}$  U. mg<sup>-1</sup> de proteína. Este comportamento tem sido relatado por diversos autores em trabalhos de imobilização de lipases por adsorção. Gao *et al.* (2009), por exemplo, quando imobilizaram a lipase de *C. rugosa* em sílica aerogel modificada com grupamentos metila, observaram uma redução da atividade específica de cerca

de 20 para cerca de 5 U.mg<sup>-1</sup> de proteína quando aumentaram a carga de proteína em torno de 6 vezes. Blanco *et al.* (2007) também verificaram uma redução da atividade específica da lipase de *C. antarctica* quando a quantidade de proteína foi aumentada para a imobilização em sílica modificada com grupamentos octila. A explicação que se tem dado para isso, é que estaria ocorrendo a imobilização de várias “camadas” de proteína sobre o suporte, o que dificultaria a difusão dos substratos para o sítio ativo das enzimas encontradas em camadas mais inferiores.

Quando se utilizou 26 mg de proteína por g de suporte, obteve-se a maior atividade na hidrólise do pNPP em meio orgânico (2,1 U.g<sup>-1</sup> de suporte), sendo esta quantidade de proteína, portanto, utilizada nos experimentos seguintes.

#### 4.1.1.2 Cinética de imobilização

Foi realizado um estudo de cinética de imobilização (conforme item 3.2.2.3) a fim de se determinar o tempo necessário para a imobilização da lipase em Accurel EP-100. Ofereceu-se para a imobilização 26 mg de proteína por g de suporte. Determinou-se a atividade e proteínas residuais no extrato lipolítico após a imobilização (FIGURA 13).

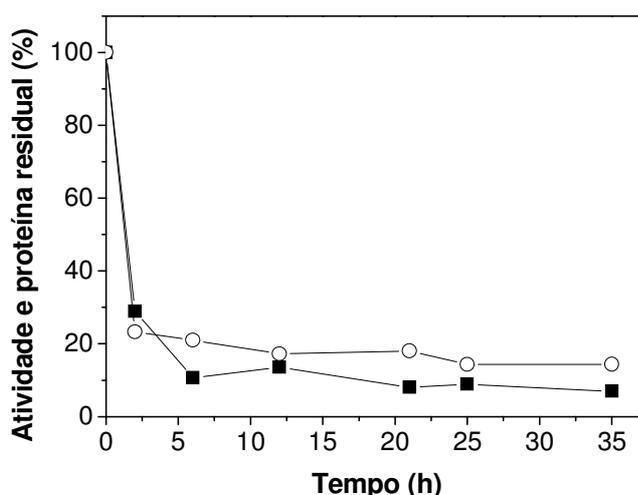


FIGURA 13 – CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE PRODUZIDA POR *Burkholderia cepacia* LTEB11 EM ACCUREL EP-100. ATIVIDADE RESIDUAL (■) E PROTEÍNA RESIDUAL (○) NO SOBRENADANTE APÓS A IMOBILIZAÇÃO, DETERMINADOS PELO MÉTODO DO pNPP EM MEIO AQUOSO E BRADFORD (1976), RESPECTIVAMENTE. CONDIÇÕES: 25°C e 200 rpm

Os resultados mostraram que 6 h de incubação é o tempo suficiente para a imobilização da enzima, restando apenas 10,7% de atividade no sobrenadante, o que corresponde a uma eficiência de imobilização de 89,3%. O teor de proteínas remanescentes no sobrenadante apresentou um perfil muito similar (FIGURA 13).

#### 4.1.2 Comparação entre diferentes preparações enzimáticas em reação de esterificação – escolha da preparação enzimática

O desempenho da enzima imobilizada foi comparado com outras preparações frequentemente utilizadas em biocatálise, usando a velocidade de reação de esterificação em *n*-heptano como base para comparação, conforme descrito em 3.2.5. A FIGURA 14 mostra o perfil de reação para as três preparações enzimáticas: enzima livre liofilizada, enzima encapsulada em micelas reversas e enzima imobilizada em Accurel EP-100. Em todos os casos, o meio reacional continha 70 U de atividade, conforme dosagem de hidrólise do *p*NPP em meio aquoso. Os controles sem a adição da lipase e com a adição do Accurel EP-100 sem a lipase imobilizada não apresentaram conversão em éster.

A maior conversão foi obtida com a enzima imobilizada, com uma conversão em éster de 71,5% em 10 h. A lipase em micelas reversas apresentou uma conversão de apenas 14% no mesmo período. Seria de se esperar que a lipase encapsulada em micelas apresentasse maiores conversões, pois este sistema tem se mostrado eficiente em outros casos, principalmente por mimetizar o ambiente biológico de atuação de lipases (FERNANDES *et al.*, 2004; BARON *et al.*, 2005). Baron *et al.* (2005), por exemplo, verificaram uma conversão de 100% em 12 h para a síntese do oleato de butila quando utilizaram a lipase de *P. corylophilum* em sistema micelar AOT/*n*-heptano, e a mesma conversão em 48 h, quando utilizaram a lipase liofilizada em *n*-heptano. No presente trabalho, é provável que a enzima tenha sido inibida pelo surfactante AOT.

A lipase livre liofilizada também catalisou a reação atingindo uma conversão menor (28,5% em 10 h) do que a atingida pela lipase imobilizada. O melhor desempenho da enzima imobilizada já vem sendo descrita por vários autores. A lipase de *M. miehei*, por exemplo, quando imobilizada em um suporte altamente

hidrofóbico (*Octadecyl Sepabeads*) apresentou uma atividade 20 vezes maior do que a lipase livre (PALOMO *et al.*, 2002). Crespo *et al.* (2005), quando empregaram a lipase de *C. rugosa* imobilizada em óxido de polietileno para resolução de misturas racêmicas, observaram não somente uma maior conversão comparada com a lipase livre, como também um aumento na enantiosseletividade. Neste trabalho, a maior atividade da lipase imobilizada provavelmente ocorreu devido à interação da tampa hidrofóbica da enzima com o material do suporte, que pode levar a uma conformação aberta da lipase, fazendo com que a enzima apresente uma atividade maior (KNEZEVIC *et al.*, 2002; PETKAR *et al.*, 2006; FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007). Em segundo lugar, quando imobilizada, a enzima está espalhada em uma ampla área da superfície do suporte, tornando o sítio ativo da enzima mais acessível ao substrato do que quando não está imobilizada, visto que a lipase livre costuma formar agregados (REES; HALLING, 2001), o que já foi verificado para a lipase da cepa de *B. cepacia* LTEB11 por Lima (2004).

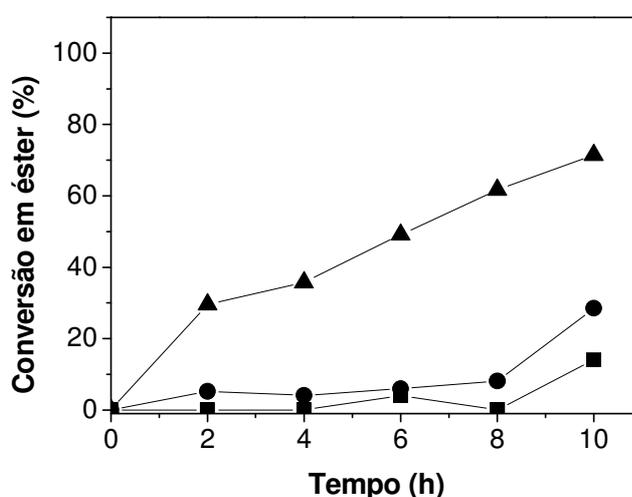


FIGURA 14 – CINÉTICA DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM *n*-HEPTANO, CATALISADA POR DIFERENTES PREPARAÇÕES DA LIPASE PRODUZIDA POR *Burkholderia cepacia* LTEB11. (▲) ENZIMA IMOBILIZADA, (●) ENZIMA LIVRE LIOFILIZADA, (■) SISTEMA MICELAR (AOT/*n*-HEPTANO). A ATIVIDADE TOTAL DO MEIO FOI 70 U (MÉTODO *p*NPP MEIO AQUOSO) PARA TODOS OS EXPERIMENTOS. CONDIÇÕES: 5 mL *n*-HEPTANO, 70 mmol.L<sup>-1</sup> ÁCIDO OLEICO, 210 mmol.L<sup>-1</sup> ETANOL, 37°C, 200 rpm

A partir destes resultados, foi selecionada a enzima imobilizada para dar prosseguimento ao trabalho, com a otimização da reação de esterificação.

#### 4.1.3 Reações de esterificação utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP-100

Estes experimentos foram realizados conforme descrito no item 3.2.6.

##### 4.1.3.1 Influência da quantidade de lipase imobilizada adicionada ao meio reacional

A influência da quantidade de lipase imobilizada adicionada ao meio reacional foi estudada nos valores de 100, 170, 300 e 450 mg da preparação, que correspondem a 140, 232, 410 e 615 U de atividade de hidrólise do *p*NPP em meio aquoso, respectivamente. A quantidade de biocatalisador não pôde ser aumentada além de 450 mg devido à impossibilidade de homogeneização adequada do meio reacional. Como era de se esperar, a velocidade da reação aumentou com o aumento da quantidade de lipase imobilizada adicionada ao meio (FIGURA 15). Quando 450 mg de lipase imobilizada foram adicionados, obteve-se uma conversão de 100% em 3 h de reação.

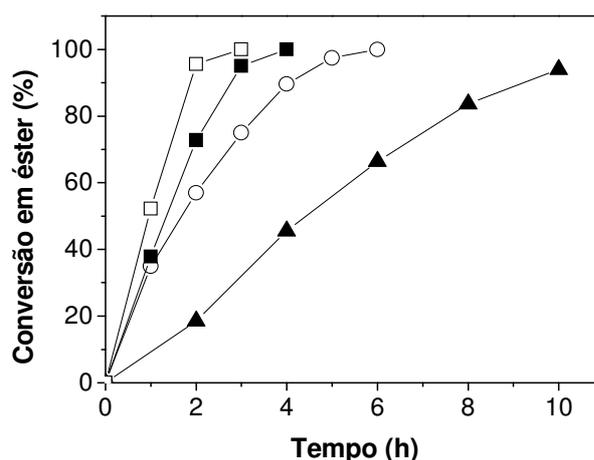


FIGURA 15 – INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE LIPASE IMOBILIZADA EM ACCUREL EP-100 NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM *n*-HEPTANO: (▲) 100 mg, (○) 170 mg, (■) 300 mg e (□) 450 mg. ESTES VALORES CORRESPONDEM A 140, 232, 410 e 615 U (MÉTODO *p*NPP MEIO AQUOSO), RESPECTIVAMENTE. CONDIÇÕES: 5 mL *n*-HEPTANO, 70 mmol.L<sup>-1</sup> ÁCIDO OLEICO, 210 mmol.L<sup>-1</sup> ETANOL, 37°C, 200 rpm

#### 4.1.3.2 Influência da atividade de água ( $a_w$ ) do meio reacional

É bem conhecido que a água de solvatação desempenha um papel importante na biocatálise em meios aquo-restritos, pois ela possibilita a manutenção da conformação tridimensional de enzimas, mantendo-as ativas (SHAH; GUPTA, 2007; FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009). Entretanto, em reações de síntese, quando há um excesso de água no meio reacional, a reação de hidrólise é favorecida (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005; NIE *et al.*, 2006). Em meios orgânicos, a quantidade de água é freqüentemente expressa como atividade de água ( $a_w$ ), e, por ser um parâmetro importante, a atividade de água inicial de um sistema reacional tem sido controlada em muitos estudos de síntese de ésteres.

Neste trabalho, estudou-se o efeito da  $a_w$  inicial do meio reacional por incubação da enzima imobilizada, solvente e substratos separadamente a 20°C, durante 48 h, em presença das soluções salinas saturadas: LiCl ( $a_w$  0,11); Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ( $a_w$  0,53) e KNO<sub>3</sub> ( $a_w$  0,95). Os resultados (FIGURA 16) demonstram que o controle inicial de  $a_w$  não alterou significativamente a conversão em ésteres na reação de esterificação (96,2; 92,7 e 86,4% de conversão para as  $a_w$  de 0,11, 0,53 e 0,95, respectivamente).

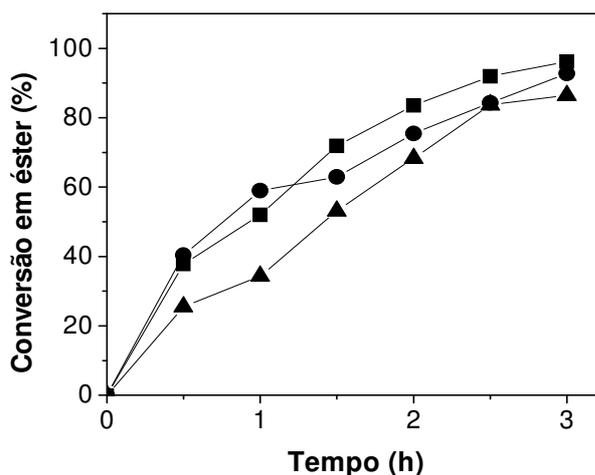


FIGURA 16 – INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DE ÁGUA ( $a_w$ ) NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM *n*-HEPTANO, CATALISADA PELA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 IMOBILIZADA EM ACCUREL EP-100. VALORES DE  $a_w$  DE (■) 0,11; (●) 0,53 E (▲) 0,95. CONDIÇÕES: 450 mg DE LIPASE IMOBILIZADA (615 U – MÉTODO *p*NPP MEIO AQUOSO), 5 mL *n*-HEPTANO, 70 mmol.L<sup>-1</sup> ÁCIDO OLEICO, 210 mmol.L<sup>-1</sup> ETANOL, 37°C, 200 rpm

Assim, tornou-se desnecessário o controle de  $a_w$ , visto que o controle, utilizando a lipase seca em dessecador sem controle inicial de  $a_w$  apresentou uma conversão de 100% em 3 h.

Com o intuito de confirmar a eficiência da metodologia de controle de  $a_w$  inicial no meio reacional, o teor de água nas amostras de lipase imobilizada foi determinado por análise termogravimétrica (TG) após a incubação para atingir a atividade de água adequada. Diferentes teores de água foram obtidos: 1,8; 2,4 e 5,4% (m/m) para os valores de  $a_w$  de 0,11; 0,53 e 0,95 respectivamente, confirmando a eficiência da metodologia.

Há diversos estudos reportados na literatura sobre o efeito do controle inicial de atividade de água no rendimento de reações. Entretanto, o efeito na atividade da enzima nem sempre segue o mesmo padrão (BARON *et al.*, 2005). Por exemplo, Chowdary e Prapulla (2002) estudaram a transesterificação entre o *n*-butanol e o butirato de etila em  $a_w$  iniciais de 0,11 a 0,95. A máxima conversão foi 92% após 24 h com a lipase de *C. rugosa* no valor de  $a_w$  de 0,33. Já Tweddell *et al.* (1998) sintetizaram o oleato de etila usando uma lipase de *R. niveus* em *n*-hexano, obtendo o maior rendimento (60%) com a  $a_w$  de 0,75. Baron *et al.* (2005) observaram uma maior conversão da reação de síntese do oleato de butila em *n*-heptano utilizando uma lipase de *P. corylophilum* em um valor de  $a_w$  de 0,11.

#### 4.1.3.3 Comparação entre lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 e a lipase de *Burkholderia cepacia* comercial imobilizadas

Comparou-se a lipase de *B. cepacia* LTEB1 imobilizada em Accurel EP-100 com a lipase comercial de *B. cepacia* imobilizada no mesmo suporte. A fim de manter as mesmas condições nos dois ensaios (imobilização e esterificação), utilizou-se para ambas as enzimas a mesma quantidade de unidades iniciais oferecidas para a imobilização e o procedimento de imobilização foi feito nas mesmas condições para as duas enzimas. A eficiência de imobilização obtida (determinada segundo o item 3.2.2.3) foi próxima de 100% para as duas lipases, indicando que o processo de imobilização foi efetivo.

A FIGURA 17 mostra o perfil de síntese para as duas preparações. A conversão em éster foi a mesma (99%) após 3 h para ambas, o que mostra o bom desempenho da lipase da cepa selvagem, considerando que a enzima da Amano é uma enzima purificada, muito ativa e estável e freqüentemente utilizada em meios orgânicos (MEZZETTI; KEITH; KAZLAUSKAS, 2003; PRIYA; CHADHA, 2003; NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005).

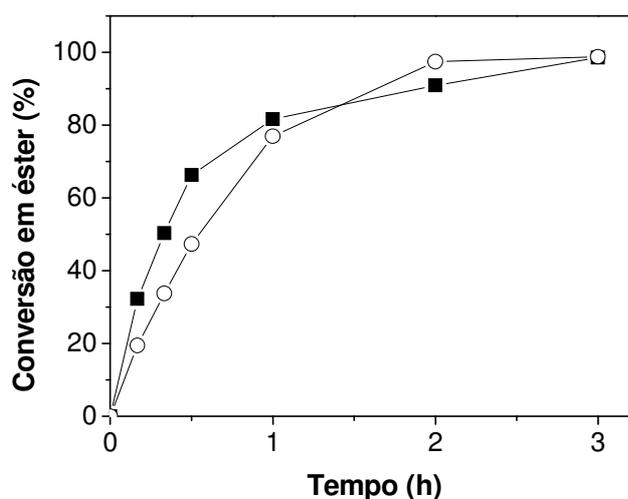


FIGURA 17 – CINÉTICA DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM *n*-HEPTANO, CATALISADA PELA LIPASE DE (○) *Burkholderia cepacia* LTEB11 E (■) *Burkholderia cepacia* DA AMANO, AMBAS IMOBILIZADAS EM ACCUREL EP-100. CONDIÇÕES PARA AMBAS AS ENZIMAS: 450 mg DE LIPASE IMOBILIZADA (615 U – MÉTODO *p*NPP MEIO AQUOSO), 5 mL *n*-HEPTANO, 70 mmol.L<sup>-1</sup> ÁCIDO OLEICO, 210 mmol.L<sup>-1</sup> ETANOL, 37°C, 200 rpm

#### 4.1.3.4 Reutilização da lipase imobilizada

Estudou-se a seguir a reutilização da lipase no ambiente orgânico, visto que a possibilidade de reutilização é uma das principais vantagens de enzimas imobilizadas.

A lipase imobilizada manteve a conversão em éster de 100% para a reação de esterificação após ter sido utilizada por 11 vezes em reações de 6 h e somente na 24<sup>a</sup> utilização atingiu 50% da sua atividade original, como pode ser visualizado na FIGURA 18.

Durante este experimento, foi realizado um controle utilizando amostras do biocatalisador imobilizado nunca utilizadas antes, a fim de verificar se a lipase não

estava perdendo atividade durante o armazenamento a 4°C no decorrer do experimento de reutilização, que durou 50 dias. Os resultados mostraram que, ao final do experimento, a lipase imobilizada ainda retinha 99% de atividade frente à reação de esterificação, quando armazenada a 4°C. Portanto, a possibilidade de desnaturação durante o armazenamento foi descartada.

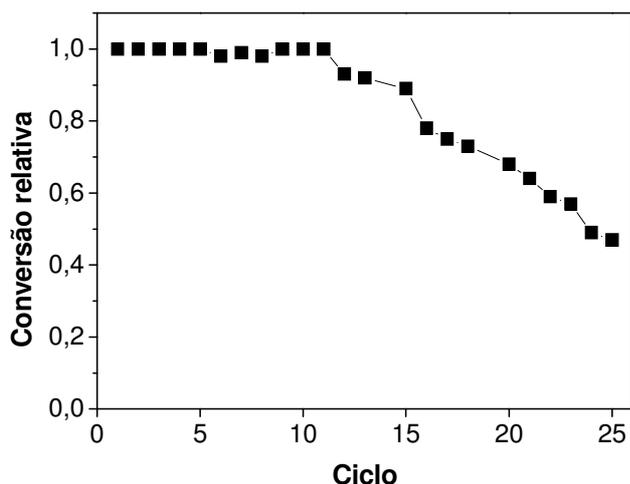


FIGURA 18 – REUTILIZAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA EM ACCUREL EP-100 NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM *n*-HEPTANO. OS VALORES EXPRESSOS SÃO RELATIVOS À CONVERSÃO OBTIDA NO PRIMEIRO CICLO. CONDIÇÕES: 170 mg DE LIPASE IMOBILIZADA (232 U MÉTODO *p*NPP MEIO AQUOSO) 5 mL *n*-HEPTANO, 70 mmol.L<sup>-1</sup> ÁCIDO OLEICO, 210 mmol.L<sup>-1</sup> ETANOL, 37°C, 6 h, 200 rpm

Neste trabalho imobilizou-se a lipase de *B. cepacia* LTEB11 em Accurel EP-100. A imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos como o Accurel EP-100 tem sido reportada por vários autores (MURRAY *et al.*, 1997; FORESTI; ERRAZU; FERREIRA, 2005; PETKAR *et al.*, 2006) e é bastante adequada para lipases, visto que estas têm uma tendência à adsorção em suportes hidrofóbicos e este tipo de imobilização é pouco agressivo à conformação da enzima. A lipase imobilizada apresentou uma maior atividade comparada com a lipase livre, comportamento que tem sido reportado por outros autores (PALOMO *et al.*, 2002; PERSSON *et al.*, 2002; CRESPO *et al.*, 2005) e constitui somente uma das vantagens da imobilização. Lipases imobilizadas também apresentam muitas vezes uma estabilidade aumentada à temperatura, pH e solventes orgânicos. Além disso, a imobilização de lipases evita a contaminação do produto e permite a recuperação do

biocatalisador, reutilização e utilização em processos contínuos (FORESTI; FERREIRA, 2007).

Tendo em vista todas as vantagens relatadas, as lipases imobilizadas têm sido bastante estudadas para síntese de ésteres. Os resultados obtidos neste trabalho são melhores do que a maioria dos reportados na literatura para síntese de ésteres por esterificação em solventes orgânicos, como pode ser visualizado na TABELA 8.

A alta conversão (100%) obtida neste trabalho em um curto tempo de reação (3 h), só é comparável aos resultados de Abbas e Comeau (2003), que sintetizaram o caproato de etila em 4 h com uma conversão de 98% e Chang *et al.* (2009), que sintetizaram o laurato de L-ascorbila em 6,7 h com uma conversão de 93%. Os outros trabalhos listados apresentam tempos de reação bem altos (mais de 24 h) ou conversões baixas (menos de 75%).

A lipase de *B. cepacia* LTEB 11 imobilizada em Accurel EP-100 apresentou também um ótimo resultado para o ensaio de reutilização, comparando com resultados já reportados para síntese de ésteres em solventes orgânicos. Todos os trabalhos listados apresentaram queda na conversão após as primeiras utilizações. Dave e Madamwar (2006) observaram uma queda pequena nas primeiras 10 utilizações (10%), entretanto não fizeram mais utilizações.

Após a otimização da reação de esterificação utilizando a lipase de *B. cepacia* LTEB 11 imobilizada por adsorção em suporte hidrofóbico, estudou-se a produção da lipase por fermentação no estado sólido, com o intuito de utilizar o sólido fermentado para síntese de ésteres e compará-lo com o desempenho da lipase imobilizada em Accurel EP-100.

TABELA 8 – ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES POR ESTERIFICAÇÃO EM MEIO DE COSSOLVENTE ORGÂNICO UTILIZANDO LIPASES IMOBILIZADAS

LIPASE	SUORTE	ÉSTER PRODUZIDO	TEMPO DE REAÇÃO (h)	CONVERSÃO (%)	REUTILIZAÇÃO	REFERÊNCIA
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB 11	Accurel EP-100	etílicos, principalmente oleato de etila	3	100	11 vezes sem queda e queda de 50% em 24 utilizações	este trabalho
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	butirato de tetrahidrofurfurila	240	67	-	Yadav e Devi (2004)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	palmitato de glucose	74	76	-	Chaiyaso, H-Kittikun e Zimmermann (2006)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	laurato de L-ascorbila	6,7	93	-	Chang <i>et al.</i> (2009)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	laurato de cinamila	2	60	queda de 60 para 52% após 3 utilizações	Yadav e Dhoot (2009)
<i>Candida rugosa</i>	PVA-alginato- ácido bórico	hexanoato de etila	72	86	queda de 10% em 10 utilizações	Dave; Madamwar (2006)
<i>Candida rugosa</i>	sílica mesoporosa	laurato de citronelila	24	98	queda de 10% em 4 utilizações	Abdullah, Sulaiman e Kamaruddin (2009)
<i>Mucor sp</i>	Amberlite IRC50	caproato de etila	4	98	-	Abbas e Comeau (2003)
<i>Penicillium corylophilum</i>	gel de octyl Sepharose	oleato de <i>n</i> -butila	12	20	-	Baron <i>et al.</i> (2005)
<i>Pseudomonas sp.</i>	óxido de polietileno	laurato de pentila	30	100	-	Crespo <i>et al.</i> (2005)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	silicato de magnésio	laurato de <i>n</i> -butila	48	85	-	Silva e Jesus (2003)
<i>Rhizomucor mihei</i>	resina aniônica	monoleato de ácido kójico	42	37	-	Ashari <i>et al.</i> (2009)
<i>Rhizopus oryzae</i>	carbonato de cálcio	oleato de butila	1,7	73	queda de mais de 50% em 10 utilizações	Ghamgui, Karra- Chaabouni e Gargouri (2004)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Celite 545	acetato de butila	24	80	-	Ben Salah <i>et al.</i> (2007)

## 4.2 BIOCATALÍSE UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11

### 4.2.1 Estudos de produção da lipase

A produção da lipase *B. cepacia* LTEB11 utilizando somente farelo de semente de girassol como substrato já havia sido otimizada por Fernandes (2007), que reportou atividades hidrolíticas ( $p$ NPP em meio aquoso) em torno de 240 U.gSS<sup>-1</sup>. Entretanto, a consistência do substrato era pastosa, o que poderia impedir o desenvolvimento do processo de síntese de ésteres em reator de leito fixo, um dos objetivos deste trabalho. Além disso, substratos com consistência pastosa podem dificultar o escalonamento da produção da enzima em biorreator piloto, devido à dificuldade de transferência de energia, com conseqüente acúmulo de calor no leito. Tendo em vista estes problemas de empacotamento do leito e também com o intuito de reduzir o custo da produção da lipase, foram testados outros substratos. Os cultivos foram realizados de acordo com o item 3.1.3.2 e a lipase foi extraída conforme item 3.1.3.3 para determinação da atividade lipolítica. O experimento foi realizado em triplicata. Em cada tempo três frascos Erlenmeyers de cada substrato foram sacrificados. As atividades mostradas constituem a média e o desvio padrão das atividades dos três frascos. Os substratos testados foram: tortas de soja, milho e mamona, suplementadas com óleo de soja de modo a atingir um teor de lipídios de 5%. Os cultivos com torta de milho (FIGURA 19A) foram os que apresentaram a mais alta atividade de hidrólise do  $p$ NPP em meio aquoso ( $66 \pm 6$  U.gSS<sup>-1</sup>); entretanto, esta atividade ainda foi baixa em relação à obtida com o farelo de semente de girassol.

Em seguida, diferentes misturas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de semente de girassol também foram testadas, com a intenção de utilizar o bagaço de cana-de-açúcar para evitar o problema do empacotamento do substrato no reator em coluna. A máxima atividade de hidrólise do  $p$ NPP em meio aquoso,  $234 \pm 11$  U.gSS<sup>-1</sup>, foi atingida quando se utilizou a mistura na proporção de 50% (m/m), após 96 h de cultivo (FIGURA 19B). Nenhum controle (frascos contendo substratos sem a adição de inóculo) apresentou atividade lipolítica.

Obeve-se, portanto, uma atividade similar à relatada anteriormente por Fernandes (2007), que utilizou somente o farelo de semente de girassol como substrato. Assim, tem-se como vantagem em relação ao trabalho de Fernandes (2007) a possibilidade de utilização da metade da quantidade do farelo de semente de girassol e ainda a utilização do bagaço de cana-de-açúcar, que constitui um resíduo agro-industrial, reduzindo assim o custo da fermentação. A mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de semente de girassol 50% gera um substrato muito mais volumoso do que quando se utiliza somente o farelo de semente de girassol, o que parece levar a uma maior aeração do meio e uma maior disponibilização dos nutrientes ao microrganismo, visto que o substrato não fica empacotado no fundo dos frascos Erlenmeyer.

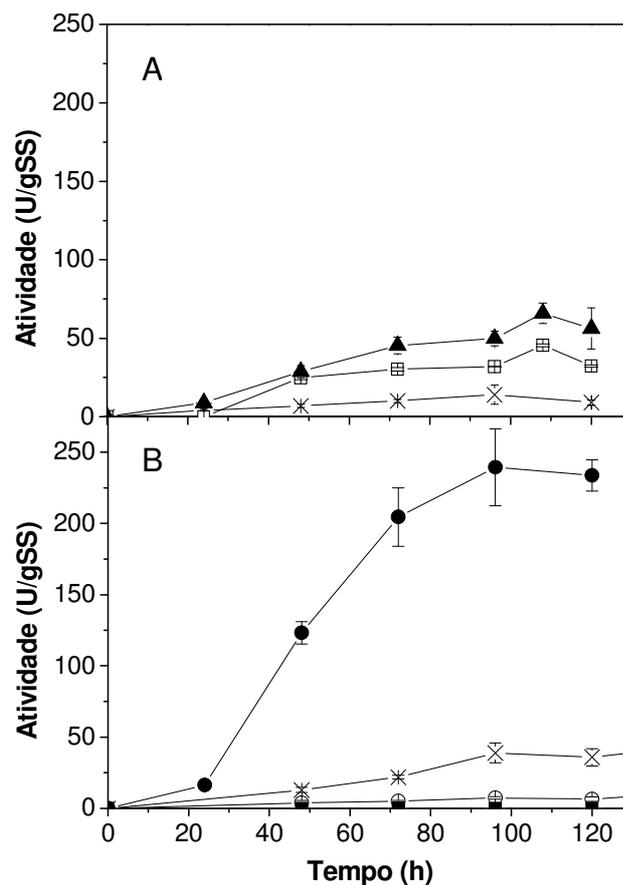


FIGURA 19 – ATIVIDADE DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO. (A) SUBSTRATOS: TORTAS DE (X) MAMONA, (□) SOJA E (▲) MILHO. (B) SUBSTRATOS: BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E FARELO DE SEMENTE DE GIRASSOL NAS PROPORÇÕES (m/m) DE (●) 50:50, (X) 70:30, (○) 90:10 E (■) 100:0. CONDIÇÕES DE CULTIVO: 10 g SUBSTRATO SECO, 55% DE UMIDADE PARA AS TORTAS E 75% PARA O BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E MISTURAS COM FARELO DE SEMENTE DE GIRASSOL, 29 °C. AS ATIVIDADES FORAM DETERMINADAS PELO MÉTODO DO  $p$ NPP EM MEIO AQUOSO

Os cultivos que utilizaram somente o bagaço de cana-de-açúcar como substrato não apresentaram atividade lipolítica. Neste caso, houve falta de nutrientes no substrato acessíveis ao microrganismo, visto que os extratos destas fermentações ficaram límpidos, o que mostra que o microrganismo não pôde crescer neste meio.

Verifica-se que a grande maioria dos trabalhos que relatam a produção de lipases por FES, utiliza fontes fúngicas, sendo bastante difícil encontrar estudos com fontes bacterianas. A *P. aeruginosa* PseA foi cultivada em torta de pinhão-manso, em um tempo de cultivo maior do que neste trabalho (120 h), entretanto obteve-se uma atividade de hidrólise do pNPP bem alta (625 U.gSS<sup>-1</sup>) (MAHANTA; GUPTA; KHARE, 2008). Fernandes *et al.* (2007) cultivaram a *B. cepacia* LTEB11 em farelo de milho suplementado com óleo de milho por 72 h e obtiveram uma atividade de 108 U.gSS<sup>-1</sup> na hidrólise do pNPP. As lipases fúngicas de *R. chinensis* CCTCC M201021 (SUN; XU; WANG, 2009) e *A. niger* NCIM 1207 (MAHADIK *et al.*, 2002), quando cultivadas por FES apresentaram atividades de 24 U.gSS<sup>-1</sup> em 72 h e 630 U.gSS<sup>-1</sup> em 120 h de cultivo, respectivamente, para a hidrólise do pNPP, entretanto, ambos suplementaram os resíduos agro-industriais com componentes como óleo de oliva, peptona e sais, o que aumenta o custo de produção da lipase. Outros autores determinam a atividade do extrato lipolítico obtido do sólido fermentado pela hidrólise de diferentes triacilgliceróis, obtendo-se desde atividades baixas como 30 U.gSS<sup>-1</sup> (GOMBERT *et al.*, 1999) na hidrólise do óleo de oliva, até atividades de 1500 U.gSS<sup>-1</sup> (DIAZ *et al.*, 2006) na hidrólise da tricaprilina. Entretanto, é difícil de comparar resultados como estes, devido à grande diversidade de substratos, metodologias e condições de análise utilizados.

Neste trabalho, dentre as condições estudadas, a mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de semente de girassol 50% (m/m) fermentada por 96 h, foi a condição que levou a uma maior atividade lipolítica. Assim, produziu-se o sólido fermentado nestas condições para a utilização em reações de biocatálise, após sua liofilização e delipidação.

#### 4.2.2 Determinação da atividade lipolítica do sólido fermentado

No item anterior, a fim de selecionar o substrato e o tempo de fermentação que levasse à maior atividade lipolítica, determinou-se no extrato enzimático a atividade lipolítica pelo método de hidrólise do *p*NPP em meio aquoso. Selecionados o substrato e o tempo de fermentação, produziu-se o sólido fermentado e tornou-se necessário determinar-se a atividade lipolítica deste, após liofilizado e delipidado antes de utilizá-lo para biocatálise. Para isso, utilizou-se o método titulométrico (3.4.1.3), tendo em vista a impossibilidade de se determinar a atividade pelo método do *p*NPP em meio aquoso, visto que esta determinação é realizada na própria cubeta, onde a reação é acompanhada por leitura em espectrofotômetro, sendo apropriada portanto, apenas para soluções enzimáticas e não para sólidos, visto que estes formam uma mistura heterogênea com o meio de reação.

A TABELA 9 apresenta os valores de atividade lipolítica do sólido fermentado por 96 h, liofilizado e delipidado frente a diversos substratos utilizando o método titulométrico. Os valores mostrados são a média e o desvio padrão de três determinações. Observa-se que a atividade hidrolítica aumenta com o decréscimo da cadeia acíclica. A atividade contra trioleína (substrato de cadeia longa) indica a presença de lipases verdadeiras no extrato (JAEGER; EGGERT, 2002).

TABELA 9 – ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Burkholderia cepacia* LTEB11 FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS

SUBSTRATO	ATIVIDADE (U.g <sup>-1</sup> SS)
tributirina C4 <sup>*</sup>	92,1 ± 6,5
tributirina C4	154,3 ± 6,6
tricaprilina C8	65,6 ± 2,2
trioleína C18:1(Δ <sup>9</sup> )	32,5 ± 0,4
óleo de soja Sigma	24,0 ± 1,1

CONDIÇÕES: O SÓLIDO FERMENTADO FOI OBTIDO POR CULTIVO EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E FARELO DE SEMENTE DE GIRASSOL 50% (m/m) POR 96 h A 29°C.

\*ANÁLISE FEITA SEM PRÉ-EMULSIFICAÇÃO DO SUBSTRATO

#### 4.2.3 Quantificação de lipídios no sólido fermentado

O teor de lipídios no sólido fermentado após a delipidação (determinado como descrito em 3.3.2) foi de  $0,20\% \pm 0,05$ , tendo sido removidos 96% dos lipídios contidos no sólido fermentado, que apresentava o teor de  $5,4\% \pm 0,2$ .

#### 4.2.4 Comparação entre a lipase imobilizada em Accurel EP-100 e o sólido fermentado em reação de esterificação

Comparou-se a lipase imobilizada em Accurel EP-100, produzida como descrito em 3.2.2.1 (atividade de  $1400 \text{ U.g}^{-1}$ , hidrólise do pNPP em meio aquoso) e o sólido fermentado (atividade de  $24 \text{ U.g}^{-1}\text{SS}$  – hidrólise óleo de soja, método titulométrico) em reação de esterificação. Para isso, utilizou-se a reação de esterificação entre o etanol e o ácido oleico, já anteriormente estudada. Tendo em vista que somente a atividade do extrato bruto pôde ser determinada pelo método do pNPP, e não o sólido fermentado, e a extração da lipase com solução de NaCl não é eficiente (não extrai 100% da lipase do sólido), não foi possível padronizar a atividade enzimática no meio reacional. Assim, padronizou-se a quantidade de enzima por massa. Adicionou-se 170 mg de cada preparação enzimática. O experimento foi realizado em triplicata. As conversões mostradas constituem a média e o desvio padrão das conversões das três reações.

A lipase imobilizada apresentou uma conversão de 95,7% em 6 h de reação, enquanto o sólido fermentado apresentou uma conversão de 95,3% em 24 h (FIGURA 20). Esta porção de lipase imobilizada possuía uma atividade de 232 U (método do pNPP em meio aquoso) e de sólido fermentado de cerca de 40 U (aproximação, determinada a partir da atividade do extrato lipolítico - método do pNPP em meio aquoso). Ou seja, apesar de apresentar uma atividade cerca de 6 vezes mais baixa do que a lipase imobilizada, o sólido fermentado apresentou a mesma conversão para a reação de esterificação em um tempo apenas 4 vezes maior. Reações realizadas com o sólido fermentado autoclavado (controle) nas mesmas condições não apresentaram conversão.

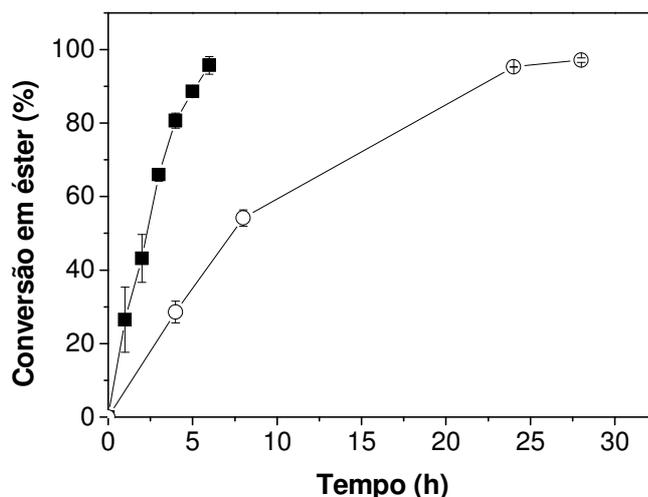


FIGURA 20 – COMPARAÇÃO ENTRE A LIPASE DE *Burkholderia cepacia* LTEB11 IMOBILIZADA EM ACCUREL EP-100 E O SÓLIDO FERMENTADO PELA MESMA BACTÉRIA NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO. (■) LIPASE IMOBILIZADA EM ACCUREL E (○) SÓLIDO FERMENTADO. CONDIÇÕES: 170 mg DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS, 5 mL *n*-HEPTANO, 70 mmol. L<sup>-1</sup> ÁCIDO OLEICO, 210 mmol. L<sup>-1</sup> ETANOL, 37 °C, 200 rpm

O resultado obtido para o sólido fermentado neste trabalho (95,3% de conversão, 24 h) é comparável com o de Fernandes *et al.* (2007), onde se atingiu uma conversão máxima de 94% em 18 h de reação de síntese do oleato de etila utilizando farelo de milho fermentado por *B. cepacia* LTEB11. Fernandes *et al.* (2007) utilizou a mesma temperatura (37 °C) e a mesma concentração de ácidos graxos utilizada neste trabalho (70 mmol.L<sup>-1</sup>), entretanto utilizou uma razão molar álcool:ácido de 5:1 e adicionou uma quantidade de sólido fermentado correspondente a 60 unidades totais (determinada a partir da atividade do extrato lipolítico - método do *p*NPP em meio aquoso).

Apesar da necessidade de se utilizar uma maior quantidade em massa do sólido fermentado em relação à lipase imobilizada para atingir a mesma conversão na reação de esterificação em um mesmo período de tempo, decidiu-se utilizar para as reações de síntese do biodiesel o sólido fermentado, devido às suas vantagens econômicas, além da possibilidade de se estudar um sistema ainda pouco explorado.

#### 4.2.5 Efeito do etanol na atividade lipolítica do sólido fermentado

Estudou-se efeito do etanol na atividade lipolítica do sólido fermentado (item 3.3.4), visto que se pretendia utilizar este álcool em reação de transesterificação e que a possibilidade de inibição de lipases por álcoois é bastante relatada na literatura (YADAV; DEVI, 2004; AL-ZUHAIR; LING; JUN, 2007; TRUBIANO; BORIO; ERRAZU, 2007). Para tanto, utilizou-se o método titulométrico, como descrito no item 3.4.1.3, e substituiu-se parte da solução tampão do meio por etanol na faixa de 0 a 50% (v/v) de etanol no meio reacional. O experimento foi realizado em triplicata. As atividades mostradas constituem a média e o desvio padrão de três determinações.

Os resultados (FIGURA 21) mostram que existe redução da atividade enzimática em presença de etanol, sendo que na concentração de 50% do álcool nenhuma atividade foi detectada no meio reacional.

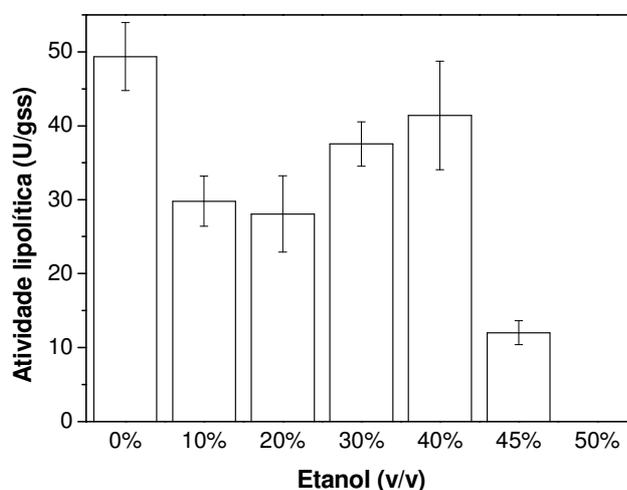


FIGURA 21 – EFEITO DO ETANOL NA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Burkholderia cepacia* LTEB11 EM MEIO AQUOSO FRENTE À TRIBUTIRINA SEM EMULSIFICANTE (MÉTODO TITULOMÉTRICO). CONDIÇÕES: 37°C, pH 7,0

#### 4.2.6 Efeito do etanol e de solução tampão na estabilidade da lipase contida no sólido fermentado

No ensaio anterior, estudou-se o efeito da presença do etanol na reação de hidrólise da tributirina. Neste ensaio, estudou-se a estabilidade da lipase contida no sólido fermentado em etanol e em solução tampão pela incubação do sólido nestes meios por 24 h, 30°C, 180 rpm (item 3.3.5). Após a incubação, o sólido fermentado foi seco e a atividade residual foi determinada. A atividade residual determinada pela hidrólise da tributirina sem emulsificante (método titulométrico - item 3.4.1.3), pode ser visualizada na TABELA 10. Os valores mostrados são a média e desvio padrão de três determinações. Verificou-se que o sólido fermentado perdeu aproximadamente 20% da sua atividade quando incubado em etanol, o que se pode considerar uma boa estabilidade. Por outro lado, a atividade residual do sólido incubado em solução tampão foi de apenas 22,3% devido à eluição da lipase do sólido para o meio aquoso, o que foi comprovado pela alta atividade lipolítica encontrada na fase aquosa (212,5 U, pelo método do pNPP em meio aquoso).

TABELA 10 – ATIVIDADE RESIDUAL DA LIPASE CONTIDA NO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Burkholderia cepacia* LTEB11 APÓS INCUBAÇÃO EM ETANOL E EM MEIO AQUOSO

MEIO	ATIVIDADE RESIDUAL (%)
etanol	80,5 ± 4,0
solução tampão	22,3 ± 0,9

CONDIÇÕES: INCUBAÇÃO POR 24 h, 30°C, 180 rpm. MÉTODO TITULOMÉTRICO (HIDRÓLISE DA TRIBUTIRINA SEM EMULSIFICANTE)

#### 4.2.7 Reações de transesterificação em frascos agitados

##### 4.2.7.1 Ensaio preliminares

Altas conversões para reações de transesterificação catalisadas por lipases para a produção de ésteres alquílicos que compõem o biodiesel têm sido reportadas para sistemas que envolvem cossolventes (SHIEH; LIAO; LEE, 2003; NIE *et al.*,

2006; ROYON *et al.*, 2007; SHAW *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009). No presente trabalho, atingiu-se quase 75% de conversão em 72 h em uma reação em *n*-heptano a 37°C, quando se empregou a razão molar de etanol para óleo de soja de 6:1 (TABELA 11). Em 96 h, atingiu-se 100% de conversão. Entretanto, a utilização de cossolventes no meio reacional não é desejável, visto que dificulta a recuperação do produto, aumentando seu custo de produção (KOSE; TUTER; AKSOY, 2002).

Investigou-se então a síntese de ésteres etílicos em sistemas livres de cossolventes, envolvendo diferentes combinações de óleo (mamona ou soja), álcool (metanol ou etanol), temperaturas (30 ou 37°C) e adição de água (1% de água ou não) (TABELA 11). Conversões muito baixas foram atingidas em ausência do cossolvente. Entretanto, os resultados das reações sem cossolvente não podem ser comparados ao resultado da reação com cossolvente, visto que esta última apresenta uma quantidade de substratos muito inferior. Dentre as reações sem cossolvente, a que levou a uma maior conversão (8,9% em 48 h e 21,4% em 96 h) foi aquela onde se empregou uma razão molar de etanol:óleo de soja de 6:1, temperatura de 37°C e adição de 1% de água. Nessas mesmas condições, a reação realizada na ausência de água apresentou apenas 1% de conversão em 48 h. Assim, como se verificou que a água tinha um papel importante para a obtenção de maiores conversões, passou-se a estudar as reações em ausência de cossolvente adicionando-se água no meio reacional.

TABELA 11 – SÍNTESE DE ÉSTERES ALQUÍLICOS EM FRASCOS AGITADOS UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Burkholderia cepacia* LTEB11

ÁLCOOL	ÓLEO	RM ÁLCOOL: ÓLEO	T (°C)	H <sub>2</sub> O 1% (m/m)	COSSOLVENTE	CONVERSÃO (%)		
						48 h	72 h	96 h
metanol	mamona	6	30	não	nenhum	2,5	nd	nd
etanol	mamona	6	30	não	nenhum	2,9	nd	nd
etanol	mamona	6	37	não	nenhum	3,5	nd	nd
etanol	mamona	3	30	não	nenhum	nd	8,7	nd
metanol	soja	6	30	não	nenhum	0,1	nd	nd
etanol	soja	6	30	não	nenhum	0,8	nd	nd
etanol	soja	6	37	não	nenhum	1,0	nd	nd
etanol	soja	3	30	não	nenhum	nd	9,0	nd
etanol	soja	6	37	sim	nenhum	8,9	15,0	21,4
etanol	soja*	6	37	não	<i>n</i> -heptano	39,8	74,8	100,0

NOTA: \* MEIO REACIONAL: 1,0 mmol DE ÓLEO; 6,0 mmol DE ÁLCOOL; 0,75 g DE SÓLIDO FERMENTADO (18 U HIDRÓLISE DO ÓLEO DE SOJA); 15 mL DE *n*-HEPTANO.  
nd – NÃO DETERMINADO

A influência das condições reacionais para a transesterificação em meio livre de cossolvente em frascos agitados foi então investigada, utilizando óleo de soja e etanol. Estes substratos foram escolhidos por sua grande disponibilidade no Brasil, e no caso do etanol, por sua menor toxicidade comparado ao metanol e por ser uma fonte de energia renovável, ao contrário do metanol, que é atualmente principalmente produzido de fontes fósseis não-renováveis.

#### 4.2.7.2 Otimização da reação de transesterificação em ausência de cossolvente

As reações foram realizadas na ausência de cossolvente, utilizando-se 30 mmol de óleo de soja e 1,5 g de sólido fermentado.

##### 4.2.7.2.1 Influência da razão molar álcool:óleo

Estudou-se a influência da razão molar álcool:óleo. A maior conversão (49,2% após 96 h) foi obtida com uma razão molar álcool:óleo de 3:1 (FIGURA 22), ou seja, a maior conversão foi obtida com quantidades estequiométricas de álcool e óleo. Com o aumento da quantidade de álcool a conversão foi menor, atingindo somente 7,7% de conversão quando se utilizou a razão molar 12:1.

Um aumento na razão molar álcool:óleo tem três efeitos potenciais na reação de transesterificação: (a) deslocamento do equilíbrio em favor da produção dos ésteres; (b) aumento da desnaturação da enzima (SHIMADA *et al.*, 2002; NIE *et al.*, 2006), que seria causada pela interação do álcool com a água de solvatação da enzima, levando a modificações na sua conformação (TRUBIANO; BORIO; ERRAZU, 2007); e (c) aumento da inibição pelo substrato álcool, que interagiria com a enzima, impedindo a catálise (BOUSQUET-DUBOUCH *et al.*, 2001; YADAV; DEVI, 2004; AL-ZUHAIR; LING; JUN, 2007). Neste trabalho, o aumento da razão molar não deslocou o equilíbrio da reação em favor da síntese dos ésteres. Além disso, é improvável que desnaturação significativa esteja ocorrendo, visto que a velocidade de reação é constante durante 96 h de reação em razões molares mais altas álcool:óleo (6:1, 9:1 e 12:1, FIGURA 22). Portanto, a explicação mais provável para

a menor velocidade de reação em razões molares álcool:óleo maiores é a inibição pelo etanol.

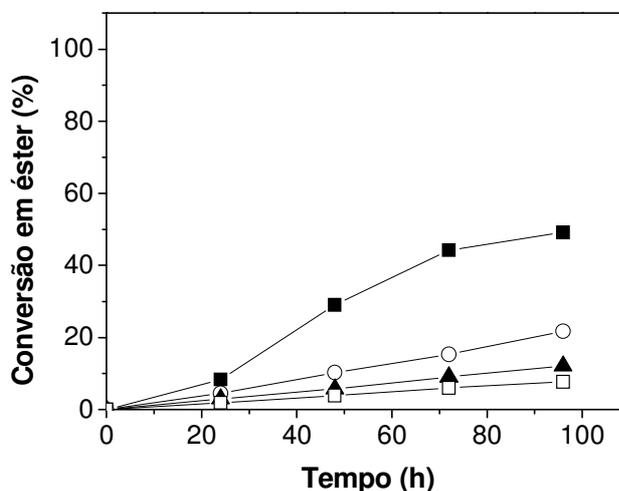


FIGURA 22 - INFLUÊNCIA DA RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÓLEO NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Burkholderia cepacia* LTEB11. RAZÕES: (■) 3:1; (○); 6:1; (▲) 9:1; (□)12:1. CONDIÇÕES: 1% (m/m) ÁGUA, 37°C, 180 rpm, REAÇÃO LIVRE DE COSSOLVENTE

As lipases apresentam diferentes comportamentos frente aos álcoois, e assim, a razão molar álcool:óleo onde se obtém a maior conversão em reações de transesterificação também é diferente dependendo da lipase. Salis *et al.* (2005) estudaram razões molares álcool:óleo de 3:1, 6:1, 9:1 e 12:1, e obtiveram melhores resultados em razões mais baixas (3:1 e 6:1), quando utilizaram a *B. cepacia* imobilizada em terra diatomácea para a butanolise da trioleína. A lipase de *C. antarctica* imobilizada em resina acrílica também apresentou maior atividade na razão molar 3:1 quando utilizada para a metanolise do óleo de girassol (OGNJANOVIC; BEZBRADICA; KNEZEVIC-JUGOVIC, 2009). Por outro lado, existem estudos onde altas razões molares levam a maiores conversões, que é o caso da lipase de *B. cepacia* imobilizada em gel hidrofóbico, que apresentou maior atividade em reação de transesterificação na razão molar de 7,5:1 (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005) e da lipase de *C. antarctica* imobilizada em resina acrílica, que apresentou maior atividade na razão molar de 25:1 quando catalisou a reação entre o metanol e óleo de fritura (MACEIRAS *et al.*, 2009).

#### 4.2.7.2.2 Influência da temperatura

Foram estudadas as temperaturas de 37 e 50°C, utilizando a razão molar álcool:óleo de 3:1 e 1% (m/m) de água. Estes experimentos foram realizados em duplicata e os resultados mostrados correspondem à média dos valores obtidos.

A reação realizada a 37°C apresentou uma conversão de 53,9% em 96 h de reação, enquanto a reação a 50°C apresentou uma conversão de apenas 14,4% (FIGURA 23). O experimento controle (utilizando o sólido fermentado autoclavado) não apresentou conversão em éster. Assim, empregou-se a temperatura de 37°C para as reações seguintes.

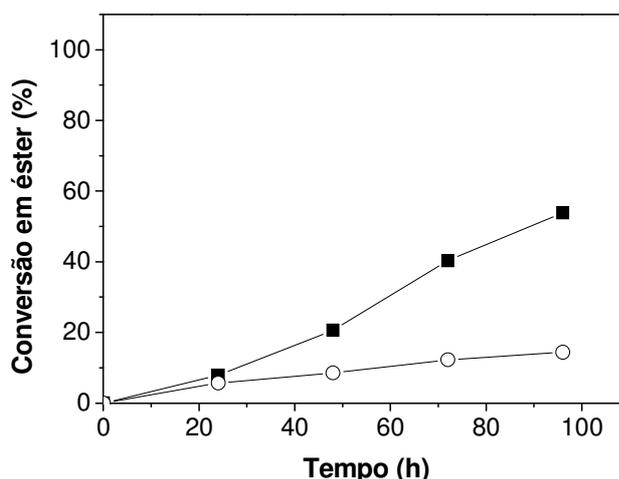


FIGURA 23 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Burkholderia cepacia* LTEB11. (■) 37°C E (○) 50°C. CONDIÇÕES: RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÓLEO 3:1, 1% (m/m) ÁGUA, 180 rpm, REAÇÃO LIVRE DE COSSOLVENTE

As lipases bacterianas geralmente apresentam a máxima atividade em temperaturas que variam de 30 a 60°C. A lipase de *B. cepacia* imobilizada em terra diatomácia apresentou a maior atividade na reação de butanolise da trioleína em temperaturas de 40 a 60°C (100% em 4 h) (SALIS *et al.*, 2005). A lipase de *C. antarctica* imobilizada em resina acrílica apresentou maior atividade a 45°C na reação entre o metanol e óleo de fritura (MACEIRAS *et al.*, 2009). Altas atividades em temperaturas em torno de 37°C também são comuns. A lipase de *B. cepacia* imobilizada em gel hidrofóbico, por exemplo, apresentou a melhor conversão em

reação de transesterificação na temperatura de 35°C (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005) e a de *C. antarctica* imobilizada em resina acrílica, na temperatura de 38°C para a metanólise do óleo de canola (HAJAR *et al.*, 2009).

#### 4.2.7.2.3 Influência do teor de água no meio reacional

O teor de água no meio reacional é um parâmetro crucial quando se utiliza enzimas em meio orgânico. É considerado mais lógico expressá-lo em termos de atividade de água ao invés de porcentagem (m/m) de água, entretanto, para um processo como a produção de biodiesel, onde o objetivo final é trabalhar em larga escala, faz mais sentido otimizar o processo simplesmente em termos de adição de diferentes quantidades de água. Isto porque o controle da atividade de água é mais complicado e não seria conveniente controlá-lo em larga escala (SHAH; GUPTA, 2007).

Tendo em vista os resultados anteriores (TABELA 11), onde a adição de 1% de água ao meio reacional proporcionou um aumento significativo na conversão em éster (de 1% para 9 % em 48 h), o efeito da quantidade de água no meio reacional foi então estudado. Com base nos resultados da FIGURA 22, utilizou-se a razão molar 3:1. Quantidades de água correspondentes a 0,5; 1; 5 e 10% (m/m total dos substratos) foram adicionados ao meio de reação. Foram obtidas conversões de aproximadamente 50% em 96 h para concentrações de água no meio reacional de 0,5 e 1% (FIGURA 24). Neste mesmo tempo, conversões de 11,7 e 18,9% foram obtidas na ausência e com 5% de adição de água, respectivamente e quase não houve conversão quando se adicionou 10% de água, provavelmente porque já havia competição entre as reações de esterificação e hidrólise, visto que se sabe que um excesso de água favorece a reação de hidrólise do triacilglicerol (NIE *et al.*, 2006).

Assim, existe uma quantidade ótima de água no meio reacional para a atuação das lipases em reações de síntese, e esta quantidade é específica para cada lipase, deste modo, algumas mostram altas atividades em baixas concentrações de água, enquanto outras mostram altas atividades em altas concentrações de água (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

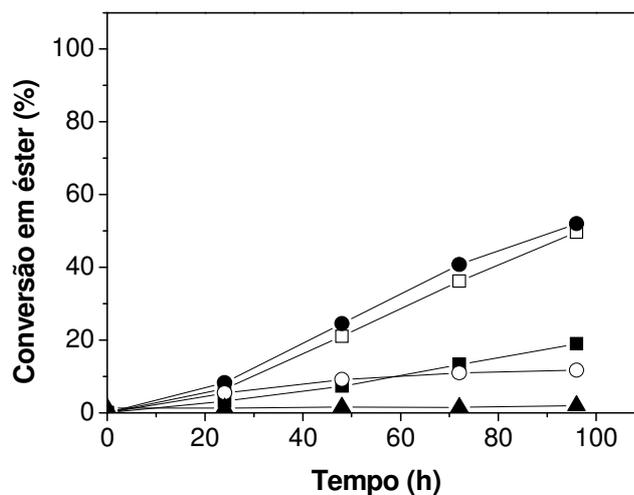


FIGURA 24 - INFLUÊNCIA DO TEOR DE ÁGUA NO MEIO REACIONAL NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Burkholderia cepacia* LTEB11. QUANTIDADES: (■) 0; (□) 0,5; (●) 1; (○) 5 e (▲) 10% (m/m TOTAL DOS SUBSTRATOS). CONDIÇÕES: RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÓLEO 3:1, 37°C, 180 rpm, REAÇÃO LIVRE DE COSSOLVENTE

O melhor resultado obtido em frascos agitados (cerca de 50% de conversão em 96 h) era ainda ruim se comparado a outros trabalhos de síntese de ésteres por transesterificação em meios livres de cossolventes utilizando lipases. Iso *et al.* (2001), por exemplo, obtiveram um rendimento de 100% em 10 h na reação de transesterificação entre o propanol e a trioleína utilizando uma lipase de *P. fluorescens* imobilizada em caulinite. Salis *et al.* (2008) observaram uma conversão de 96% em 49 h quando utilizaram uma lipase de *P. fluorescens* imobilizada em Accurel MP-1004 para a metanólise do óleo de soja. Assim, resolveu-se fazer estudos de reação de transesterificação em reator de leito fixo, a fim de tentar melhorar a conversão e o tempo de reação.

#### 4.2.8 Reações de transesterificação em reator de leito fixo

Vários autores têm utilizado reatores de leito fixo para a produção do biodiesel catalisada por lipases, visto que este tipo de reator oferece diversas vantagens quando comparado aos frascos agitados. Reatores de leito fixo são mais fáceis de operar, uma grande quantidade de enzima pode ser utilizada e,

principalmente, este tipo de reator pode ser empregado em escala industrial para evitar o rompimento do suporte pela força de agitação (SHIMADA *et al.*, 2002; ROYON *et al.*, 2007).

Neste trabalho, com o intuito de melhorar a conversão da reação de transesterificação, foram feitos estudos de otimização em um reator de leito fixo (item 3.3.7). No sistema de frascos agitados, contendo 30,28 g de meio reacional, somente era possível utilizar 1,5 g de sólido fermentado (ou seja, 0,0495 g de sólido por g de meio reacional), isto porque maiores quantidade de sólido fermentado faziam com que o meio não pudesse ser agitado eficientemente. Entretanto, no reator de leito fixo foi possível utilizar 3 g de sólido fermentado para 24,26 g de meio reacional (0,124 g de sólido por g de meio reacional). Assim, o reator de leito fixo apresenta uma relação 2,5 vezes maior de sólido por meio reacional.

Os experimentos em reator de leito fixo foram realizados de acordo com o item 3.3.7, por meio da recirculação dos substratos pelo reator em coluna em meio livre de cossolvente, utilizando-se 24 mmol de óleo de soja, 72 mmol de etanol e 3 g de sólido fermentado.

#### 4.2.8.1 Influência da temperatura de reação

Apesar de a velocidade da reação de transesterificação ter se mostrado maior quando se adicionou água no meio reacional, quando se utilizou frascos agitados, tentou-se catalisar a reação em reator de leito fixo sem a adição da água, tendo em vista que agora existe mais enzima por quantidade de álcool, o que poderia fazer com que a lipase fosse menos inibida pelo etanol.

Os experimentos em frascos agitados foram feitos a 37 °C, temperatura que corresponde à melhor temperatura para a reação de esterificação utilizando farelo de semente de girassol fermentado contendo a lipase de *B. cepacia* LTEB11 (FERNANDES *et al.*, 2007). Entretanto, no experimento inicial no reator de leito fixo a 37 °C, a conversão foi de apenas 19,6% em 41 h. A temperatura foi elevada para 46 °C neste experimento, o que levou a um aumento na velocidade da reação, com uma conversão de 41,7% sendo atingida em 70 h (FIGURA 25). Com base nesse

melhor resultado em temperaturas mais altas, outro experimento foi realizado a 50°C. A velocidade da reação foi significativamente maior, atingindo 76,9% em 70 h. Portanto, 50°C foi a temperatura empregada nos demais estudos em reator de leito fixo.

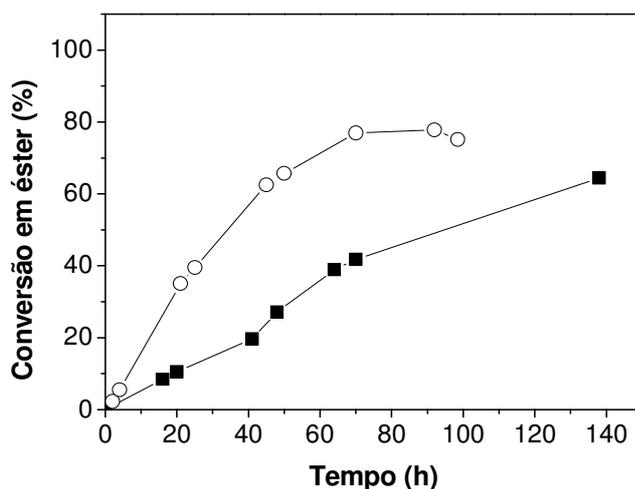


FIGURA 25 – INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Burkholderia cepacia* LTEB11. (■) TEMPERATURA INICIAL DE 37°C, ELEVADA PARA 46°C EM 41 h. (○) 50°C DURANTE TODA A REAÇÃO. CONDIÇÕES: RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÓLEO 3:1, FLUXO DE 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, REAÇÃO LIVRE DE COSSOLVENTE

Entretanto, no experimento da influência da temperatura em frascos agitados (4.2.7.2.2), a velocidade de reação quando se empregou a temperatura de 37°C foi significativamente maior do que quando a temperatura foi de 50°C. Provavelmente, em reator de leito fixo, o baixo fluxo (0,5 mL.min<sup>-1</sup>) deve ter propiciado uma separação parcial de fases dentro do reator a 37°C, o que não deve ter ocorrido a 50°C, pois nesta temperatura a solubilidade do álcool no óleo é maior. O aumento da temperatura também reduz a viscosidade de meio, facilitando a difusão dos substratos.

#### 4.2.8.2 Influência da adição de álcool ao meio reacional em etapas

É amplamente conhecido que algumas enzimas têm a sua atividade reduzida quando em contato com álcool. Assim, a adição do etanol ao meio reacional em etapas tem sido sugerida como forma de evitar o problema de perda de atividade. Este procedimento foi primeiramente proposto por Shimada *et al.* (1999), e tem sido adotado por muitos autores (DU *et al.*, 2004; HAMA *et al.*, 2007; HERNANDEZ-MARTIN; OTERO, 2008).

Tendo em vista que o sólido fermentado utilizado neste trabalho apresentou uma atividade reduzida quando em contato com etanol (FIGURA 21), experimentos foram então realizados adicionando-se o etanol em uma, duas ou três etapas, mas sempre mantendo a quantidade absoluta de etanol adicionado ao meio (FIGURA 26). Quando o etanol foi adicionado em mais de uma etapa, a adição foi feita quando a conversão em éster começava a entrar em equilíbrio.

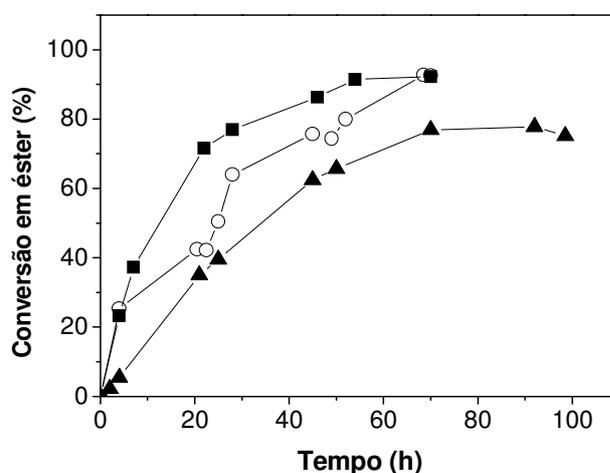


FIGURA 26 – INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE ETANOL EM ETAPAS NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Burkholderia cepacia* LTEB11. (▲) 1 ETAPA; (■) 2 ETAPAS, ADIÇÃO EM 0 E 7 h E (○) 3 ETAPAS, ADIÇÃO EM 0; 22,5 E 49 h. CONDIÇÕES: RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÓLEO 3:1, 50°C, FLUXO DE 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, REAÇÃO LIVRE DE COSSOLVENTE

Em comparação com a reação na qual todo o etanol foi adicionado no início da reação, maiores conversões foram atingidas quando se adicionou o etanol em duas e três etapas, resultando em uma conversão de cerca de 92% em 70 h

(FIGURA 26). Este resultado mostrou que, neste sistema, a adição do etanol em etapas evitou a redução da atividade da enzima causada pelo álcool.

Outros autores também relataram melhores resultados quando adicionaram o álcool no meio reacional em etapas. Shimada *et al.* (1999) observaram que a lipase de *C. antarctica* foi inativada em uma mistura contendo mais de 1,5 equivalente molar de metanol em relação ao óleo. A reação foi então conduzida com a adição de metanol em três etapas e assim obtiveram 98,4% de conversão em 48 h. Du *et al.* (2004), utilizaram a lipase de *C. antarctica* (Novozym 435) para catalisar a reação de transesterificação entre o óleo de soja e o metanol. Quando adicionaram o álcool em uma etapa obtiveram uma conversão de menos de 5% em 4h, o que não aumentou durante as 6 h seguintes. Entretanto quando adicionaram o álcool em três etapas a conversão atingiu cerca de 100% em pouco mais de 70 h.

#### 4.2.8.3 Influência da quantidade de água no meio reacional

O efeito da adição de pequenas quantidades de água foi estudado juntamente com adição de etanol em etapas. Assim como quando se estudou a reação em frascos agitados (FIGURA 24), quando todo o etanol foi adicionado no início do processo, a adição de 1% (m/m total dos substratos) de água levou a um aumento significativo na conversão (de 63 para 82% em 46 h) (FIGURA 27A). Entretanto, a adição de 2% de água não aumentou mais a velocidade da reação, obtendo-se 79% de conversão no mesmo tempo. Por outro lado, quando se adicionou o etanol em duas e três etapas, o aumento na conversão da reação obtido com 1% de água foi pequeno (de 86 para 95% em 46 h quando se adicionou em 2 etapas e de 88 para 93% no mesmo tempo quando a adição foi em 3 etapas) (FIGURA 27B e 27C).

Assim, a melhor condição foi quando se adicionou etanol em duas etapas e 1% de água, a conversão atingiu 95% em 46 h, e finalmente atingiu 98,0% em 70 h.

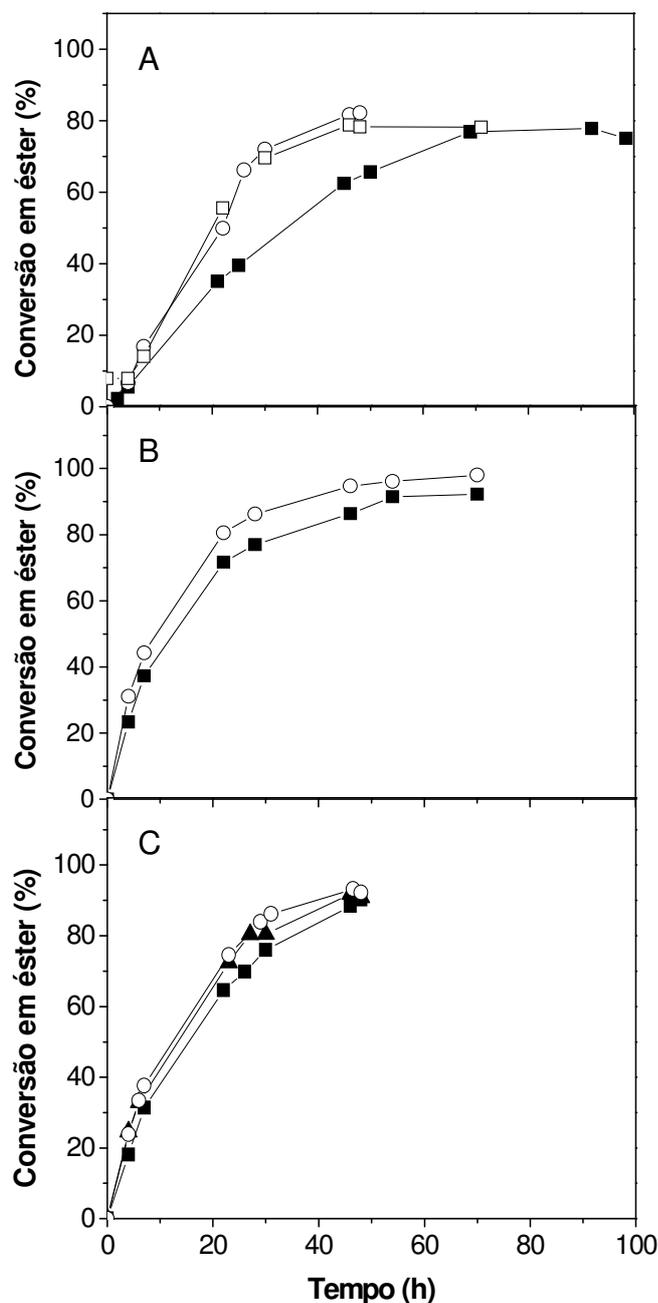


FIGURA 27 – INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE ÁGUA NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Burkholderia cepacia* LTEB11 (A) 1 ETAPA; (B) 2 ETAPAS, ADIÇÃO EM 0 E 7 h E (C) 3 ETAPAS, ADIÇÃO EM 0; 22,5 E 49 h. (■) SEM ÁGUA, (▲) 0,5% (m/m), (○) 1% (m/m) E (□) 2% (m/m) DE ÁGUA. CONDIÇÕES: RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÓLEO 3:1, 50°C, FLUXO DE 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, REAÇÃO LIVRE DE COSSOLVENTE

Este efeito do teor de água dependente da concentração de álcool no meio reacional já foi descrito por Kaieda *et al.* (2001), para a metanólise do óleo de soja usando a lipase de *P. cepacia* DSM 3959. Quando grandes quantidades de álcool

foram utilizadas, a presença de um pouco de água levou a maiores conversões do que aquelas obtidas quando não se adicionou água. Para baixas concentrações de álcool, este efeito não foi observado. Os autores sugeriram que a água estaria protegendo a lipase da inativação pelo álcool.

#### 4.2.8.4 Influência da velocidade de fluxo dos substratos através do reator

Estudou-se a influência do fluxo dos substratos através do reator. Foram testados os fluxos de 0,25; 0,5; 1 e 2 mL.min<sup>-1</sup>. Em todos os casos os perfis da reação foram muito similares (FIGURA 28), com o máximo de conversão (95%) atingindo o equilíbrio após 46 h de reação.

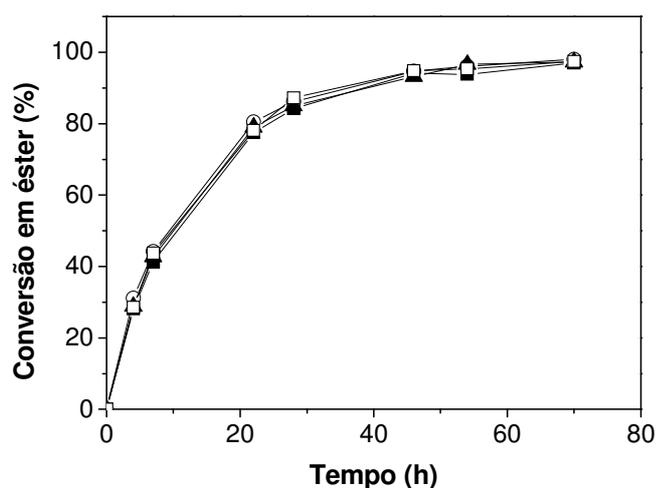


FIGURA 28 - INFLUÊNCIA DO FLUXO DOS SUBSTRATOS NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Burkholderia cepacia* LTEB11. (■) 0,25 mL.min<sup>-1</sup>; (○) 0,5 mL.min<sup>-1</sup>; (▲) 1 mL.min<sup>-1</sup>; (□) 2 mL.min<sup>-1</sup>. CONDIÇÕES: RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÓLEO 3:1, ADIÇÃO DE ETANOL EM 2 ETAPAS (0 E 7 h), 1% (m/m) DE ÁGUA, 50°C, REAÇÃO LIVRE DE COSSOLVENTE

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram ausência de efeito do fluxo dos substratos na conversão da reação, o que pode ser devido à faixa de fluxo estudada, cujas diferenças entre os valores poderiam ser muito baixas para produzirem um efeito significativo na conversão em éster. O fato de que, neste trabalho, obteve-se perfis de reação praticamente idênticos mesmo com um

aumento de 8 vezes no fluxo (0,25 para 2,00 mL.min<sup>-1</sup>) indica que provavelmente não ocorreram limitações difusionais no sistema estudado.

Os resultados reportados na literatura mostram diferentes efeitos da velocidade de fluxo dos substratos, como relatado a seguir.

Segundo Halim, Kamaruddin e Fernando (2009), em reatores de leito fixo, baixas conversões podem ser atingidas quando se utiliza baixos fluxos de substrato devido às limitações difusionais. Assim, o aumento do fluxo facilitaria a transferência de massa, aumentando as conversões. Por outro lado, alguns autores têm verificado que, quando se aumenta o fluxo, a conversão aumenta até um ponto máximo, a partir do qual, aumentos no fluxo levam a conversões mais baixas (CHEN *et al.*, 2009; CIFTCI; FADILOGLU; GOGUS, 2009; HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009). Este decaimento das conversões com o aumento do fluxo, segundo Halim; Kamaruddin e Fernando (2009), ainda não foi satisfatoriamente explicado, embora alguns autores sugiram que este comportamento seja devido ao curto tempo de contato do substrato com a lipase, que seria insuficiente para a catálise (NIE *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2009; CIFTCI; FADILOGLU; GOGUS, 2009).

Alguns autores verificaram uma alteração significativa na conversão de reações de transesterificação quando estudaram diferentes fluxos em reator de leito fixo. Royon *et al.* (2007) observaram uma grande mudança na conversão (de 95 para 53%) quando variaram o fluxo de 9,6 para 18 mL.h<sup>-1</sup> em uma reação de metanólise do óleo de semente de algodão. Chen *et al.* (2009), quando estudaram uma reação de metanólise de óleo proveniente de fritura de alimentos, observaram um aumento de 72 para 91% quando aumentaram o fluxo de 0,4 para 1,2 mL.min<sup>-1</sup> e uma redução para cerca de 85% quando aumentaram ainda mais o fluxo, para 1,5 mL.min<sup>-1</sup>. Entretanto, outros autores não observaram grandes mudanças na conversão quando variaram o fluxo dos substratos através da coluna. Nie *et al.* (2006), por exemplo, observaram que, mesmo aumentando o fluxo cerca de quatro vezes (12 a 40 L.h<sup>-1</sup>), a conversão foi minimamente modificada de 32 para 28%. Hama *et al.* (2007) também obtiveram um pequeno aumento na conversão (de 87 para 91%), quando o fluxo foi aumentado em torno de 10 vezes (de 5 para 55 L.h<sup>-1</sup>).

#### 4.2.8.5 Reutilização do sólido fermentado

Um importante parâmetro que afeta a viabilidade do processo é a estabilidade do biocatalisador e a sua possibilidade de reutilização (OGNJANOVIC; BEZBRADICA; KNEZEVIC-JUGOVIC, 2009). Assim como se estudou a reutilização da lipase produzida por *B. cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel EP-100, estudou-se também a possibilidade de reutilização do sólido fermentado (item 3.3.7.1).

Quando o sólido fermentado foi utilizado em reações sucessivas de 47 h no reator de leito fixo, a conversão inicial manteve-se após duas reutilizações. Após a terceira reutilização, a conversão começou a cair, atingindo aproximadamente a metade da conversão inicial após nove reutilizações do sólido fermentado (FIGURA 29).

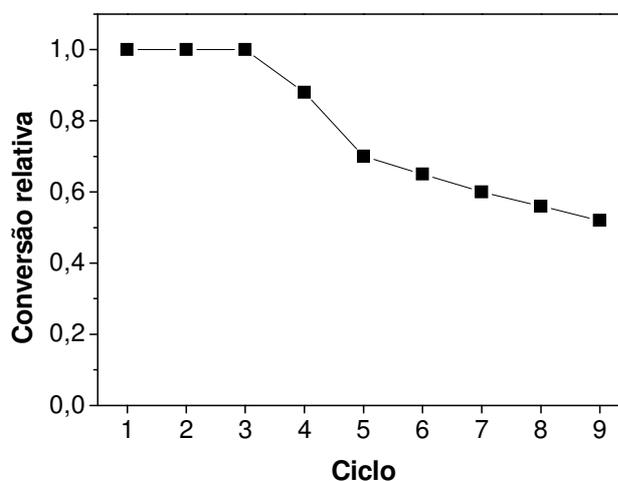


FIGURA 29 – REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Burkholderia cepacia* LTEB11 NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO. CONVERSÕES SÃO EXPRESSAS RELATIVAS À CONVERSÃO OBTIDA NO PRIMEIRO CICLO. CONDIÇÕES: 47 h DE REAÇÃO, RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÓLEO 3:1, ADIÇÃO DE ETANOL EM 2 ETAPAS (0 E 7 h), 1% (m/m) DE ÁGUA, 50 °C, FLUXO DE 1,5 mL.min<sup>-1</sup>, REAÇÃO LIVRE DE COSSOLVENTE

O sólido fermentado pôde ser utilizado para uma quantidade menor de reações sem queda na conversão, se comparado à lipase imobilizada em Accurel EP-100. Isso pode ter ocorrido devido a vários motivos: a) a reação catalisada pela lipase imobilizada foi realizada em meio de solvente orgânico apolar (*n*-heptano),

que costuma proteger a lipase da desnaturação (VILLENEUVE, 2007); b) na reação de esterificação não há a produção de glicerol no meio, o qual pode ficar adsorvido na superfície do biocatalisador, dificultando a catálise; c) O tempo de reação da reação de esterificação catalisada pela lipase imobilizada no experimento de reutilização era de apenas 6 h, deixando a lipase muito menos tempo exposta à temperatura quando comparado ao experimento de reutilização do sólido fermentado, que foi realizado com reações de 47 h de duração; d) a reação de transesterificação foi realizada a uma temperatura maior (50 °C) do que a de esterificação (37 °C); e) a forma como a lipase está adsorvida no sólido é diferente de como está adsorvida no Accurel EP-100, o que faz com que a estabilidade à temperatura possa também ser diferente.

#### 4.2.8.6 Determinação da atividade residual do sólido fermentado após a reutilização

Após o experimento anterior de reutilização do sólido fermentado para a síntese de ésteres etílicos em reator de leito fixo, determinou-se a atividade residual do sólido fermentado (conforme item 3.3.7.2), a fim de verificar se houve desnaturação ou dessorção da enzima do sólido fermentado. Os resultados mostrados correspondem à média e desvio padrão de três determinações.

A TABELA 12 mostra que as atividades contra os substratos tricaprilina e trioleína apresentaram-se 39,5 e 29,5% mais baixas quando comparadas à atividade inicial do sólido fermentado, respectivamente. Entretanto, a atividade contra a tributirina foi a mesma antes e após o ensaio de reutilização. A redução da atividade apenas contra os substratos de cadeia longa, pode indicar a presença de uma esterase no sólido fermentado, responsável pela atividade contra a tributirina, que não teria perdido atividade durante o experimento de reutilização.

Assim, a lipase teria perdido uma parte de sua atividade, provavelmente por desnaturação, mas não o suficiente para levar a conversões 50% menores do que a conversão da primeira reação no ensaio de reutilização, visto que a atividade contra a trioleína foi somente 29,5% mais baixa em relação à sua atividade inicial. Essa diferença entre as reduções de atividade nas reações de síntese do biodiesel e na hidrólise dos substratos de cadeia longa pode ter ocorrido devido ao glicerol

produzido na reação de transesterificação, que pode formar um filme na superfície do sólido fermentado, prejudicando o acesso dos substratos à lipase imobilizada no sólido fermentado. Este fenômeno tem sido bastante reportado (DOSSAT; COMBES; MARTY, 1999; DU *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2007; HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009), e ocorre devido à insolubilidade do glicerol no óleo ou no solvente orgânico, sendo facilmente adsorvido na superfície da lipase imobilizada (SOUMANOU; BORNSCHEUER, 2003; LI *et al.*, 2006). Além disso, o álcool pode migrar da mistura reacional para a camada de glicerol, ficando acumulado junto à lipase, inativando-a (SHIMADA *et al.*, 2002; WANG; WU; ZONG, 2008).

TABELA 12 – ATIVIDADE RESIDUAL DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Burkholderia cepacia* LTEB11 FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS APÓS 9 UTILIZAÇÕES PARA A REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO

SUBSTRATO	ATIVIDADE (U.g <sup>-1</sup> SS)		PORCENTAGEM DA ATIVIDADE INICIAL
	INICIAL	RESIDUAL	
tributirina	154,3 ± 6,6	147,0 ± 3,2	100,0
tricaprilina	65,6 ± 2,2	39,7 ± 0,2	60,5
trioleína	32,5 ± 0,4	22,9 ± 1,5	70,5

CONDIÇÕES: MÉTODO TITULOMÉTRICO, 37°C, pH 7

#### 4.2.8.7 Dosagem de glicerol no meio reacional e no sólido fermentado

Tendo em vista os resultados anteriores, e o fato de que, visualmente não se observava o glicerol no meio reacional após a conversão, decidiu-se dosar o glicerol no meio reacional e no sólido fermentado após a reação. Para isso, foi realizado um experimento nas condições otimizadas anteriormente por 46 h. Ao final deste período, o meio reacional foi submetido à dosagem do glicerol pelo método de Soloni (1971) (item 3.4.6.1). Foi encontrado um teor de apenas 0,24% ± 0,01 (m/m) de glicerol no meio, enquanto o valor esperado, estequiometricamente seria de 9,1% (m/m). Este resultado foi confirmado posteriormente por dosagem por cromatografia gasosa segundo a norma BS EM 14105, e apresentou 0,18% de glicerol. Esta diferença no teor de glicerol pode ser considerada aceitável, visto que as metodologias utilizadas foram bem diferentes.

O glicerol contido no sólido fermentado após a reação foi extraído 3 vezes com água e dosado pelo Método de Soloni (1971) (item 3.4.6.1). O extrato obtido apresentou 97,9% do glicerol produzido na reação.

Estes resultados indicam que o glicerol acumulado no sólido fermentado poderia ser responsável por parte da queda na conversão durante as repetidas reações no experimento de reutilização. Assim, em estudos futuros, o sólido poderia ser lavado para retirada do glicerol, para promover regeneração de parte da sua atividade. Este tipo de experimento já foi realizado por outros autores, que, após verificarem a rápida queda na conversão da butanolise do óleo de girassol com o passar do tempo quando utilizavam um processo contínuo, lavaram o biocatalisador com uma solução de butanol e água, eliminando o glicerol e mantendo a alta conversão da reação (DOSSAT; COMBES; MARTY, 1999).

Estes resultados se mostram interessantes do ponto de vista de processo de produção do biodiesel, visto que a remoção do glicerol, subproduto da reação, é uma etapa adicional requerida no processo e que acarreta aumento no custo de produção do biodiesel, tanto por processos químicos quanto por processos enzimáticos.

Os resultados obtidos neste trabalho para a síntese de ésteres por reação de transesterificação (95% em 46 h) são comparáveis aos resultados obtidos na literatura (TABELA 13). Os trabalhos listados na tabela são referentes a estudos em meios livres de cossolvente, como o deste trabalho. Existem muitos estudos de reações de transesterificação utilizando cossolventes, entretanto, o uso de cossolventes não é desejável, visto que precisam ser removidos do produto, aumentando o custo do processo, além de dificultar a recuperação do produto (LI *et al.*, 2006; ROYON *et al.*, 2007; WANG; WU; ZONG, 2008).

Este trabalho possui a vantagem de não utilizar uma lipase comercial. Entre os trabalhos listados, todos os que apresentaram resultados melhores do que os deste trabalho (ISO *et al.*, 2001; SALIS *et al.*, 2005; HERNANDEZ-MARTIN; OTERO, 2008; DIZGE; KESKINLER; TANRISEVEN, 2009; MACEIRAS *et al.*, 2009) utilizaram lipases comerciais, com exceção do trabalho de Baron (2008), que utilizou a lipase de *B. cepacia* LTEB11 para catalisar a etanolise do óleo de mamona.

TABELA 13 - ESTUDOS DE SÍNTESE DE BIODIESEL POR TRANSESTERIFICAÇÃO EM MEIO LIVRE DE COSSOLVENTE UTILIZANDO LIPASES IMOBILIZADAS (continua)

LIPASE	SUPORTE	ÁLCOOL	ÓLEO	CONVERSÃO (%)	TEMPO (h)	REUTILIZAÇÃO	REFERÊNCIA
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	bagaço de cana-de-açúcar e farelo de semente de girassol (50%)	etanol	soja	95	46	3 vezes sem queda e 50% de queda em 9 utilizações	este trabalho
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	polipropileno em pó (Accurel EP-100)	etanol	mamona	96	8	-	Baron (2008)
<i>Burkholderia cepacia</i>	ausência	metanol	soja	80	90	-	Kaieda <i>et al.</i> (2001)
<i>Burkholderia cepacia</i> (Amano)	gel hidrofóbico	metanol	soja	67	1	queda de cerca de 20% em 12 utilizações	Noureddini, Gao e Philkana (2005)
<i>Burkholderia cepacia</i> (Amano)	gel hidrofóbico	etanol	soja	65	1	queda de 5% em 11 utilizações	Noureddini, Gao e Philkana (2005)
<i>Burkholderia cepacia</i>	terra diatomácea (PS-D Amano)	1-butanol	trioleína	100	4	-	Salis <i>et al.</i> (2005)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	1-butanol	trioleína	40	50	-	Salis <i>et al.</i> (2005)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	etanol	soja	~100	7	queda de 16% em 9 utilizações	Hernandez-Martin e Otero (2008)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435) + esponja vegetal	metanol	canola	99	72	queda de 3% em 6 utilizações	Hajar <i>et al.</i> (2009)
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	metanol	proveniente de fritura	89	4	4 utilizações sem queda na conversão	Maceiras <i>et al.</i> (2009)

TABELA 13 - ESTUDOS DE SÍNTESE DE BIODIESEL POR TRANSESTERIFICAÇÃO EM MEIO LIVRE DE COSSOLVENTE UTILIZANDO LIPASES IMOBILIZADAS (conclusão)

LIPASE	SUORTE	ÁLCOOL	ÓLEO	CONVERSÃO (%)	TEMPO (h)	REUTILIZAÇÃO	REFERÊNCIA
<i>Candida antarctica</i>	resina acrílica (Novozym 435)	metanol	girassol	99	50	queda de 100% em 4 utilizações	Ognjanovic, Bezbradica e Knezevic-Jugovic, (2009)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (AK Amano)	caulinite	1-propanol	trioleína	100	10	queda de cerca de 33% em 2 utilizações	Iso <i>et al.</i> (2001)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (AK Amano)	polipropileno em pó (Accurel MP-1004)	metanol	soja	96	49	-	Salis <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhizopus oryzae</i>	espuma de poliuretano	metanol	soja	91	50	queda de 20% em 10 utilizações	Hama <i>et al.</i> (2007)
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	matriz de silicato	etanol	oliva	77	24	-	Hsu <i>et al.</i> (2004)
<i>Thermomyces lanuginosa</i> (Lipozyme-TL IM)	hidrotalcita	metanol	proveniente de fritura	92,8	105	-	Yagiz, Kazan e Akin (2007)
<i>Thermomyces lanuginosa</i> (Lipozyme TL)	STY-DVB-PGA*	metanol	canola	97	24	10 utilizações sem queda na conversão	Dizge, Keskinler e Tanriseven (2009)

NOTA: \* COPOLÍMERO DE ESTIRENO-DIVINILBENZENO CONTENDO POLIGLUTARALDEÍDO

O uso de lipases comerciais imobilizadas envolve um alto custo, tanto as lipases como os suportes para a imobilização são caros. Em comparação, a aplicação direta do sólido fermentado é menos custosa.

O sistema utilizado neste trabalho é similar ao utilizado por Hama *et al.* (2007), que cultivaram o fungo *R. oryzae*, produzindo e imobilizando ao mesmo tempo a lipase em espuma de poliuretano contendo um meio de cultivo líquido e então utilizaram os cubos de espuma como catalisador em reação de transesterificação. Entretanto, o meio de cultivo utilizado por eles tem um custo mais alto, por possuir nutrientes caros como polipeptona e óleo de oliva. Além disso, o sistema utilizado neste trabalho não gera efluente líquido, visto que todo o sólido seco é utilizado como catalisador.

Com relação à possibilidade de reutilização do biocatalisador, na maior parte dos trabalhos listados na TABELA 13, o biocatalisador pôde ser utilizado mais vezes sem queda na conversão da reação do que o biocatalisador utilizado neste trabalho, que pôde ser utilizado 3 vezes sem queda no rendimento e atingiu metade da conversão original na nona utilização. Entretanto, foi verificado que quase todo o glicerol produzido na reação fica adsorvido no sólido fermentado, o que deve estar atrapalhando a catálise. Assim é interessante estudar uma maneira de retirar o glicerol do sólido a fim de tentar aumentar a atividade da lipase.

Neste trabalho foram estudados dois tipos de preparações de lipases imobilizadas:

(a) lipase imobilizada em Accurel EP-100, que consiste na imobilização por adsorção por interações hidrofóbicas. Este é um tipo de sistema de imobilização “modelo”, visto que muitas lipases já foram imobilizadas neste tipo de suporte e utilizadas com sucesso para biocatálise;

(b) sólido fermentado contendo a lipase imobilizada, que consiste no sólido obtido por fermentação no estado sólido após secagem e foi utilizado diretamente no meio reacional. Este é um tipo de preparação muito pouco estudado até o momento.

Verificou-se que a lipase imobilizada em Accurel EP-100, como já esperado, apresentou uma boa atividade de síntese de ésteres em meio orgânico, apresentando altas conversões em tempos mais curtos do que os obtidos quando se utilizou a lipase livre. Comparou-se o desempenho da lipase imobilizada em Accurel EP-100 e o sólido fermentado para reação de esterificação. O sólido fermentado

apresentou resultados comparáveis com os resultados obtidos com a lipase imobilizada.

As duas preparações enzimáticas possuem vantagens e desvantagens ao serem utilizadas para síntese de ésteres. A lipase imobilizada constitui um sistema mais limpo, visto que não estão presentes células da bactéria e compostos de alta massa molecular. Além disso, este sistema possibilita a obtenção de uma preparação com uma alta concentração de lipase, assim, pode-se utilizar um volume menor da preparação de lipase imobilizada em Accurel EP-100, comparado ao sólido fermentado. Por outro lado, o sólido fermentado apesar de possuir uma atividade menor, possui a vantagem de ser uma preparação mais barata, visto que resíduos agro-industriais podem ser utilizados para a fermentação e etapas custosas do processo como a recuperação da lipase e sua imobilização são evitadas.

Assim, as duas preparações são adequadas para a síntese de diferentes ésteres. A lipase imobilizada em Accurel EP-100 seria mais adequada para a síntese de produtos de alto valor agregado e onde há a necessidade de utilização de um sistema mais limpo, que é o caso da síntese de drogas, por exemplo. Por outro lado, o sólido fermentado é mais adequado para a síntese de ésteres que somente são viáveis se comercializados a valores baixos e não necessitam de um cuidado tão rígido ou grau de pureza tão alto, que é o caso dos ésteres que compõem o biodiesel, por exemplo. Assim, neste trabalho, tendo em vista a aplicação sugerida (síntese do biodiesel) e a possibilidade de se explorar um tipo de preparação de baixo custo e pouco estudado até o presente momento, optou-se por utilizar o sólido fermentado para as reações de transesterificação e o estudo da utilização de reator de leito fixo.

A utilização do sólido fermentado em reator de leito fixo apresentou resultados comparáveis com os da literatura para a síntese do biodiesel, apresentando-se, portanto, como uma maneira barata para a síntese de ésteres.

## 5 CONCLUSÕES

A lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 produzida por fermentação submersa foi imobilizada em Accurel EP-100 e mostrou-se eficiente na catálise da reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol em *n*-heptano, catalisando a reação em 3 h com 100% de conversão. A preparação enzimática apresentou melhores resultados comparados a outros sistemas como o sistema micelar e a adição direta do extrato lipolítico liofilizado no meio reacional. Além disso, pôde ser utilizada para a reação de esterificação por 11 vezes sem queda no rendimento e só atingiu 50% da sua atividade original após 24 utilizações, fator muito importante na tentativa de viabilizar processos catalisados enzimaticamente.

A lipase de *B. cepacia* LTEB11 foi também produzida por fermentação no estado sólido. O sólido fermentado produzido pelo cultivo da bactéria em uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de semente de girassol pôde ser utilizado para catalisar a etanólise do óleo de soja para produzir biodiesel em um reator de leito fixo em coluna em um sistema livre de cossolvente, sendo possível atingir 95% de conversão em 46 h. O sólido fermentado pôde ser utilizado para a reação de transesterificação por três vezes sem queda no rendimento e atingiu 50% da sua atividade original após nove utilizações. A utilização do sólido fermentado diretamente no meio reacional evita a necessidade de etapas caras do processo como a recuperação da lipase e sua imobilização e, portanto, tem potencial para reduzir o custo da síntese do biodiesel catalisada enzimaticamente. Além disso, o produto obtido é praticamente livre de glicerol, o que constitui outro fator importante na redução do custo do processo.

## 6 PERSPECTIVAS

Este é um trabalho inovador, que abre novas perspectivas. Sugere-se como trabalhos futuros:

- Tendo em vista que a maior parte do glicerol fica adsorvida no sólido fermentado após a reação de síntese do biodiesel, verificar o efeito da lavagem do sólido fermentado com etanol após sua utilização para a síntese do biodiesel em reator de leito fixo, a fim de aumentar a vida útil do biocatalisador;
- Purificar o biodiesel por adsorção do glicerol residual pela percolação do meio reacional em uma coluna com bagaço de cana-de-açúcar no seu interior. Isto poderia reduzir o custo do processo de síntese do biodiesel, visto que a separação do glicerol é uma etapa custosa;
- Aumentar a escala de reação utilizando um reator de leito fixo em escala piloto para a síntese do biodiesel utilizando o sólido fermentado;
- Testar outras fontes de triacilgliceróis para a síntese do biodiesel, como óleo de microalga e gordura de rejeito de indústria alimentícia;
- Purificar as enzimas de *Burkholderia cepacia* LTEB11 a fim de verificar a presença de esterases;
- Estudar separadamente a lipase e possíveis esterases para síntese de ésteres;
- Utilizar uma lipase superexpressa para a obtenção de um sólido fermentado com atividade lipolítica mais alta, com o intuito de tentar reduzir o tempo de reação de síntese do biodiesel.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor sp.* **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 5, p. 589-595, 2003.
- ABDULLAH, A. Z.; SULAIMAN, N. S.; KAMARUDDIN, A. H. Biocatalytic esterification of citronellol with lauric acid by immobilized lipase on aminopropyl-grafted mesoporous SBA-15. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 2-3, p. 263-270, 2009.
- AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 207-215, 2000.
- AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 951-960, 2007.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.
- AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18 ed. Gaithersburg. AOAC International, 2005.
- ARDHAOU, M.; FALCIMAIGNE, A.; ENGASSER, J. M.; MOUSSOU, P.; PAULY, G.; GHOU, M. Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. n. p. 63-67, 2004.
- ASHARI, S. E.; MOHAMAD, R.; ARIFF, A.; BASRI, M.; SALLEH, A. B. Optimization of enzymatic synthesis of palm-based kojic acid ester using response surface methodology. **Journal of Oleo Science**, v. 58, n. 10, p. 503-510, 2009.
- ASSESSMENT AND STANDARDS DIVISION (OFFICE OF TRANSPORTATION AND AIR QUALITY OF THE US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 2002, EPA420-P-02-001p.
- ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION. **NF T60-233**: Vegetable or animal fats and oils: Preparation of methylesters of fatty acids. 1977.
- BARON, A. M. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. 138 f. Tese (Tese de doutorado) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BARON, A. M.; SARQUIS, M. I. M.; BAIGORI, M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 34, n. 1-6, p. 25-32, 2005.

BEN SALAH, R.; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368-372, 2007.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 2, p. 213-221, 2001.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; MUNOZ, N.; SERRA, E. Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 47, n. 1-2, p. 13-20, 2007.

BORNSCHEUER, U. T.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, S. H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 433-437, 2002.

BOUAID, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. A comparative study of the production of ethyl esters from vegetable oils as a biodiesel fuel optimization by factorial design. **Chemical Engineering Journal**, v. n. p. 93-99, 2007.

BOUSQUET-DUBOUCH, M. P.; GRABER, M.; SOUSA, N.; LAMARE, S.; LEGOY, M. D. Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. **Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1550, n. 1, p. 90-99, 2001.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 360 de 23 de dezembro 2003. **Diário Oficial da República Federativa de Brasil**, Brasília, 26 de dez. 2003.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Lei n. 11.097 de 13 de janeiro de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 jan. 2005.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP n. 7, de 19 de março de 2008. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 mar. 2008.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. **BS EN 14105:2003**: Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of free and total glicerol and mono-, di-, triglyceride contents. 2003.

CARVALHO, C. M. L.; CABRAL, J. M. S. Reverse micelles as reaction media for lipases. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1063-1085, 2000.

CHAIYASO, T.; H-KITTIKUN, A.; ZIMMERMANN, W. Biocatalytic acylation of carbohydrates with fatty acids from palm fatty acid distillates. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 338-342, 2006.

CHANG, C. S.; WU, P. L. Synthesis of triglycerides of phenylalkanoic acids by lipase-catalyzed esterification in a solvent-free system. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 4, p. 694-702, 2007.

CHANG, S. W.; YANG, C. J.; CHEN, F. Y.; AKOH, C. C.; SHIEH, C. J. Optimized synthesis of lipase-catalyzed L-ascorbyl laurate by Novozymo (R) 435. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 56, n. 1, p. 7-12, 2009.

CHEN, Y. M.; XIAO, B.; CHANG, J.; FU, Y.; LV, P. M.; WANG, X. W. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 3, p. 668-673, 2009.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHOWDARY, G. V.; PRAPULLA, S. G. The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 393-397, 2002.

CIFTCI, O. N.; FADILOGLU, S.; GOGUS, F. Conversion of olive pomace oil to cocoa butter-like fat in a packed-bed enzyme reactor. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 324-329, 2009.

COTE, A.; SHARECK, F. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 5, p. 381-388, 2008.

CRESPO, J. D. S.; QUEIROZ, N.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. The use of lipases immobilized on poly (ethylene oxide) for the preparation of alkyl esters. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 401-409, 2005.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. 1997. **Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases**. In: Lipases, Part A.

DALAL, S.; SINGH, P. K.; RAGHAVA, S.; RAWAT, S.; GUPTA, M. N. Purification and properties of the alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25609. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 51, n. p. 23-31, 2008.

DALLA ROSA, C.; MORANDIM, M. B.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J. V. Continuous lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed fluids. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5818-5826, 2009.

DAVE, R.; MADAMWAR, D. Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA-alginate-boric acid. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 951-955, 2006.

DHARMSTHITI, S.; LUCHAI, S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus sp* THL027. **Fems Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 241-246, 1999.

DIAZ, J. C. M.; RODRIGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1042-1050, 2006.

DIZGE, N.; KESKINLER, B.; TANRISEVEN, A. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 2-3, p. 220-225, 2009.

DOMINGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M. A.; SANROMAN, A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 15, p. 1225-1229, 2003.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3-5, p. 194-200, 1999.

DU, W.; XU, Y. Y.; LIU, D. H.; ZENG, J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 30, n. 3-4, p. 125-129, 2004.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 120 f. Tese (Tese de doutorado) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FERNANDES, M. L. M.; KRIEGER, N.; BARON, A. M.; ZAMORA, P. P.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 30, n. 1, p. 43-49, 2004.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 44, n. 1, p. 8-13, 2007.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; CABRERA, Z.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 5, p. 565-569, 2007.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298-1315, 2009.

FORDE, J.; Ó'FÁGÁIN, C. 2008. **Immobilized enzymes as industrial biocatalysts**. In: FLYNNE, W. G. *Biotechnology and Bioengineering*. New York: Nova Science Publishers, Inc.

FORESTI, M. L.; ALIMENTI, G. A.; FERREIRA, M. L. Interfacial activation and bioimprinting of *Candida rugosa* lipase immobilized on polypropylene: effect on the

enzymatic activity in solvent-free ethyl oleate synthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 2-3, p. 338-349, 2005.

FORESTI, M. L.; ERRAZU, A.; FERREIRA, M. L. Effect of several reaction parameters in the solvent-free ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilised on polypropylene. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, n. 1, p. 69-77, 2005.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. n. p. 23-30, 2005.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 769-777, 2007.

FU, B. Y.; VASUDEVAN, P. T. Effect of Organic Solvents on Enzyme-Catalyzed Synthesis of Biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 8, p. 4105-4111, 2009.

GAO, S. L.; WANG, Y. J.; WANG, T.; LUO, G. S.; DAI, Y. Y. Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 996-999, 2009.

GAYOT, S.; SANTARELLI, X.; COULON, D. Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. **Journal of Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 29-36, 2003.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y. 1-butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 4, p. 355-363, 2004.

GIRALDO, L. J. L.; LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; BAROUH, N.; BAREA, B.; VILLENEUVE, P. Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 6-7, p. 721-726, 2007.

GOMBERT, A. K.; PINTO, A. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 1-2, p. 85-90, 1999.

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

GRUNWALD, P. **Biocatalysis: Biochemical Fundamentals and Applications**. World Scientific Pub Co Inc, 2009.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5249-5254, 2009.

HA, S. H.; LAN, M. N.; LEE, S. H.; HWANG, S. M.; KOO, Y. M. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 4, p. 480-483, 2007.

HAAS, M. J.; MCALOON, A. J.; YEE, W. C.; FOGLIA, T. A. A process model to estimate biodiesel production costs. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 4, p. 671-678, 2006.

HAJAR, M.; SHOKROLLAHZADEH, S.; VAHABZADEH, F.; MONAZZAMI, A. Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 3, p. 188-194, 2009.

HALIM, S. F. A.; KAMARUDDIN, A. H.; FERNANDO, W. J. N. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 710-716, 2009.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 3, p. 273-278, 2007.

HARDING, K. G.; DENNIS, J. S.; VON BLOTTNITZ, H.; HARRISON, S. T. L. A life-cycle comparison between inorganic and biological catalysis for the production of biodiesel. **Journal of Cleaner Production**, v. 16, n. 13, p. 1368-1378, 2008.

HARTMANN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 8, p. 475-476, 1973.

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

HERNANDEZ-MARTIN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym (R) 435 and Lipozyme (R) TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 277-286, 2008.

HSU, A. F.; JONES, K. C.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Transesterification activity of lipases immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 11, p. 917-921, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, 2005.

ISO, M.; CHEN, B. X.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VANHEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **Fems Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29-63, 1994.

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

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 1, p. 12-15, 2001.

KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 505-511, 1998.

KEGL, B. Effects of biodiesel on emissions of a bus diesel engine. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 4, p. 863-873, 2008.

KHANAHMADI, M.; MITCHELL, D. A.; BEHESHTI, M.; ROOSTAAZAD, R.; SANCHEZ, L. R. Continuous solid-state fermentation as affected by substrate flow pattern. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 8, p. 2675-2687, 2006.

KIM, H. K.; SUNG, M. H.; KIM, H. M.; OH, T. K. Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus sp* strain 398. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 5, p. 961-962, 1994.

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

KOSE, O.; TUTER, M.; AKSOY, H. A. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 2, p. 125-129, 2002.

KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. 260 f. f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J. C.; BARON, A. M.; DE LIMA, V. M.; MITCHELL, D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 279-286, 2004.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems - An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 1-2, p. 1-30, 2005.

KRISHNA, S. H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 3-4, p. 239-267, 2002.

KUMAR, R.; MODAK, J.; MADRAS, G. Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 3, p. 199-202, 2005.

KVITTINGEN, L. Some aspects of biocatalysis in organic-solvents. **Tetrahedron**, v. 50, n. 28, p. 8253-8274, 1994.

KVITTINGEN, L.; SJURSNES, B.; ANTHONSEN, T.; HALLING, P. Use of salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalyzed synthesis in organic media - a practical procedure for organic chemists **Tetrahedron**, v. 48, n. 13, p. 2793-2802, 1992.

LAPUERTA, M.; ARMAS, O.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. Effect of biodiesel fuels on diesel engine emissions. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 2, p. 198-223, 2008.

LARISSEGGGER-SCHNELL, B.; GLUECK, S. M.; KROUTIL, W.; FABER, K. Enantio-complementary deracemization of (+/-)-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid and (+/-)-3-phenyllactic acid using lipase-catalyzed kinetic resolution combined with biocatalytic racemization. **Tetrahedron**, v. 62, n. 12, p. 2912-2916, 2006.

LESUISSE, E.; SCHANCK, K.; COLSON, C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus Subtilis* 168, an extremely basic pH tolerant enzyme **European Journal of Biochemistry**, v. 216, n. 1, p. 155-160, 1993.

LI, L. L.; DU, W.; LIU, D. H.; WANG, L.; LI, Z. B. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. n. p. 58-62, 2006.

LI, W.; DU, W.; LIU, D. H. Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 45, n. 3-4, p. 122-127, 2007.

LIMA, V. M. G. **Produção e Purificação de lipase de *Bacillus megaterium* e sua Aplicação em Biocatálise em Solventes Orgânicos**. 151 f. Tese (Tese de doutorado) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; DE FILIPPIS, I.; FONTANA, J. D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 31, n. 1-3, p. 53-61, 2004.

LIN, S. F.; CHIOU, C. M.; YEH, C. M.; TSAI, Y. C. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1093-1095, 1996.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 6, p. 258-265, 1985.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, I. J. Rapid colorimetric determination of free fatty-acids **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 53, n. 7, p. 470-472, 1976.

LOZANO, P.; DE DIEGO, T.; CARRIE, D.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L. Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide. **Journal of Molecular Catalysis a-Chemical**, v. 214, n. 1, p. 113-119, 2004.

LU, J. K.; CHEN, Y. W.; WANG, F.; TAN, T. W. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida sp* 99-125 in organic solvent system. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. n. p. 122-125, 2009.

LU, J. K.; NIE, K. L.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. W. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida sp* 99-125. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 1367-1370, 2007.

MA, L.; PERSSON, M.; ADLERCREUTZ, P. Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 1024-1029, 2002.

MACEIRAS, R.; VEGA, M.; COSTA, C.; RAMOS, P.; MARQUEZ, M. C. Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel from waste frying oil. **Fuel**, v. 88, n. 11, p. 2130-2134, 2009.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1729-1735, 2008.

MAJEWSKA, P.; KAFARSKI, P.; LEJCZAK, B. Simple and effective method for the deracemization of ethyl 1-hydroxyphosphinate using biocatalysts with lipolytic activity. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 17, n. 20, p. 2870-2875, 2006.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 11, n. 6, p. 1300-1311, 2007.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248-268, 2006.

MEZZETTI, A.; KEITH, C.; KAZLAUSKAS, R. J. Highly enantioselective kinetic resolution of primary alcohols of the type Ph-X-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>OH by *Pseudomonas*

*cepacia* lipase: effect of acyl chain length and solvent. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 14, n. 24, p. 3917-3924, 2003.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. 2006. **Solid-State Fermentation Bioreactor Fundamentals: Introduction and Overview**. In: Solid-State Fermentation Bioreactors. Heidelberg: Springer.

MONDAL, K.; MEHTA, P.; MEHTA, B. R.; VARANDANI, D.; GUPTA, M. N. A bioconjugate of *Pseudomonas cepacia* lipase with alginate with enhanced catalytic efficiency. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1764, n. 6, p. 1080-1086, 2006.

MOURA, R. A.; WADA, C. S.; A., P.; ALMEIDA, T. V. D. **Técnicas de Laboratório**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

MURRAY, M.; ROONEY, D.; VANNEIKERK, M.; MONTENEGRO, A.; WEATHERLEY, L. R. Immobilization of lipase onto lipophilic polymer particles and application to oil hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 6, p. 479-486, 1997.

NAOE, K.; AWATSU, S.; YAMADA, Y.; KAWAGOE, M.; NAGAYAMA, K.; IMAI, M. Solvent condition in triolein hydrolysis by *Rhizopus delemar* lipase using an AOT reverse micellar system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 1, p. 49-55, 2004.

NIE, K. L.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. W. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. n. p. 142-147, 2006.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 7, p. 769-777, 2005.

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5146-5154, 2009.

OH, B. C.; KIM, H. K.; LEE, J. K.; KANG, S. C.; OH, T. K. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. **Fems Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 385-392, 1999.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J. L.; VERSCHUEREN, K. H. G.; GOLDMAN, A. The Alpha/beta-hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.

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

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447-454, 2005.

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

PARK, Y. M.; LEE, D. W.; KIRN, D. K.; LEE, J. S.; LEE, K. Y. The heterogeneous catalyst system for the continuous conversion of free fatty acids in used vegetable oils for the production of biodiesel. **Catalysis Today**, v. n. p. 238-243, 2008.

PAVLIDIS, I. V.; GOURNIS, D.; PAPADOPOULOS, G. K.; STAMATIS, H. Lipases in water-in-ionic liquid microemulsions: Structural and activity studies. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 60, n. 1-2, p. 50-56, 2009.

PENCREACH, G.; BARATTI, J. C. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 417-422, 1996.

PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 833-841, 2002.

PETKAR, M.; LALI, A.; CAIMI, P.; DAMINATI, M. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, v. 39, n. 1-4, p. 83-90, 2006.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. D.; DE ANDRADE, J. B. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005.

PRIYA, K.; CHADHA, A. Synthesis of hydrocinnamic esters by *Pseudomonas cepacia* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 3-4, p. 485-490, 2003.

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

RASHID, U.; ANWAR, F. Production of biodiesel through optimized alkaline-catalyzed transesterification of rapeseed oil. **Fuel**, v. 87, n. 3, p. 265-273, 2008.

RATHI, P.; BRADDOO, S.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas sp* with the property of thermal activation. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 6, p. 495-498, 2000.

REES, D. G.; HALLING, P. J. Chemical modification probes accessibility to organic phase: proteins on surfaces are more exposed than in lyophilized powders (vol 27, pg 549, 2000). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 2-3, p. 281-292, 2001.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-48, n. p. 237-250, 2009.

RHEE, J. K.; AHN, D. G.; KIM, Y. G.; OH, J. W. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 817-825, 2005.

ROBLES-MEDINA, A.; GONZALEZ-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDAN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 398-408, 2009.

RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONCALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 51, n. 3-4, p. 100-109, 2008.

RODRIGUEZ, J. A.; MATEOS, J. C.; NUNGARAY, J.; GONZALEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2264-2269, 2006.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 648-653, 2007.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 3, p. 291-299, 2005.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 54, n. 1-2, p. 19-26, 2008.

SANDANA MALA, J. G.; EDWINOLIVER, N. G.; KAMINI, N. R.; PUVANAKRISHNAN, R. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 247-253, 2007.

SANT'ANNA, G. 2001. **Produção de enzimas microbianas**. In: LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. and SCHMIDELL, W. *Biotechnology Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher LTDA.

SHRAG, J. D.; LI, Y. G.; CYGLER, M.; LANG, D. M.; BURGDORF, T.; HECHT, H. J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T. J.; OLIVER, J. D.; STRICKLAND, L. C.; DUNAWAY, C. M.; LARSON, S. B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**, v. 5, n. 2, p. 187-202, 1997.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 409-414, 2007.

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

SHAW, J. F.; CHANG, S. W.; LIN, S. C.; WU, T. T.; JU, H. Y.; AKOH, C. C.; CHANG, R. H.; SHIEH, C. J. Continuous enzymatic synthesis of biodiesel with Novozym 435. **Energy & Fuels**, v. 22, n. 2, p. 840-844, 2008.

SHIEH, C. J.; LIAO, H. F.; LEE, C. C. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 88, n. 2, p. 103-106, 2003.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 76, n. 7, p. 789-793, 1999.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 133-142, 2002.

SILVA, J. E. S.; JESUS, P. C. Evaluation of the catalytic activity of lipases immobilized on chrysotile for esterification. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 75, n. 2, p. 157-162, 2003.

SILVA, R. C.; COTTING, L. N.; POLTRONIERI, T. P.; BALCAO, V. M.; DE ALMEIDA, D. B.; GONCALVES, L. A. G.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A. The effects of enzymatic interesterification on the physical-chemical properties of blends of lard and soybean oil. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 42, n. 7, p. 1275-1282, 2009.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SKOURIDOU, V.; CHRYSINA, E. D.; STAMATIS, H.; OIKONOMAKOS, N. G.; KOLISIS, F. N. Kinetic and modelling studies on the lipase catalysed enantio selective esterification of (+/-)-perillyl alcohol. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. n. p. 9-12, 2004.

SNELLMAN, E. A.; SULLIVAN, E. R.; COLWELL, R. R. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter sp* RAG-1. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 23, p. 5771-5779, 2002.

SOLONI, F. G. Simplified manual micromethod for determination of serum triglycerides **Clinical Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 529-&, 1971.

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

SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2607-2612, 2009.

TALUKDER, M. M. R.; HAYASHI, Y.; TAKEYAMA, T.; ZAMAM, M. M.; WU, J. C.; KAWANISHI, T.; SHIMIZU, N. Activity and stability of *Chromobacterium viscosum* lipase in modified AOT reverse micelles. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 22, n. 3-4, p. 203-209, 2003.

TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; VAN NGUYEN, T. B.; FEN, N. M.; MELISSA, Y. L. S. Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 60, n. 3-4, p. 106-112, 2009.

TRUBIANO, G.; BORIO, D.; ERRAZU, A. Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida antarctica* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 716-722, 2007.

TWEDDELL, R. J.; KERMASHA, S.; COMBES, D.; MARTY, A. Esterification and interesterification activities of lipases from *Rhizopus niveus* and *Mucor miehei* in three different types of organic media: a comparative study. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 6, p. 439-445, 1998.

VAN KAMPEN, M. D.; ROSENSTEIN, R.; GOTZ, F.; EGMOND, M. R. Cloning, purification and characterisation of *Staphylococcus warneri* lipase 2. **Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1544, n. 1-2, p. 229-241, 2001.

VARDANEGA, R.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; POLLONI, A.; RIGO, E.; NINOW, J. L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. D.; LUCCIO, M. D. A Systematic Study on Extraction of Lipase Obtained by Solid-State Fermentation of Soybean Meal by a Newly Isolated Strain of *Penicillium sp.* **Food Bioprocess Technology**, v. n. p. 2009.

VASUDEVAN, P. T.; BRIGGS, M. Biodiesel production-current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 421-430, 2008.

VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.

VIEIRA, A.; DA SILVA, M. A. P.; LANGONE, M. A. P. Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase. **Latin American Applied Research**, v. 36, n. 4, p. 283-288, 2006.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 6, p. 515-536, 2007.

VILLENEUVE, P.; BAROUH, N.; BAREA, B.; PIOMBO, G.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; TURON, F.; PINA, M.; LAGO, R. Chemoenzymatic synthesis of structured

triacylglycerols with conjugated linoleic acids (CLA) in central position. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1443-1452, 2007.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

VITOLO, M. 2001a. **Imobilização de Enzimas**. In: LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. and SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher LTDA.

VITOLO, M. 2001b. **Reatores com enzimas imobilizadas**. In: LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. and SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher LTDA.

VYAS, A. P.; VERMA, J. L.; SUBRAHMANYAM, N. A review on FAME production processes. **Fuel**, v. 89, n. 1, p. 1-9, 2010.

WANG, X. Q.; YU, X. W.; XU, Y. Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 2, p. 94-102, 2009.

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

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 77, n. 4, p. 355-360, 2000.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 78, n. 7, p. 703-707, 2001.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia-marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

WOLSKI, E.; MENUSSI, E.; REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, J.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium sp* in solid state and submerged fermentation: A comparative study. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 42, n. 9, p. 1557-1560, 2009.

YADAV, G. D.; DEVI, K. M. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 59, n. 2, p. 373-383, 2004.

YADAV, G. D.; DHOOT, S. B. Immobilized lipase-catalysed synthesis of cinnamyl laurate in non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 34-39, 2009.

YADAV, G. D.; JADHAV, S. R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 86, n. 1-3, p. 215-222, 2005.

YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A. N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chemical Engineering Journal**, v. n. p. 262-267, 2007.

YE, P.; XU, Z. K.; WANG, Z. G.; WU, J.; DENG, H. T.; SETA, P. Comparison of hydrolytic activities in aqueous and organic media for lipases immobilized on poly(acrylonitrile-co-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membrane. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 32, n. 4, p. 115-121, 2005.

ZHANG, T. Z.; YANG, L. R.; ZHU, Z. Q. Determination of internal diffusion limitation and its macroscopic kinetics of the transesterification of CPB alcohol catalyzed by immobilized lipase in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 2-3, p. 203-209, 2005.

ZHAO, X. G.; WEI, D. Z.; SONG, Q. X. A facile enzymatic process for the preparation of ibuprofen ester prodrug in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 36, n. 1-6, p. 47-53, 2005.

ZNIDARSIC-PLAZL, P.; PLAZL, I. Modelling and experimental studies on lipase-catalyzed isoamyl acetate synthesis in a microreactor. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1115-1121, 2009.