

MARCELO ANDRADE DE GODOY

**ESTUDO DA LIPASE *EVERSA® TRANSFORM 2.0* NAS FORMAS
LIVRE E IMOBILIZADA E SUA APLICAÇÃO NA REAÇÃO DE
TRANSESTERIFICAÇÃO DA TRIACETINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção de título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G589e
2019 Godoy, Marcelo Andrade de, 1990-
Estudo da lipase Eversa® Transform 2.0 nas formas livre e
imobilizada e sua aplicação na reação de transesterificação da triacetina
/ Marcelo Andrade de Godoy. - Viçosa, MG, 2019.
xi, 65 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Deusanilde de Jesus Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 55-65.

1. Lipase. 2. Alginatos. 3. Transesterificação. 4. Biodiesel. I.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa
de Pós-Graduação em Engenharia Química. II. Título.

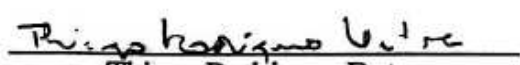
CDD 22. ed. 572.757

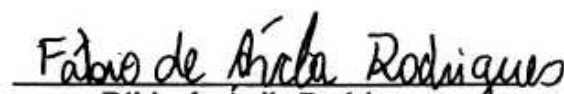
MARCELO ANDRADE DE GODOY

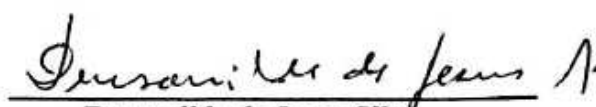
**ESTUDO DA LIPASE *EVERSA® TRANSFORM 2.0* NAS FORMAS
LIVRE E IMOBILIZADA E SUA APLICAÇÃO NA REAÇÃO DE
TRANSESTERIFICAÇÃO DA TRIACETINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção de título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de janeiro de 2019.


Thiago Rodrigues Dutra


Fábio de Ávila Rodrigues


Deusanilde de Jesus Silva
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, o grande responsável desta conquista.

À minha mãe que sempre esteve do meu lado transmitindo amor, carinho e compreensão, e apoiando as minhas escolhas sem medir esforços.

Ao meu irmão Leonardo, pelo apoio, incentivo e orações.

À minha namorada Isabelle e à sua filha Marcella, por todos os momentos de compreensão, dedicação, amor e amizade.

À minha família do coração Ana, Mário e Igor, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

Aos familiares que, de perto ou de longe, nunca deixaram de torcer por mim.

Aos meus amigos Rafael, Aurélio e André, pelo incentivo indispensável para a realização do mestrado.

Em especial, à minha orientadora, Prof.^a Dra. Deusanilde de Jesus Silva, pela confiança, orientação, apoio e incentivo durante a realização deste projeto.

Igualmente, à minha coorientadora Prof.^a Dra. Monique Renon Eller, pelo apoio e orientação.

À Prof.^a Dra. Valéria Monteze Guimarães, pela disponibilidade em me ajudar na realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Sebastião Tavares de Rezende e ao Prof. Dr. Fábio de Ávila Rodrigues, por se disponibilizarem a participarem da banca de avaliação deste trabalho.

À Camila, pela amizade, companherismo e ajuda na realização deste trabalho.

Ao Eduardo Rezende por toda ajuda oferecida e no suporte nas análises durante o meu trabalho experimental.

Ao Prof. Dr. Márcio José da Silva e ao Ricardo por toda ajuda oferecida, e aos seus orientandos do Laboratório de Catálise (LABCAT) da UFV que sempre me deram suporte nas análises durante o meu trabalho experimental.

A todos os amigos do Laboratório de Análises Bioquímicas, Roberta, Amanda, Mari, Elisa, Túlio, Rafa Ladeira, Rafa Venturim, LÍlian, Yan, Rizi e Eduardo, em especial Pollyana e Murillo, pela paciência, pelos ensinamentos e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

A todos os amigos do Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos, Danilo, Mateus, Paulo César, Talita, Eduardo, Jenifer, Lais, Jéssica, Diene, Beth, pela paciência, pelos ensinamentos e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

A todos os amigos do Laboratório de Processos Industriais e Materiais, Mayara e Rafael, em especial, a Sarah, que me apoiaram nas mais diferentes formas na realização deste trabalho.

Ao Bruno Vieira, pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao **Alexandre** Delphini Braz, Líder Comercial da Novozymes América Latina Ltda, pela doação da enzima *Eversa® Transform 2.0*, e ao Gilson Michasky, Gerente de Suprimentos da Buschle & Lepper S.A., pela doação da Triacetina.

À Universidade Federal de Viçosa, a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, pela oportunidade de realização do mestrado.

“Depois de substituir pensamentos negativos por positivos, você começará a ter resultados positivos.”

- WILLIE NELSON

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Biodiesel	2
2.2. Matérias-primas	2
2.3. Produção de biodiesel	4
2.4. Meio de atuação do catalisador.....	7
2.5. Biocatalisadores.....	8
2.6. Enzimas: Lipase	11
2.7. Imobilização de enzimas	15
2.8. Aprisionamento em alginato	17
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1. Materiais	22
4.2. Caracterização da enzima livre.....	22
4.2.1. Estimativa da massa molar por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	22
4.2.2. Determinação do ponto isoelétrico	23
4.2.3. Mensuração do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico da enzima na suspensão	23

4.3. Imobilização enzimática	24
4.3.3. Caracterização das esferas por Microscopia Eletrônica de Varredura	25
4.4. Utilização da enzima livre e imobilizada nas reações de transesterificação da triacetina	25
4.4.1. Delineamento experimental	25
4.5. Reuso da enzima imobilizada	28
4.6. Métodos analíticos	28
4.6.1. Determinação da atividade enzimática	28
4.6.2. Quantificação de proteínas	29
4.6.3. Cálculo da atividade específica	30
4.6.4. Cromatografia Gasosa (CG)	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Caracterização da enzima livre.....	31
5.1.1. Estimativa da massa molar por SDS-PAGE.....	31
5.1.2. Determinação do ponto isoelétrico da enzima.....	32
5.1.3. Mensuração do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico da enzima na suspensão.....	33
5.2. Imobilização enzimática	35
5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
5.4. Reação de transesterificação da triacetina	39
5.5. Reuso da enzima imobilizada	50
6. CONCLUSÕES	52
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

GODOY, Marcelo Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2019. **Estudo da lipase *Eversa® Transform 2.0* nas formas livre e imobilizada e sua aplicação na reação de transesterificação da triacetina.** Orientadora: Deusanilde de Jesus Silva. Coorientadora: Monique Renon Eller.

O presente trabalho investigou a reação de transesterificação enzimática para a produção de acetato de etila, fazendo uso da lipase *Eversa® Transform 2.0* nas formas livre e imobilizada em esferas de alginato de cálcio. Inicialmente, a enzima foi caracterizada quanto à massa molar, por eletroforese; ao ponto isoelétrico, por titulação potenciométrica, e à estabilidade e ao tamanho, por potencial zeta. A massa molar foi de, aproximadamente, 30 kDa, o ponto isoelétrico 6,8. Posteriormente, foi realizado o processo de imobilização da lipase *Eversa® Transform 2.0* por aprisionamento em microcápsulas de alginato de cálcio. Os resultados alcançados foram 14,6 % e 80 % para o rendimento e para a eficiência de imobilização, respectivamente. Os derivados imobilizados foram caracterizados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), por meio da qual foram observadas enzimas aglomeradas quando comparados com esferas referência, ou seja, sem enzima. O processo de transesterificação da triacetina utilizando a lipase *Eversa® Transform 2.0* nas formas livre e imobilizada foi avaliado utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional com 5 repetições no ponto central, variando o tempo de reação (de 3,9 a 24,1 h) e os teores de enzima (de 0,5 a 3,0 % (v/v)) e de água (de 1,0 a 6,0 % (v/v)), tendo como variável resposta a porcentagem de rendimento em acetato de etila. Tanto para a enzima imobilizada quanto para a enzima livre, as maiores taxas de rendimento em acetato de etila se deram quando foi utilizada a condição de 2,5 % de enzima e 5 % de água, embora o tempo de reação tenha sido de 8 h usando a enzima livre e de 20 h para a imobilizada. Com a enzima livre, o rendimento em acetato de etila foi de 39,3 %, enquanto que para a enzima imobilizada, o rendimento máximo foi de apenas 5,8 %, sendo, neste caso, a variável tempo de reação a mais significativa ($> 0,05$) do que as variáveis teores de enzima e de água, mostrando que o processo de imobilização não foi favorável ao rendimento em acetato de etila. Com relação ao reuso, foi possível observar que a atividade da enzima imobilizada foi mantida em 83,9 % da inicial, após o 1º ciclo, e que, após o 2º e 3º ciclos, as atividades foram de 39,0 e 23,8 %, das anteriores, respectivamente.

ABSTRACT

GODOY, Marcelo Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2019. **Study of the immobilization of lipase *Eversa® Transform 2.0* and its application in the transesterification reaction of triacetin.** Advisor: Deusanilde de Jesus Silva. Co-advisor: Monique Renon Eller.

The present work investigated the enzymatic transesterification reaction for the ethyl acetate production, by use of *Eversa® Transform 2.0* lipase in its free and immobilized forms on calcium alginate beads. Initially, the enzyme was characterized as molar mass by electrophoresis; isoelectric point, by potentiometric titration, and stability and size, by zeta potential. The molar mass was approximately 30 kDa, the isoelectric point 6,8. Subsequently, the immobilization process of the *Eversa® Transform 2.0* lipase was carried out by entrapment in microcapsules of calcium alginate. The results achieved were 14.6% for yield and 80% for immobilization efficiency. The immobilized derivatives were characterized by means of scanning electron microscopy (SEM), by which agglomerated enzymes were observed. The transesterification process of triacetin using *Eversa® Transform 2.0* lipase in its free and immobilized forms was evaluated using a Rotational Central Compound Design with 5 replicates at the central point, varying the reaction time (from 3.9 to 24.1 h) and the enzyme contents (from 0.5 to 3.0% (v / v)), and water (from 1.0 to 6.0% v / v), having the response variable the percent conversion in ethyl acetate. For both the immobilized enzyme and the free enzyme, the highest conversion rate occurred when 2.5% of enzyme and 5% of water were used, although the reaction time was 8 h for the reaction using the free enzyme and from 20 h to immobilized. The free enzyme was able to convert up to 39.3% in ethyl acetate, while the immobilized one converted at the most only 5.8%, being, in this case, the most significant reaction time variable (> 0.05) of the than the variable enzyme and water, showing that the immobilization process was unfavorable to the conversion into ethyl acetate. With regard to reuse, it was possible to observe that the activity of the immobilized enzyme was maintained in 83.9% of the initial one after the 1st cycle, and that after the 2nd and 3rd cycles, the activities were 39.0 and 23.8%, of the above, respectively.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de transesterificação de triglicerídeos: sequência de reações consecutivas e reversíveis.....	6
Figura 2. Mecanismo Ping-Pong Bi Bi da reação de transesterificação enzimática.	9
Figura 3. Esquema das principais reações catalisadas por lipases.	13
Figura 4. Ativação interfacial de lipases.	14
Figura 5. Estruturas dos blocos que constituem a molécula de alginato. M: ácido manurônico e G: ácido glicurônico.	18
Figura 6. Rearranjo das cadeias de alginato com cálcio, modelo "caixa de ovos".....	19
Figura 7. Configurações para o método gelificação por difusão.....	20
Figura 8. Reação de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila por lipases.	28
Figura 9. Padrão de proteínas obtido por SDS-PAGE (12%) da suspensão enzimática Eversa® Transform 2.0.	31
Figura 10. Titulação potenciométrica da lipase Eversa® Transform 2.0 diluída em água. Titulantes: (■) HCl 0,01 mol.L ⁻¹ e (●) NaOH 0,01 mol.L ⁻¹	32
Figura 11. Potencial zeta da enzima livre (mV) em soluções com diferentes valores de pH.	33
Figura 12. Valores dos diâmetros hidrodinâmicos das partículas nas suspensões contendo a enzima livre (nm) em soluções com diferentes valores de pH.	34
Figura 13. Esferas de alginato de cálcio. Figura a) sem enzima, Figura b) com enzima imobilizada.	38
Figura 14. Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura: Figura a) superfícies externa sem enzima; Figura b) superfície interna sem enzima; Figura c) superfície externa com enzima antes do uso Figura d) superfície interna com enzima antes do uso Figura e) superfície externa com enzima após o 3º uso Figura f) superfície interna sem enzima após o 3º uso.	38
Figura 15. Gráfico de Pareto para a resposta “rendimento em acetato de etila” pela enzima livre, em que se pode visualizar os valores significativos das interações das variáveis em estudo.....	41
Figura 16. Gráfico de Pareto para a resposta “rendimento em acetato de etila” para a enzima imobilizada, onde pode-se visualizar os valores significativos das interações das variáveis em estudo.	41

Figura 17. Porcentagem de rendimento em acetato de etila pela enzima livre, de acordo com a variação do teor de enzima e tempo de reação.	43
Figura 18. Porcentagem de rendimento em acetato de etila pela enzima livre, de acordo com a variação do teor de água e tempo de reação.	44
Figura 19. Porcentagem de rendimento em acetato de etila pela enzima livre, de acordo com a variação do teor de água e de enzima.	44
Figura 20. Porcentagem de rendimento em acetato de etila pela enzima imobilizada, de acordo com a variação do teor de enzima e água.	45
Figura 21. Porcentagem de rendimento em acetato de etila pela enzima imobilizada, de acordo com a variação do teor de água e tempo de reação.....	46
Figura 22. Porcentagem de rendimento em acetato de etila pela enzima imobilizada, de acordo com a variação do teor de enzima e de água.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físicas do óleo de soja, biodiesel e diesel	4
Tabela 2. Características das amostras aplicadas no gel.....	22
Tabela 3. Valores codificados e decodificados utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional para as reações de transesterificação utilizando a enzima Eversa® Transform 2.0 livre e imobilizada.	26
Tabela 4. Proporção de enzimas livres e esferas de enzimas imobilizadas utilizadas para as reações de transesterificação da triacetina.	27
Tabela 5. Porcentagens de rendimento em acetato de etila utilizando a enzima livre e imobilizada.	40
Tabela 6. Valores de rendimento em acetato de etila e de atividade recuperada para os 3 ciclos de reuso utilizando a enzima imobilizada.	51

1. INTRODUÇÃO

A necessidade do uso de biocombustíveis no cenário mundial se deve aos níveis finitos de reservas de fontes fósseis utilizadas para produção de combustíveis e à poluição desses, contribuindo para o efeito estufa e, conseqüentemente, para o aquecimento global. Dentre os principais biocombustíveis comerciais estão o bioetanol e o biodiesel. Atualmente, o biodiesel é obtido por meio do uso de catalisadores químicos básicos. Porém, o uso desse processo tem como conseqüências a necessidade de uma etapa de separação e purificação do produto com geração de efluentes; formação de sabão (subproduto), e gastos com solventes e com energia levando ao aumento considerável dos custos do processo (DHAWANE *et al.*, 2018). Em contrapartida, estudos para a produção do biodiesel fazendo uso da catálise enzimática têm demonstrado vantagens como a obtenção de produtos com pureza elevada, a não formação de sabões, e o uso de condições brandas no processo, diminuindo o consumo de energia e a geração de efluentes para tratamento. Outras vantagens são a possibilidade de uso de diversas matérias-primas no processo e a recuperação do glicerol numa etapa mais simples (GULDHE *et al.*, 2015; AMINI *et al.*, 2017). Porém, o custo das enzimas e a sua estabilidade são aspectos desfavoráveis ao seu uso em escala industrial. Além disso, sua reutilização pode ser um processo complexo. O processo de imobilização ou encapsulação dessas enzimas em suportes torna-se uma alternativa para contornar essas dificuldades (JESIONOWSKI *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2013; HAMA *et al.*, 2018).

Embora a imobilização de uma enzima livre possa levar a um aumento de sua estabilidade (MOHAMMADI *et al.*, 2016) e proporcionar a viabilização de sua reutilização, facilitando ainda sua separação do meio reacional, ela pode causar a redução de sua atividade. Devido a isto, é essencial que seja estipulado, para cada enzima, um procedimento para a imobilização (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Entre os desafios de imobilização de enzimas estão as limitações difusionais e os custos adicionados ao processo de imobilização (VILLENEUVE *et al.*, 2000). No caso da imobilização de lipase, outro aspecto desfavorável trata-se do glicerol liberado na transesterificação, o qual pode se concentrar nos suportes ocasionando o entupimento dos poros (YANG *et al.*, 2016). Outros aspectos a serem considerados são a possibilidade de quebra do suporte e a aglomeração da glicerina no mesmo, além da possível desativação da enzima pelo álcool (XU *et al.*, 2011). Assim a utilização comercial de enzimas imobilizadas para produção de biodiesel ainda é um desafio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biodiesel

Os biocombustíveis são oriundos de biomassas renováveis que podem ser utilizados de forma total ou parcial em substituição aos combustíveis fósseis (ZHANG *et al.*, 2017; DEMIRBAS *et al.*, 2016) em motores de combustão ou outra forma de geração de energia (ANP, 2018), e como atrativo à destinação de resíduos agrícolas e agroindustriais (FREITAS, 2018). O biodiesel apresenta vantagens comparativas em relação ao diesel de petróleo como teor de enxofre baixo ou traço, baixa poluição, excelente lubricidade e facilidade de transporte e armazenamento (LI *et al.*, 2014).

Considerando as vantagens citadas anteriormente, a mistura do biodiesel ao diesel fóssil vem crescendo ao longo dos anos. Iniciada em 2003, se tornou voluntária com o percentual de 2% até 2007, quando se tornou obrigatória a sua inserção na matriz energética brasileira em janeiro de 2008 com a adição de 2% do biodiesel no diesel (B2). O percentual evoluiu com os anos, Jul/2008 - 3%, Jul/2009 - 4%, Jan/2010 - 5%, Ago/2014 - 6%, Nov/2014 - 7% e em Mar/2018 - 10% (ANP, 2018).

2.2. Matérias-primas

O biodiesel pode ser produzido a partir de diversas matérias-primas, incluindo oleaginosas (soja, girassol, canola, mamona, algodão, entre outros), gorduras de fonte animal (sebos), óleos residuais (óleos de fritura) (ISSARIYAKUL *et al.*, 2014; SAJJADI, *et al.*, 2016), algas (NAUTIYAL *et al.*, 2014) e cianobactérias (KARATAY *et al.*, 2011).

A maior parte da composição de óleos e gorduras é constituída por ácidos graxos combinados a uma molécula de glicerol na forma de mono, di ou triacilglicerídeos, mas podem possuir também ácidos graxos na forma livre (BACKES, 2011).

As estruturas das cadeias graxas estão diretamente ligadas com a origem do óleo ou da gordura que irão influenciar nas propriedades físico-químicas do biodiesel. A diferença nas cadeias graxas pode ser o tamanho e o número de insaturações, bem como as suas proporções. Alguns ácidos graxos podem, também, apresentar grupos funcionais, tais como álcoois, cetonas, epóxidos, etc., e mesmos ramificações (PINHO e SUAREZ, 2017).

O uso do óleo *in natura* como combustível foi extinto devido às modificações realizadas nos motores visando o aumento de sua eficiência. Para fazer destes como combustível, é realizada uma modificação química para aproximar suas especificações ao do óleo diesel (PINHO e SUAREZ, 2017).

Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2018), em 2017, a soja continuou sendo a principal matéria-prima para a produção de biodiesel (B100), equivalente a 71,6% do total, com aumento de 1,7% em relação a 2016. A segunda matéria-prima no ranking de produção das usinas foi a gordura animal (16,8% do total), com aumento de 15,6% em relação a 2016, seguida por outros materiais graxos (11,3% do total) e pelo óleo de algodão com 0,3% de participação do total. Dessa forma, é natural que as especificações do biodiesel produzido sejam muito influenciadas pelas características do óleo de soja no material de partida, o qual apresenta, em média, 0,914 a 0,922 g.cm⁻³ de densidade relativa à 25 °C, 120 a 143 de índice de iodo (Wijs); 189 a 198 gKOH.g⁻¹ óleo de índice de saponificação (MAPA, 1993) e ponto de fusão médio -20°C (CETESB/SP, 2018).

Segundo Mertins (2008), uma única fonte oleaginosa pode possuir 10 tipos diferentes de ácidos graxos ligados à glicerina, e a composição desses óleos está relacionada à função de cada uma dessas moléculas para a fisiologia da planta. Para o óleo de soja, segundo o MAPA (2018), a composição percentual em ácidos graxos pode ser encontrada: saturados (mirístico: traços, palmítico: 9,0 a 14,5%, esteárico: 2,5 a 5,0%, araquídico: traços, behênico: traços e lignocérico: traços) mono-insaturados (palmitoléico: traços e oléico: 18,0 a 34,0%) e poli-insaturados (linoléico: 45,0 a 60,0% e linolênico: 3,5 a 8,0%).

Considerando a complexidade natural dos materiais graxos utilizados na produção de biodiesel, o uso de moléculas modelos tem sido adotado em trabalhos na literatura para estudos de efeitos específicos. Uma das moléculas usadas é a triacetina (LÓPEZ *et al.*, 2005; ZIEBA *et al.*, 2007; MUÑIZ *et al.*, 2016; TEMÓTEO *et al.*, 2018).

A triacetina, tri acetato de glicerol, é um derivado da glicerina, porém com maior valor econômico que a mesma. É quimicamente artificial e presente em vários setores da indústria, utilizado como antioxidante para combustíveis e possui a capacidade de alterar a viscosidade e o ponto de fluidez do biodiesel a frio (MUFRODI *et al.*, 2013). A triacetina é uma substância pouco polar devido à posição geométrica que se encontram os três grupos ésteres que a formam e das estruturas de ressonância dos grupos carboxilas, mesmo com a alta atonicidade dos átomos de oxigênio (DE OLIVEIRA, 2016). Sua massa molar é de 218 g.mol⁻¹ (SILVA *et al.*,

2018). A triacetina pode ser usada como molécula modelo de triglicerídeos. Sua estrutura e massa molar são menores quando comparadas aos triglicerídeos do óleo de soja refinado. Estes apresentam massa molar média $873,32 \text{ g.mol}^{-1}$, são insolúveis em água, ou seja, apolares, são formados de produtos de condensação entre glicerol e ácido graxos (composto por três moléculas de ácidos graxos esterificados em uma molécula de glicerol). Portanto, a utilização da triacetina pode facilitar no manuseio e nas análises do produto formado na reação em estudo.

2.3. Produção de biodiesel

Os processos que podem ser utilizados para a produção de biodiesel são: pirólise ou craqueamento, micro-emulsão e transesterificação (MEHER *et al.*, 2006). Este último se destaca por ser considerado o processo mais viável para produção comercial, pela popularidade e simplicidade em sua obtenção em grandes volumes, onde as semelhanças físicas do biocombustível para com o diesel mineral são grandes (AKOH *et al.*, 2007). Na Tabela 1 estão descritas algumas características físicas do óleo de soja, do biodiesel e do diesel, onde estas semelhanças podem ser constatadas, especialmente com relação à densidade e à viscosidade.

Tabela 1. Características físicas do óleo de soja, biodiesel e diesel

Substância	Densidade relativa, kg. m ⁻³	Viscosidade cinemática a 40 °C, mm ² /s	Número de cetano, min	Poder calorífico inferior, kcal/kg	Teor de S, %	Referência
Óleo de soja	920	36	36	8.530	<0,1	Araújo <i>et al.</i> , 2018
Biodiesel	850-900	3,0 – 6,0	42	8.960	0,0000 1	ANP, 2012
Diesel	828	1,6-6,0	45	10.220	1,3	Araújo <i>et al.</i> , 2018

Como citado anteriormente, é possível também o uso de óleos vegetais e suas misturas diretamente com o diesel mineral (MEHER *et al.*, 2006). Porém, devido às propriedades físico-químicas dos óleos vegetais como sua alta viscosidade (Tabela 1), acidez, baixa volatilidade,

presença de ácidos graxos livres, presença de gomas, existência de poli-insaturação, prejudicam os motores (combustão incompleta), seu uso de forma direta é desestimulado (KNOTHE, 2006). O processo de obtenção do biodiesel usando a reação de transesterificação, dentre outros processos, é utilizado visando reduzir a viscosidade dos óleos vegetais, resultando, após as etapas de purificação, em um produto (biodiesel) com características mais próximas ao diesel mineral (GERIS *et al.*, 2007; BASHA *et al.*, 2009).

Na produção de biodiesel, os catalisadores podem ser classificados em homogêneos e heterogêneos de acordo com o estado físico em relação ao meio reacional (RUHUL *et al.*, 2016) e básico, ácido e enzimático de acordo com a sua natureza química/bioquímica (DIAMANTOPOULOS *et al.*, 2015).

O biodiesel é uma mistura de mono-álquil ésteres de ácidos graxos oriundos da reação de transesterificação de triglicerídeos de origem vegetal (óleos) ou animal (gorduras) com um álcool de baixa massa molar, metanol ou etanol, na presença de um catalisador e glicerol como principal subproduto (ZHANG *et al.*, 2017; FIRDAUS *et al.*, 2016). Os catalisadores mais empregados para a reação de transesterificação são básicos (KEERA *et al.*, 2011), ácidos (SU E GUO, 2014) e lipases (SU *et al.*, 2016). Ocorre uma sequência de três reações (Figura 1), que podem ser reversíveis, convertendo os triglicerídeos em diglicerídeos, seguido pela conversão deste último em monoglicerídeos (DEMIRBAS, 2008, DIZGE *et al.*, 2009).

O uso em excesso do álcool no meio reacional tem como finalidade elevar o rendimento em ésteres e deslocar o equilíbrio da reação no sentido do produto (FERREIRA, 2017).

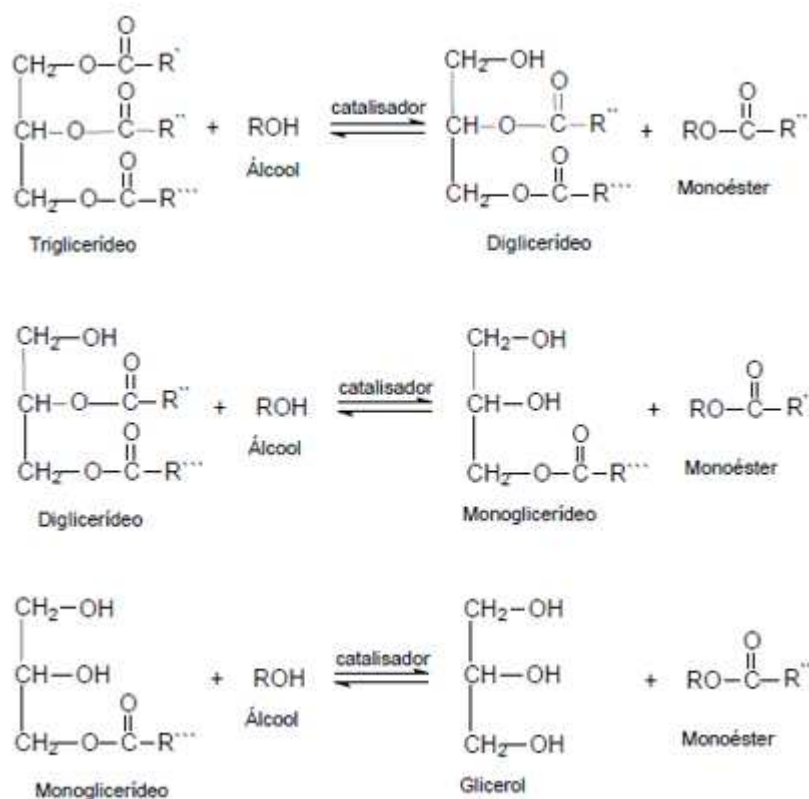


Figura 1. Reação de transesterificação de triglicerídeos: sequência de reações consecutivas e reversíveis.

Fonte: SILVA (2008).

Para que o biodiesel seja comercializado para uso em veículos e motores, este deve atender às especificações regida pelo órgão responsável do governo (ANP), Resolução ANP nº 30/2016 e Resolução ANP nº 45/2014. Estas resoluções trazem especificações dos parâmetros que são determinados por faixas limites de características físico-químicas. Nas especificações, estão inseridas também as normas técnicas para análises e determinação desses parâmetros de caracterização e sua importância (RAMPIN, 2007), como pode ser observada algumas na Tabela 1.

Diversos parâmetros podem induzir de forma diferente esta reação como: catalisadores (básicos, ácidos ou enzimáticos), pureza dos reagentes, temperatura, agitação e a relação molar proporcional entre álcool: material graxo (NARASIMHARAO *et al.*, 2007).

2.4. Meio de atuação do catalisador

Considerando a reação de transesterificação, um dos aspectos importantes e que tem sido muito estudado é o tipo de catálise e respectivo catalisador.

2.4.1. Homogêneo

A catálise homogênea é caracterizada por apresentar o catalisador e os reagentes na mesma fase no meio reacional, ou seja, o sistema é monofásico (LOTERO *et al.*, 2005). A catálise homogênea pode ser aplicada à reações na fase gasosa e, principalmente, na fase líquida (VIEIRA *et al.*, 2018).

Para a produção de biodiesel, podem ser empregados catalisadores ácidos e básicos. Porém, atualmente, nas plantas comerciais de produção de biodiesel são aplicados os catalisadores básicos homogêneos como hidróxidos alcalinos ou alcóxidos metálicos (SOTOFT, 2010). O uso destes catalisadores demonstra ser eficaz, alcançando rendimentos elevados. Entretanto, apresentam algumas desvantagens, como a necessidade de neutralização e problemas com contaminação do produto, necessitando da etapa de separação e purificação do mesmo (DHAWANE *et al.*, 2018), conforme já citado anteriormente.

2.4.2. Heterogêneo

A catálise heterogênea, mais conhecida como catálise de contato, ocorre em um meio reacional onde o catalisador distingue da fase dos outros reagentes, normalmente um sólido com fluidos. A velocidade de reação está associada com a área disponível para interação entre os compostos e a reação ocorre na interface entre eles pelo fenômeno de adsorção química com quebra e, ou, formação de ligações químicas (VIOMAR, 2013).

A busca por eficiência, ou seja, elevadas taxas de conversões e menores custos para a reação de transesterificação, influenciaram na pesquisa a respeito de diferentes catalisadores heterogêneos, tanto básicos como ácidos (SAMPAIAO, 2008). O interesse no uso desses catalisadores na produção de biodiesel foi devido às suas inúmeras vantagens, como a facilidade de separação do meio reacional, por simples filtração e sem uso de solvente; a

facilidade de regeneração e reutilização dos mesmos (ZABETI *et al.*, 2009; SHARMA, 2011); a geração de menos águas residuais (GULDHE, 2015) e eliminação de reações paralelas, e por apresentarem maior resistência mecânica, logo reduzem os custos do processo (DOSSIN, 2006; VIOMAR, 2013).

2.5. Biocatalisadores

A produção de biodiesel por catálise enzimática se dá por meio da aplicação e eficácia do uso de lipases, apesar do custo elevado e limites de estabilidade estreito. Este processo apresenta vantagens como produtos com elevada pureza, ou seja, sem formação de sabões; o consumo de energia é menor devido às condições brandas de reação utilizadas; menor geração de águas residuais; possibilidade de uso de diversas matérias-primas, e simplicidade no processo de recuperação do glicerol (HALIM *et al.*, 2009; GHALY *et al.*, 2010; GULDHE *et al.*, 2015; AMINI *et al.*, 2017), porém, o seu custo e estabilidade limitam a sua aplicabilidade industrial (AMINI *et al.*, 2017). Outra vantagem, a catálise enzimática é eficaz perante a acidez de óleos usados, elevando assim o rendimento de biodiesel, não ocorrendo a formação de sabão que ocorre, normalmente, na transesterificação básica (DIZGE *et al.*, 2009).

O destaque das lipases está em sua elevada especificidade pelo substrato que ultrapassa a de outras enzimas conhecidas (DUARTE *et al.*, 2006). Apresentam vantagens comparativas em relação aos catalisadores químicos, como seletividade quiral (enantio) e posicional (régio); opção sustentável e financeiramente viável (SCHMID *et al.*, 2001; GHALY *et al.*, 2010).

A reação de transesterificação enzimática é conhecida como mecanismo de *Ping- Pong Bi Bi*, ou seja, um mecanismo que consiste em dois passos, conforme mostrado na Figura 2 (FEDOSOV e XU, 2011). Inicialmente, a enzima livre (E) reage com o triglicerídeo (T) formando o complexo E · T. Ocorre então a formação de diacilglicerol (D) e ácido gordo (F) a partir da reação de hidrólise em uma ligação éster de triacilglicerol (T). Logo, o produto, D, é liberado do complexo E · D · F, onde a enzima se mantém no complexo (E · F). Este complexo pode reagir com um álcool (Al) para formar um éster alquílico (E) (reação de esterificação) ou com água (W) para formar (F) (reação de hidrólise), onde, posteriormente, a enzima é liberada. A reação para D e monoacilglicerol (M) ocorre por um processo semelhante (Figura 2) (CHEIRSILP *et al.*, 2008).

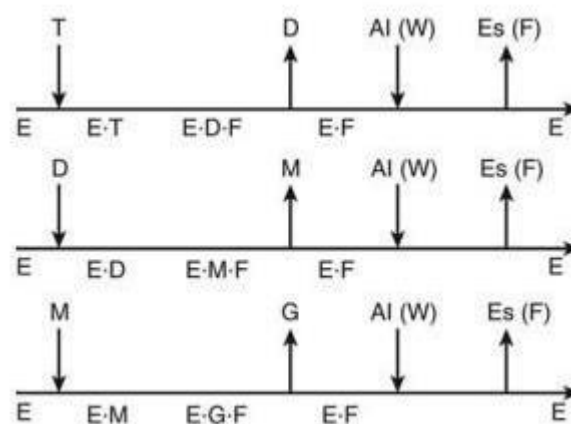


Figura 2. Mecanismo Ping-Pong Bi Bi da reação de transesterificação enzimática.

Fonte: (CHEIRSILP *et al.*, 2008).

Um desafio para a escala industrial é o custo da lipase que, comparada aos catalisadores químicos convencionais, possui um valor maior. Entretanto, os estudos e a busca por novas alternativas influenciaram em novas possibilidades, ou seja, sua aplicação nas indústrias de alimentos, cosméticas e farmacêuticas (SINGH *et al.*, 2014), além das vantagens apresentadas pelos biocatalisadores quando aplicados ao processo de produção do biodiesel.

A reação de transesterificação alcança valores de rendimento de acordo com os parâmetros empregados, como a razão molar álcool:óleo, a temperatura, o teor de água na mistura reacional, o tipo de álcool, o uso de solvente orgânico, a temperatura e o pH (NORJANNAH *et al.*, 2016; BABAKI *et al.*, 2016).

No processo de produção de biodiesel, a razão molar álcool:substrato é consideravelmente importante. O uso do álcool em excesso tem por finalidade garantir que a reação seja efetivada satisfatoriamente e reduzir os efeitos das limitações de difusão. Porém, o uso, além do excesso necessário, acarreta a inibição da enzima, fazendo decair sua atividade de catálise na reação (ZHAO *et al.*, 2014). Logo, a razão álcool:triglicerídeo elevada pode resultar em uma polaridade do meio reacional maior, produzida pelo álcool e pela água, interferindo no rendimento em biocombustível (RODRIGUES, 2009).

Grande parte das reações para produção de biodiesel envolve o metanol, devido à sua alta reatividade. Entretanto, dentre os álcoois com baixa massa molar, o metanol é o mais tóxico e polar, diferentemente do etanol que é definitivamente mais aceito no meio industrial por ser ambientalmente mais correto e apresentar menor toxicidade (SASSO *et al.*, 2015).

A adição de água no meio reacional é necessária mas deve ser realizada de forma controlada. Sua função é manter a enzima ativa, mas pode também acarretar na sua desativação, propiciar a aglomeração de partículas da enzima e limitar a difusão e hidrólise do substrato. A área interfacial da enzima aumenta com a adição de água. Porém, pode estimular a reação de hidrólise, competindo com a transesterificação (RODRIGUES, 2009; FIRDAUS *et al.*, 2016).

A elevação da temperatura do meio reacional aumenta a taxa de reação. Entretanto, a catálise enzimática ocorre em temperaturas mais suaves. Adicionalmente, com o aumento brusco de temperatura, a enzima pode ser inativada (SALVADOR *et al.*, 2009).

O uso de lipases imobilizadas tem sido alvo de estudos (HUANG *et al.*, 2010; BERGAMASCO *et al.*, 2013; ARUMUGAM *et al.*, 2014). Esta técnica possui algumas vantagens para superar algumas deficiências do uso de enzimas na sua forma livre como a estabilidade, a atividade, a especificidade, a seletividade, a redução da inibição, a fácil separação do meio reacional, a reutilização e a sua aplicação em vários tipos de reatores (IDRIS e BUKHARI, 2012).

Entretanto, a compreensão de aspectos moleculares presentes na imobilização de enzimas que pode proporcionar uma queda da atividade de catálise e elevar o tempo de reação, evidencia um aumento de custo ao processo (MOREAU *et al.*, 2008). A velocidade da catálise enzimática em comparação a catálise química é considerada baixa, efetuando processos reacionais entre 24 a 72 horas para conversões acima de 90% do triglicerídeo ao éster requerido (RAMPIN, 2007).

Noureddini e Philkana (2005) relataram o estudo da reação de transesterificação, fazendo uso do óleo de soja com nove tipos de lipase a 35°C. Os maiores rendimentos em metil ésteres (67%) e em etil ésteres (65%), após 1h de reação, foram utilizados lipase PS de *Pseudomonas cepacia* imobilizada por aprisionamento em suporte hidrofóbico sol-gel quimicamente inerte. Os resultados também demonstraram boa estabilidade e pouca perda de atividade com o reuso.

A lipase imobilizada comercial tipo B de *Candida antarctica* em reação de transesterificação com óleo residual e etanol a 32°C e 130 rpm, por 24h, apresentaram rendimentos de 87% (Ressonância Magnética Nuclear - RMN) e 82,9% (Cromatografia Gasosa - CG) (ROSSET *et al.*, 2011).

Zhao *et al.* (2017) relataram rendimentos de 92%, após 24h e 40°C na reação de transesterificação fazendo uso de óleo residual. A Lipase (*Candida sp.* 99 e 125) foi imobilizada em duas etapas, adsorção em diatomita e aprisionamento em alginato e gelatina, mantendo 70% de rendimento após 11 ciclos de reuso.

Nielsen (2016) fez uso de formulações líquidas de lipase para produção de biodiesel por meio do processo de transesterificação, diante do cenário da recente implementação das mesmas no setor industrial. Para o processo neste setor, foi proposto o uso de óleo de soja refinado, 0,2% m/m da enzima *Eversa® Transform* (Novozymes, Dinamarca), 3% m/m de água e 1,5 equivalentes molares de metanol. A temperatura foi de 35 °C, tempo de reação 32 a 36 h para atingir o equilíbrio da reação e alcançar rendimento >95%.

Remonato *et al.* (2018) trabalharam no processo de produção de ésteres de ácidos graxos com as formulações líquidas de lipase *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* (ambas livres e imobilizadas). A partir de óleo ácido residual, para produção de *fatty acid methyl ester* (FAME), obteve rendimento de 89,01% e 95% para *fatty acid ethyl ester* (FAEE), na razão molar etanol de 3,5:1, *Eversa® Transform* 1% (m/m, em relação ao substrato), tempo de 8 h (35°C/250 rpm), com reuso da lipase por até 4 ciclos. Para o estudo da forma imobilizada, o melhor resultado se deu para produção FAME, com a *Eversa® Transform 2.0*, fazendo uso de óleo de girassol, com rendimento de 99,5 %.

2.6. Enzimas: Lipase

De forma generalizada, as enzimas são proteínas que desempenham o papel de catalisadores e exercem função sobre sistemas biológicos com elevada especificidade. São compostas quimicamente de macromoléculas de elevada massa molar constituídas em menor escala por aminoácidos que se associam através de ligações peptídicas (BETSY e KEOGH, 2005).

As enzimas são biocatalisadores que atuam em catálises importantes e possuem elevada especificidade. Grande parte das enzimas são proteínas que atuam nos organismos vivos e apresentam estruturas complexas. A especificidade seletiva de quimio, régio e estéreo e as condições brandas de atuação em reações e eco-simpatia proporcionam vantagens especiais às enzimas (JESIONOWSKI *et al.*, 2014).

As lipases podem ser produzidas por microrganismos, plantas e animais. As de origem microbiana (bactérias, fungos e leveduras) são mais comuns devido a rendimentos elevados, à fácil manipulação genética e ao acelerado crescimento em meios de baixo custo (HASAN *et al.*, 2006). Em escala industrial, prevalece a produção por fermentação submersa, em que o cultivo consta em alimentar com nutrientes solubilizados, os meios líquidos (SANT'ANNA, 2001).

As lipases são denominadas triacilglicerolacil-hidrolases (EC 3.1.1.3), ou seja, pertencem à subclasse 1 das enzimas hidrolíticas de classe 3, sendo designadas como uma subclasse 1 devido à sua especificidade pelas ligações dos ésteres de ácidos carboxílicos. Constituem parte da família das hidrolases que catalisam ligações éster de ácidos carboxílicos. Sua função natural é hidrolisar triacilgliceróis em diacilglicerídeos, em monoglicerídeos, em ácidos graxos e em glicerol (STERGIOU *et al.*, 2013; TANASKOVIĆ *et al.*, 2017). Atuam, também, em reações de transesterificação, esterificação (MENDES *et al.*, 2012), interesterificação, aminólise e lactonização (Figura 3) (EBENEZER, 2008).

Consideradas importantes biocatalisadores, as enzimas são empregadas em diversas áreas industriais, como a alimentícia, de detergentes, farmacêutica, de couro, têxtil, cosmética e papelaria (MAGNER, 2013; BADGUJAR *et al.*, 2013).

A forma estrutural estabilizada e a conformação das enzimas são estabelecidas por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de *Van der Waals*. A atividade de catálise, a estabilidade e a especificidade por um substrato por parte da enzima provêm da sua estrutura tridimensional. Condições do meio, como pH; temperatura; força iônica; concentração de substrato; concentração da enzima e competição com ativadores e inibidores, influenciam a estrutura da enzima e, por conseguinte, suas propriedades de catalisar as reações (LIMA *et al.*, 2001; NELSON, 2000).

A atividade de catálise está diretamente ligada à conformação estrutural da proteína inicial, ou seja, qualquer mudança, como desnaturação ou dissociação, a atividade é afetada. Algumas desvantagens são apresentadas pelas enzimas livres como instabilidade operacional e, tempo de incubação, motivado pelo custo. Além disso, a separação do meio reacional com o uso de enzimas livres é difícil, tornando a reciclagem um grande problema. Portanto, a imobilização em suportes torna-se uma alternativa para contornar essas dificuldades (JESIONOWSKI, *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Hidrólise**Esterificação****Interesterificação****Transesterificação****Alcóólise****Acidólise****Aminólise****Lactonização****Figura 3.** Esquema das principais reações catalisadas por lipases.**Fonte:** BARON (2008).

As enzimas exercem atividade sob condições brandas de temperatura, pH e pressão (HASAN *et al.*, 2006). A temperatura de atuação varia de 30 a 40°C e os valores de pH estão entre 5 a 9 (DUARTE *et al.*, 2006), onde a atuação das lipases se destaca entre valores de pH 6

e 8 (SHU *et al.*, 2006).

A lipase seleciona o substrato por meio de uma região de tampa hidrofóbica, estrutura essa caracterizada como anfifílica e envolvida por uma alça, onde se encontra o sítio ativo de grande parte das lipases. Esta conformidade estrutural possui uma provável funcionalidade de interagir lipídeo e água, que descreve o fenômeno de ativação interfacial (Figura 4), que exhibe o sítio ativo propiciando o contato com o substrato, onde a conformidade enzimática sofre alterações (GHANEM, 2007). O compartilhamento do sítio ativo em estrutura conformacional aberta é dada por meio da tampa hidrofóbica formada pela face interna da tampa, quando é possibilitada a interação da interface hidrofóbica com moléculas lipídicas (GUISAN 2006).

A enzima entra em atividade, após a ativação interfacial, ao mesmo tempo em que ocorre a geração de emulsão e, na presença de solução, a alça anfifílica concede abertura na interface água-lipídeo (HOUDE *et al.*, 2004). A atuação das lipases frente a possíveis interfaces é característico perante água-óleo, ou água-solvente orgânico, e o aumento da atividade é influenciado por substratos insolúveis (SHARMA *et al.*, 2001).

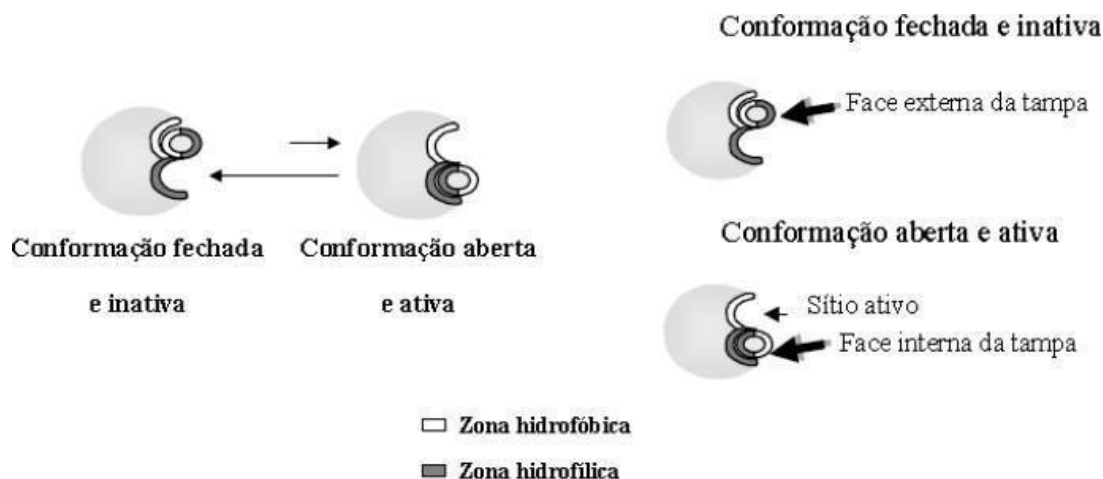


Figura 4. Ativação interfacial de lipases.

Fonte: Adaptado de PALOMO *et al.*, 2004.

A classificação da enzima como lipase não segue preceito de possuir essa tampa hidrofóbica e o fenômeno de ativação artificial. O princípio do tamanho da cadeia do substrato em exatidão para ser ponderada como grande e assim tratada como lipase, também é vago. As considerações por parte de alguns autores são advindas do tamanho da cadeia dos

triacilgliceróis catalisados, maior que 10 carbonos (trioleína como padrão), são lipases e menor (tributirina como padrão), são esterases (FERRATO *et al.*, 1997). Notavelmente, grande parte das lipases está apta a hidrolisar os substratos das esterases, onde o contrário não é válido (ERICSSON, 2008).

O estudo da cinética das reações enzimáticas através das equações de Michaelis-Menten, que são caracterizadas por reações catalíticas em meios homogêneos, pode ser prejudicado devido às reações lipolíticas ocorrerem em interface água-lipídeo (SHARMA *et al.*, 2001). Um sistema particular é requerido ao estudo da cinética das lipases, devido a um equilíbrio dos estados monoméricos, micelares e emulsificados, estabelecido pelos substratos lipolíticos. O estudo cinético desses substratos abrange o processo de ativação interfacial (PALOMO *et al.*, 2002).

A partir do início da década de 90, o biodiesel começou a se destacar como combustível alternativo pelos estudos científicos. Em dezembro de 2014, a Novozymes S/A (Dinamarca) lançou a lipase *Eversa® Transform* para produção de biodiesel enzimático em escala industrial. Consequentemente, uma nova formulação, com maior estabilidade, foi apresentada após maio de 2016, a *Eversa® Transform 2.0* (NOVOZYMES, 2017). As formulações citadas são líquidas e demonstram alta atividade na transesterificação de glicerídeos e na esterificação de ácidos graxos livre (NOVOZYMES, 2015). A *Eversa Transform 2.0* é uma lipase que catalisa a hidrólise de éster carboxílico (EC 3.1.1.3.), obtida da fermentação submersa do microrganismo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado (NOVOZYMES, 2017).

2.7. Imobilização de enzimas

O uso de enzimas imobilizadas é uma alternativa para a aplicação industrial de forma sustentável, demonstrando vantagens sobre os catalisadores já estabelecidos em relação às questões econômicas e ambientais (ZAIN *et al.*, 2010).

Com o intuito de se concretizar um processo de imobilização que proporcione estabilidade à enzima, a sua origem deve ser conhecida, assim como as propriedades do suporte e do método escolhido. Portanto, a estratégia de imobilizar a enzima deve atender à perspectiva de eficácia da mesma, à viabilidade financeira e às propriedades para o biocatalisador imobilizado (WISEMAN, 1995).

A definição para enzimas imobilizadas segue o preceito de confinamento dessas

macromoléculas em uma determinada área, individualizadas por um obstáculo que garanta a interação da enzima com o substrato em reação e que não permita a sua solubilidade no meio de reação (JEGANNATHAN *et al.*, 2008).

A retenção das enzimas é realizada em uma fase denominada matriz, ou suporte, composta por polímeros inertes ou materiais inorgânicos insolúveis. O uso desta técnica tem sido extensivamente adotado na indústria farmacêutica, de detergentes, de couros, de panificação, entre outras, com intuito de aperfeiçoar o biocatalisador em relação a sua forma livre (SANTOS, 2010).

O uso da lipase livre na forma de catalisador homogêneo para a síntese de biodiesel apresenta desvantagens como o custo e a dificuldade de recuperação e reuso proporcionando custos a mais para o processo. Logo, o processo de imobilização ou encapsulação da enzima livre em diferentes suportes torna-se atrativo (HAMA *et al.*, 2018).

Na imobilização da enzima livre, é possível notar aumento da atividade e da estabilidade (MOHAMMADI *et al.*, 2016), maior controle do produto de interesse, em consequência, maior eficiência na reação (CIPOLATTI *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015), possibilidade de reuso (GAO *et al.*, 2017) e aplicação em diversos tipos de reatores (IDRIS e BUKRARI, 2012). Entretanto, o processo de imobilização está sujeito a inibir ou a aumentar a atividade e a estabilidade da enzima, visto que não existe um procedimento que estipule o controle dos parâmetros após a imobilização (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004), além de limitações difusionais, custos adicionados ao processo, pois alguns métodos são demorados e trabalhosos (VILLENEUVE *et al.*, 2000), e o glicerol liberado na transesterificação pode se concentrar nos suportes ocasionando o entupimento dos poros (YANG *et al.*, 2016).

Por outro lado, durante o processo de imobilização, pode ocorrer a perda de atividade por parte da enzima, os suportes podem acrescentar um custo a mais, propiciar baixa estabilidade devido aos sistemas óleo-água e a necessidade de melhoria nos reatores para otimização da homogeneização do meio para elevar os rendimentos do biodiesel (ZHAO *et al.*, 2015). O reuso pode também acarretar a perda de atividade devido à dessorção, à inibição ao substrato e, muitas vezes, ao produto (BAJAJ *et al.*, 2010), além da possibilidade de quebra do suporte, da glicerina se aglomerar no mesmo e da possível desativação da enzima pelo álcool (XU *et al.*, 2011). Assim, a introdução de enzimas imobilizadas na indústria para produzir biodiesel ainda é um desafio.

A Eversa Transform é uma modificação da *Thermomyces lanuginosus*, caracterizada como uma enzima com elevada estabilidade e o processo de imobilização induz a redução de sua atividade. A flexibilidade do seu sítio ativo proporciona alta sensibilidade a muitos parâmetros, como mudanças nas condições experimentais e protocolos de imobilização, podendo alterar suas propriedades (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

2.8. Aprisionamento em alginato

Na técnica de encapsulamento, a mesma usada no presente trabalho, as enzimas são aprisionadas em uma matriz polimérica insolúvel no meio reacional na forma de géis, microcápsulas, fibras, filmes ou membranas. O processo utilizado é físico, portanto, não acarreta modificações na estrutura da enzima ou ligações com grupos reativos ou sítio ativo da mesma (BRÍGIDA, 2010; ZUCCA, 2014). Esta técnica é caracterizada pela formação de poros em sua estrutura, ou pela retenção do imobilizado por uma membrana porosa (BON, 2008), e o processo pode ser realizado em temperatura ambiente e livre de solventes orgânicos (GOMBOTZ e WEE, 2012).

A vantagem desse método é a disposição de uma grande área superficial específica do substrato e do imobilizado. Como desvantagens, a possibilidade de inativação da enzima durante a imobilização, o desprendimento da enzima do suporte e a limitação de difusão para com o substrato podem ser citados (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; BON, 2008).

Os hidrogéis podem ser aplicados para realizar a imobilização de enzimas e proteínas. A sua função é formar estruturas que possibilitam a passagem de substratos, produtos e cofatores que irão interagir com os materiais imobilizados como enzimas e proteínas. Logo, a imobilização enzimática e proteica é foco de diversas pesquisas acadêmicas para fins indústrias (TAQUIEDDIN e AMJI, 2004; RAZACK e DURAIARASAN, 2016; FERREIRA *et al.*, 2017).

O termo alginato é utilizado com mais frequência na indústria alimentícia, farmacêutica e biotecnológica e faz referência a um grupo de polissacarídeos (biopolímero) procedente do ácido algínico que é extraído naturalmente na parede celular de algas marinhas marrons da classe *Phaeophyceae*. Ainda, pode ser produzido por bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Azotobacter* (MCHUGH, 1987; SILVA e GARCIA-CRUZ, 2010). As principais algas utilizadas para a produção comercial de alginatos são espécies de *Macrocystis*, *Laminaria* e

Ascophyllum (MCHUGH, 1987). Na Figura 5, são mostradas as estruturas dos blocos que constituem a molécula do alginato.

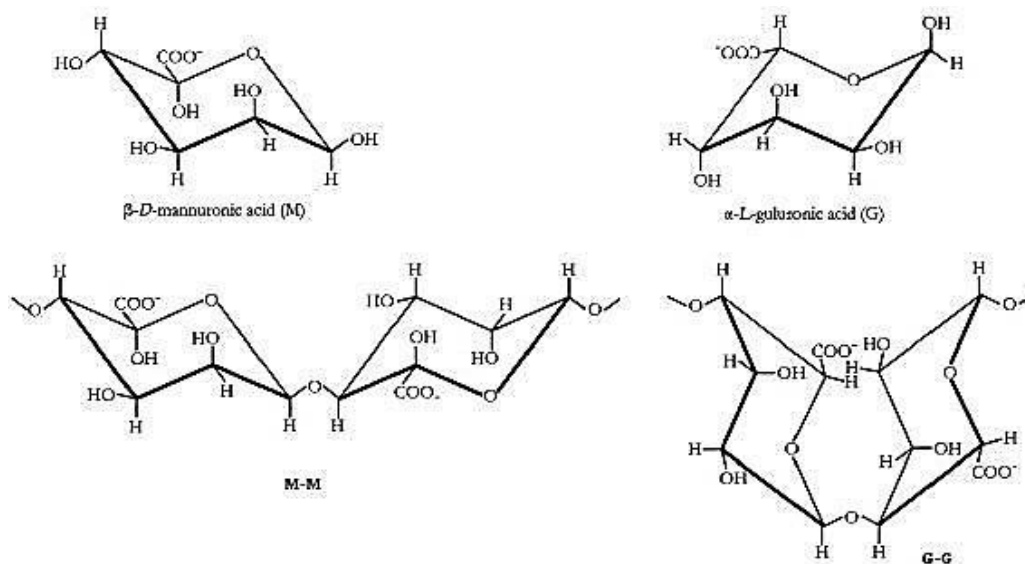


Figura 5. Estruturas dos blocos que constituem a molécula de alginato. M: ácido manurônico e G: ácido glicurônico.

Fonte: MARQUES (2011).

A obtenção do alginato de diferentes espécies influencia no tamanho e disposição da formação dos blocos formados por parte dos ácidos manurônicos (M) e glucurônicos (G), estando diretamente relacionadas às propriedades físico-químicas, à viscosidade, à plasticidade, à elasticidade e ao escoamento do polímero (MCHUGH, 1987; GARCIA-CRUZ *et al.*, 2008). A predominância de resíduos glucurônicos e a reação com cátions divalentes (Ca^{2+}) produzem géis rígidos, denominados “modelo caixa de ovos” (KING, 1983; SANTOS, 2012). Na Figura 6 é mostrado este tipo de modelo.

A estruturação dos géis de alginato, comandadas pelas suas propriedades gelificantes, como concentração, estrutura química e cinética de formação, está relacionada à concentração do cátion, à força iônica e ao pH do meio. Para a formação de sais solúveis de alginato, pode-se recorrer ao uso de inúmeros contra-íons monovalentes (exceto Ag^+), em contrapartida, os divalentes e multivalentes (exceto Mg^{2+} , por serem pequenos ou a carga não suprir a estabilização do sistema) formam géis ou precipitados (GOMBOTZ e WEE, 2012).

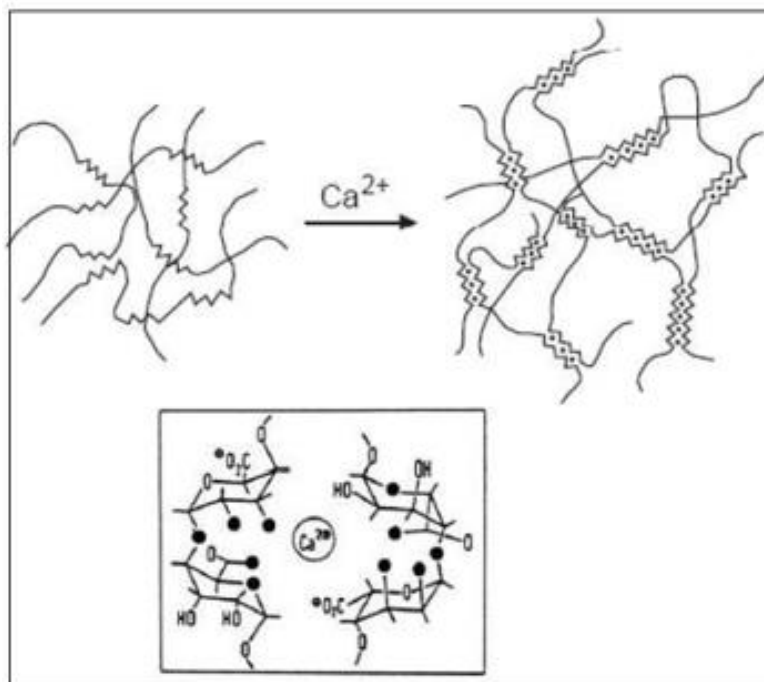
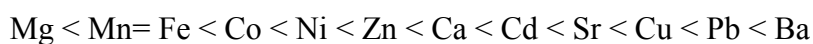


Figura 6. Rearranjo das cadeias de alginato com cálcio, modelo "caixa de ovos".

Fonte: Adaptada de ZAMBON, 2002; SILVA, 2015.

A afinidade dos alginatos para íons metálicos está relacionada com as propriedades dos íons, como o raio iônico, o efeito estérico, a força iônica e a eletronegatividade (TEIXEIRA, 2011), seguindo-se a seguinte série, denominada de Thiele (DAVIS *et al.*, 2003):



A formação das cadeias de alginato pode ser preparada por extrusão e pelo método de difusão, também denominado de gelificação rápida, sendo conhecido como o mais simples. O gel é formado por atomização ou gotejamento da solução de alginato de sódio, ou mistura contendo alginato, em uma solução de sal de cálcio, onde ocorre a formação de esferas (beads) únicas e independentes (SMIDSROD e DRAGET, 1997; SANTOS, 2012). Na Figura 7 está ilustrado o método descrito.

Para este método, a solução de cloreto de cálcio é a mais utilizada. O uso deste método está presente na indústria alimentar (bagas artificiais ou outros alimentos reestruturados), e na área de biotecnologia (esferas de gel com intenção de imobilizar células ou enzimas) (SANTOS, 2012).

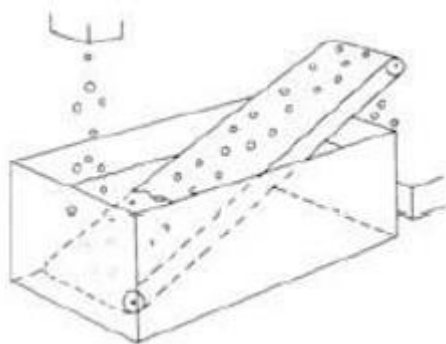


Figura 7. Configurações para o método gelificação por difusão.

Fonte: Adaptada de SANTOS (2012).

Fundueanu *et al.* (1999) avaliaram a esfericidade das partículas e concluíram que a altura do bico de gotejamento interfere na mesma. Welter (2009) avaliou diferentes concentrações de alginato de sódio e alturas de gotejamento, chegando à conclusão que a concentração de 2% e altura de 30 cm foram ideais.

Santos (2012) estudou e avaliou os parâmetros que influenciam a produção de esferas de alginato, por meio do método de difusão. Características como massa, firmeza, adesividade, perfil de textura e esfericidade foram consideradas na avaliação. A conclusão foi que a concentração de alginato e a concentração de cloreto de cálcio têm efeito significativo nas características das esferas. Adicionalmente, a temperatura do preparado tem efeito principalmente na duração da operação de gelificação e nas características das esferas de alginato.

Considerando uma aplicação prática, a publicação do trabalho de Wingender *et al.* (1987) confirmou as conclusões de outros autores mais antigos que as lipases e alginato podem desenvolver interações entre si.

Marques (2011) imobilizou uma lipase utilizando alginato de sódio em solução com precipitação em cloreto de cálcio, concluiu que a concentração de 2% (alginato de sódio), pH 3,68 e concentração de 200 mM (CaCl_2), relação de 40/60% Alginato/solução enzimática, produz esferas de 2 mm diâmetro. A taxa de imobilização foi de 168,07%.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar a imobilização da Lipase *Eversa® Transform 2.0* em esferas de alginato de cálcio e avaliar sua aplicação na reação de transesterificação da triacetina, visando à produção de biodiesel.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a lipase *Eversa® Transform 2.0* na sua forma livre quanto a sua massa molar, ponto isoelétrico e tamanho;
- Imobilizar a enzima *Eversa® Transform 2.0* em esferas de alginato de cálcio;
- Avaliar a influência do tempo de reação, teor de enzima e teor de água na reação de transesterificação para produção do acetato de etila fazendo uso da *Eversa® Transform 2.0* na forma livre e imobilizada.
- Avaliar o reuso das enzimas imobilizadas na reação de transesterificação da triacetina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

A enzima utilizada neste trabalho foi a *Eversa® Transform 2.0* da empresa Novozymes (Paraná-RS), Batch: LRN02013, validade 07/12/18. A triacetina foi doada pela empresa Buschle & Lepper S.A.

4.2. Caracterização da enzima livre

4.2.1. Estimativa da massa molar por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O método eletroforese SDS-PAGE foi utilizado para estimativa da massa molar da enzima. A eletroforese em gel de poliacrilamida (gel separador - 12% e gel empilhador - 3,9%), contendo SDS (10 %) e β - mercaptoetanol foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). As corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura ambiente, a 80V, em placas do sistema Mini-Gel Biorad. Foram aplicadas 4 amostras com diferentes concentrações da solução comercial da enzima (Tabela 2), após serem fervidas por 4 min com tampão desnaturante de amostra (0,19 M Tris/HCl 0,19 M pH 6,8, SDS 2,3 % (p/v), glicerol 1 % (v/v), β -mercaptoetanol e azul de bromofenol).

Tabela 2. Características das amostras aplicadas no gel.

Concentração da enzima ($\mu\text{g/L}$)	Enzima (μL)	Tampão (μL)
10	2,85	1
20	5,7	1,9
40	11,94	3,98
50	14,9	4,97

Ao finalizar a corrida eletroforética, o gel foi fixado em uma solução metanol, ácido acético glacial, e corado na mesma solução adicionada de Comassie Blue (G-250) por um período de 16 h. O gel foi descorado após 3 lavagens de 20 min com solução de metanol e ácido acético. Posteriormente, o gel foi lavado e armazenado em água destilada. A massa molecular da enzima foi estimada por meio da comparação das bandas proteicas da amostra com as bandas do marcador molecular (Bio Rad).

4.2.2. Determinação do ponto isoelétrico

A partir de duas soluções de 50 mL da solução *Eversa® Transform 2.0* diluída 1000 X em água destilada, partindo do pH 5,4 (pH da formulação comercializada), foi realizada a análise do ponto isoelétrico da enzima, com o pHmetro (PHS-3E Labmeter). Na primeira solução, foi adicionada a solução titulante NaOH (0,01M) e na segunda a solução titulante, HCl (0,01 M), até valores de pH de interesse 10 e 3,5, respectivamente. Ambas as soluções titulantes foram adicionadas em alíquotas de 50 µL até a estabilização do pH que então era registrado.

4.2.3. Mensuração do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico da enzima na suspensão

Para determinação do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta da suspensão enzimática, foram preparadas 7 soluções de 50 mL da solução *Eversa® Transform 2.0* diluída 1000 X em água destilada. Os valores de pH foram ajustados com as soluções NaOH (0,01 M) e HCl (0,01 M) para 2, 4, 5, 7, 8, 9 e 10, partindo do pH inicial de 5,4 (pH da formulação comercializada), com auxílio do pHmetro PHS-3E Labmeter.

Posteriormente, as 7 soluções foram levadas para um banho de ultrassom por 20 min no equipamento Ultraclear 1400A, para promover a individualização das enzimas e assim prosseguir para as análises de dimensões e de potencial zeta. Estas foram realizadas em triplicata, no equipamento Zetasizer Nano ZS (Zen 3500, Malvern, Reino Unido). De cada solução, foram retiradas alíquotas de 2 mL, as quais foram inseridas em uma cubeta contendo dois eletrodos.

4.3. Imobilização enzimática

Inicialmente, uma solução de alginato de sódio a 2% v/v em tampão acetato de sódio pH 3,68 foi preparada. Esta solução foi então misturada à solução enzimática *Eversa® Transform 2.0* não diluída nas proporções 40/60 e 60/40 (v/v). As misturas foram, então, gotejadas a uma altura de 2,5 cm, por meio de um tubo de silicone e bomba peristáltica Masterflex (1,1 mL·min⁻¹) em solução de cloreto de cálcio 200 mM (MARQUES, 2011). As esferas de alginato foram mantidas por cerca de 1 h na solução de cloreto de cálcio para completa gelificação e posteriormente foram recuperadas com o uso de uma peneira e lavadas com 100 mL de solução tampão acetato de sódio 0,05 mM pH 3,68. As soluções de cloreto de cálcio e de lavagem foram analisadas para quantificar a concentração de proteínas não imobilizadas, com o objetivo de avaliar o procedimento de imobilização. As esferas foram armazenadas em solução tampão de acetato de sódio 0,05 mM, pH 3,68, a 10 °C, para uso posterior nas reações de transesterificação.

4.3.1. *Rendimento de Imobilização*

Relaciona a atividade específica da enzima imobilizada e a atividade específica da enzima livre usada no processo de imobilização, Equação 1.

$$\text{Rendimento de imobilização (\%)} = \frac{A_{e(imob)}}{A_{e(livre)}} (x100) \quad \text{Equação (1)}$$

Em que:

$A_{e(imob)}$ (U/mg) = atividade específica da enzima imobilizada

$A_{e(livre)}$ (U/mg) = atividade específica da enzima livre

4.3.2. *Eficiência de Imobilização*

Relaciona a quantidade de proteínas aprisionadas nos suporte, após o processo de imobilização, Equação 2.

$$\text{Eficiência de Imob. (\%)} = \frac{(C_{e(livre)} * V_{e(livre)}) - (C_{e(imob)} * V_{e(imob)})}{(C_{e(livre)} * V_{e(livre)})} (x100) \quad \text{Equação (2)}$$

Em que: $C_{e(livre)}$ (mg.mL^{-1}) = concentração de proteína inicial; $V_{e(livre)}$ (mL) = volume da inicial da suspensão enzimática; $C_{e(imob)}$ (mg.mL^{-1}) = concentração de proteína do filtrado, e $V_{e(imob)}$ (mL) = volume total do filtrado

4.3.3. Caracterização das esferas por Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise das esferas de alginato de cálcio na presença e na ausência da lipase *Eversa*® *Transform 2.0* imobilizada foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para isso, as esferas foram secas em estufa à vácuo (Tecnal TE-395) na temperatura de 40 °C por 2 min. Posteriormente, as esferas foram cortados com um estilete e as fatias posicionadas sobre um suporte de alumínio, e em seguida recobertas com uma fina camada de ouro no equipamento Metalizador Quorum Q150R S. A análise morfológica dos materiais foi realizada em equipamento Microscópio Eletrônico de Varredura JEOAL– JSM-6010LA a partir de elétrons secundários sob vácuo e voltagem da fonte de 15 kV. As esferas foram amostradas de forma inteiramente casualizada, sendo visualizadas duas esferas sem a enzima e quatro esferas com a enzima imobilizada, sendo que destas duas antes do uso na reação de transesterificação e duas após o terceiro ciclo de reuso.

4.4. Utilização da enzima livre e imobilizada nas reações de transesterificação da triacetina

4.4.1. Delineamento experimental

Para otimizar as reações utilizando a enzima livre e imobilizada e avaliar o efeito da imobilização, utilizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional com 5 repetições no ponto central, totalizando 19 ensaios (Tabelas 3). Para o estudo, foram selecionadas as variáveis tempo (h) de reação, teor de enzima (% v/v) e teor de água (% v/v). A quantidade de enzima imobilizada adicionada em cada tratamento foi ajustada de acordo com a carga de proteínas utilizada para a enzima livre (Tabela 4). A variável resposta investigada foi a porcentagem de rendimento em acetato de etila. O ajuste modelo matemático gerado aos dados foi testado pelo teste T por meio da análise de variância (ANOVA) fazendo uso do programa STATITICA® (*Data Analysis Software System*).

Tabela 3. Valores codificados e decodificados utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional para as reações de transesterificação utilizando a enzima *Eversa® Transform 2.0* livre e imobilizada.

Ensaio	Codificado			Decodificado		
	t (h)	E (% v/v)	A (% v/v)	t (h)	E (% v/v)	A (% v/v)
1	-1	-1	-1	8	1,00	2
2	1	-1	-1	20	1,00	2
3	-1	1	-1	8	2,50	2
4	1	1	-1	20	2,50	2
5	-1	-1	1	8	1,00	5
6	1	-1	1	20	1,00	5
7	-1	1	1	8	2,50	5
8	1	1	1	20	2,50	5
9	-1,682	0	0	3,90	1,75	3,5
10	1,682	0	0	24,10	1,75	3,5
11	0	-1,682	0	14	0,49	3,5
12	0	1,682	0	14	3,01	3,5
13	0	0	-1,682	14	1,75	1,00
14	0	0	1,682	14	1,75	6,02
15	0	0	0	14	1,75	3,5
16	0	0	0	14	1,75	3,5
17	0	0	0	14	1,75	3,5
18	0	0	0	14	1,75	3,5
19	0	0	0	14	1,75	3,5

t = tempo de reação; E = Concentração da solução enzimática comercial; A = Porcentagem de água adicionada nas reações.

Tabela 4. Proporção de enzimas livres e esferas de enzimas imobilizadas utilizadas para as reações de transesterificação da triacetina.

Enzima livre (µL)	Enzima imobilizada (n° esferas)
50	12
50	12
125	30
125	30
50	12
50	12
125	30
125	30
88	21
88	21
25	6
151	36
88	21
88	21
88	21
88	21
88	21
88	21
88	21
88	21
88	21

As reações de síntese do acetato de etila foram realizadas em erlenmeyers de 125 mL com 5 mL de substrato (Triacetina) e etanol como álcool de cadeia curta, na relação 1:3,5, respectivamente. Os erlenmeyers foram incubados em agitador Thelga THS 16B sob temperatura de 35 °C e 230 rpm (REMONATTO *et al.*, 2018). Para comparação dos planejamentos experimentais, utilizou-se a lipase *Eversa® Transform 2.0* na forma livre e imobilizada de forma equivalente quanto a sua atividade enzimática (Tabela 4). Os controles consistiram nas misturas de reação i) sem o catalisador e ii) contendo esferas de alginato de cálcio sem a enzima imobilizada. Após cada tempo de reação previsto no delineamento (Tabela

3), uma alíquota de 2 mL foi retirada do meio reacional, centrifugada, a 3500 rpm por 10 min e congelada a -4°C, para posterior análise por cromatografia gasosa.

4.5. Reuso da enzima imobilizada

O reuso da lipase *Eversa® Transform 2.0* imobilizada nas esferas de alginato de cálcio foi avaliado em mais 3 ciclos de reação a partir do melhor resultado do planejamento experimental na condição de maior rendimento em acetato de etila para a enzima imobilizada. Para iniciar cada ciclo de reuso, os derivados imobilizados foram separados do meio reacional com auxílio de uma peneira e adicionados em uma mistura reacional semelhante àquela descrita no item 4.4.1.

4.6. Métodos analíticos

4.6.1. Determinação da atividade enzimática

Para determinar a atividade da enzima livre e dos derivados imobilizados, foi utilizado o método espectrofotométrico baseado 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. O método foi descrito por Winkler e Stukmann (1979) e modificado por Krieger (1995). A liberação do *p*-nitrofenol, de coloração amarela é então mensurada a 410 nm (Figura 8).

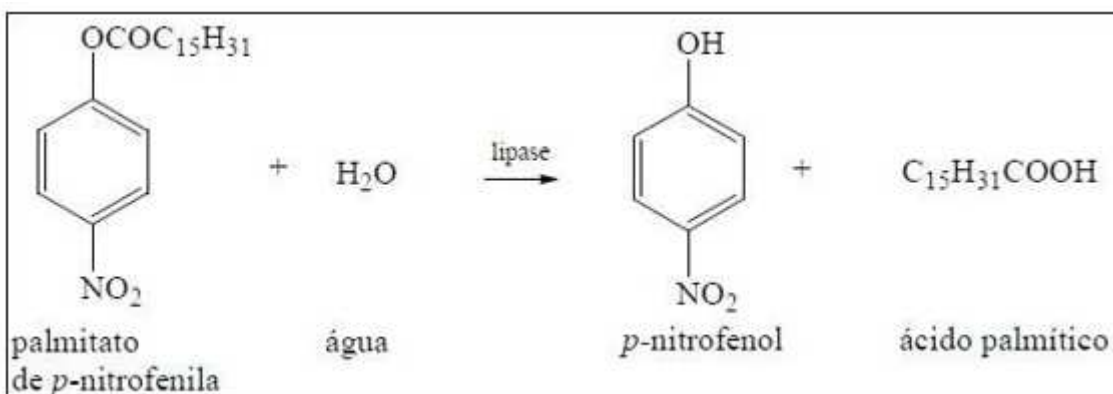


Figura 8. Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila por lipases.

Para a enzima livre, a solução de substrato (0,9 mL), já com a temperatura estabilizada a 35 °C, foi inserida na cubeta e, posteriormente, adicionou-se a solução contendo a enzima (0,1 mL) ou um tampão fosfato de sódio (0,05 M pH 7), no caso do branco.

Os derivados imobilizados (2 esferas) foram incubados juntamente com a solução de substrato (4,5 mL) sob temperatura de 35 °C e agitação de 150 rpm em erlemeyers de 25 mL, por 3 min.

Para cálculo da atividade enzimática, utilizou-se a Equação 3, sendo uma unidade de atividade enzimática (U) definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 µmol de *p*NP (*p*-nitrofenol) por minuto. O coeficiente de absortividade 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.

$$U = \left\{ \frac{Abs \cdot Vt}{\varepsilon \cdot X_e \cdot T} \right\} * 10^3 * D \quad \text{Equação (3)}$$

Em que:

U = Atividade enzimática (U.mL⁻¹)

Abs = Absorbância

Vt = Volume total de reação (mL)

ε = Coeficiente de absortividade molar do *p*-NP

X_e = volume (mL) ou massa da enzima imobilizada (mg)

T = Tempo de reação

10³ = coeficiente de correção

D = número de diluições

4.6.2. *Quantificação de proteínas*

A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o método proposto por Bradford (1976), utilizando o equipamento Bioespectro SP-22. A concentração de proteínas foi calculada a partir de uma curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina (BSA).

4.6.3. Cálculo da atividade específica

A atividade específica relaciona a atividade da enzima por massa de proteínas totais na solução, conforme Equação 4:

$$\text{Atividade específica } (A_e) = \frac{A}{P_t} (U/mg) \quad \text{Equação (4)}$$

4.6.4. Cromatografia Gasosa (CG)

Para determinar o rendimento da reação, as alíquotas retiradas dos testes de transesterificação da triacetina foram tratadas e submetidas a uma análise quantitativa em Cromatógrafo a Gás (CG) modelo Shimadzu GC-2010 Plus, equipado com auto-injetor, detector de ionização em chama (FID) e coluna capilar Carbowax (30 m, x 0,25 mm ID x 0,25 μ m). As condições do método utilizado foram: temperatura inicial 60 °C, elevação de 10 °C·min⁻¹ até 210 °C, por 15 min; injetor (250 °C); detector (250 °C); gás de arraste H₂ com vazão de 1,2 mL.min⁻¹.

A porcentagem de rendimento em acetato de etila da reação foi calculada a partir da área do pico relativo ao produto de interesse, acetato de etila, nos cromatogramas, a partir de um padrão interno do acetato de etila. A curva padrão foi preparada a partir de concentrações conhecidas do acetato de etila.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suspensão contendo a lipase *Eversa® Transform 2.0* continha, segundo o método adotado para quantificação de proteínas, $33,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteína, e a partir dela foi obtida uma atividade hidrolítica de $147 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. Esses valores correspondem a uma atividade específica de $4,38 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína. A análise de uma suspensão dessa enzima comercial por Remonatto *et al.* (2018) pelo método de Bradford mostrou a presença de $41 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteína.

5.1. Caracterização da enzima livre

5.1.1. Estimativa da massa molar por SDS-PAGE

A lipase *Eversa® Transform 2.0* é constituída por uma banda única de proteína, e a suspensão na qual está contida possui também algumas proteínas adicionais, principalmente de menor massa molar e em menor concentração (Figura 9). A massa molecular da lipase foi de aproximadamente 31,21 kDa, confirmando os resultados de Remonatto *et al.* (2018) e Fraga (2019). Segundo este último, a massa molar da lipase presente na suspensão *Eversa Transform* é de 31,578 kDa, o que foi verificado por *Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization- Time of flight* (MALDI-TOF/MS).

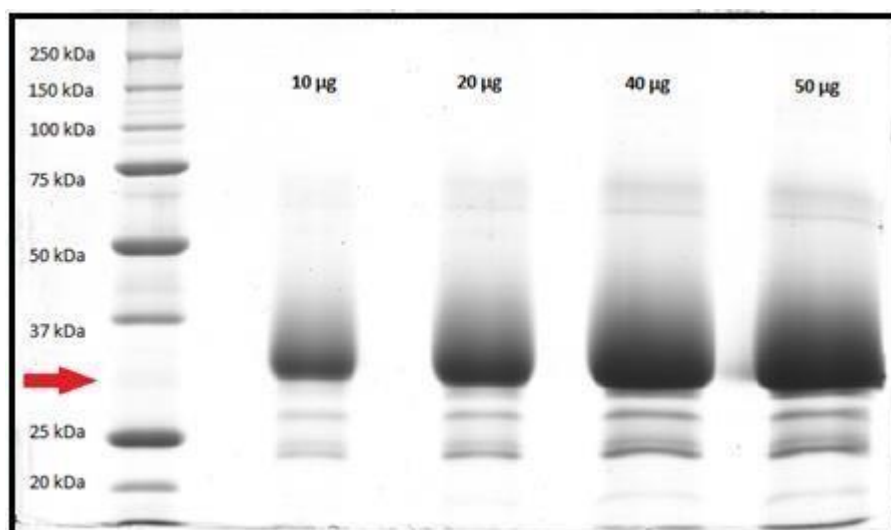


Figura 9. Padrão de proteínas obtido por SDS-PAGE (12%) da suspensão enzimática *Eversa® Transform 2.0*.

5.1.2. Determinação do ponto isoelétrico da enzima

A presença de grupos com caráter ácido-base na superfície do material foi avaliada por titulação potenciométrica. Foi realizada uma titulação usando um ácido forte (HCl) e uma base forte (NaOH), nas concentrações de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e os resultados são mostrados na Figura 10.

Na titulação com ácido forte, foi observado um salto potenciométrico, assim como para a titulação com base forte. Os valores estimados de pKa foram de aproximadamente 9,2 (pKa1) e 4,3 (pKa2).

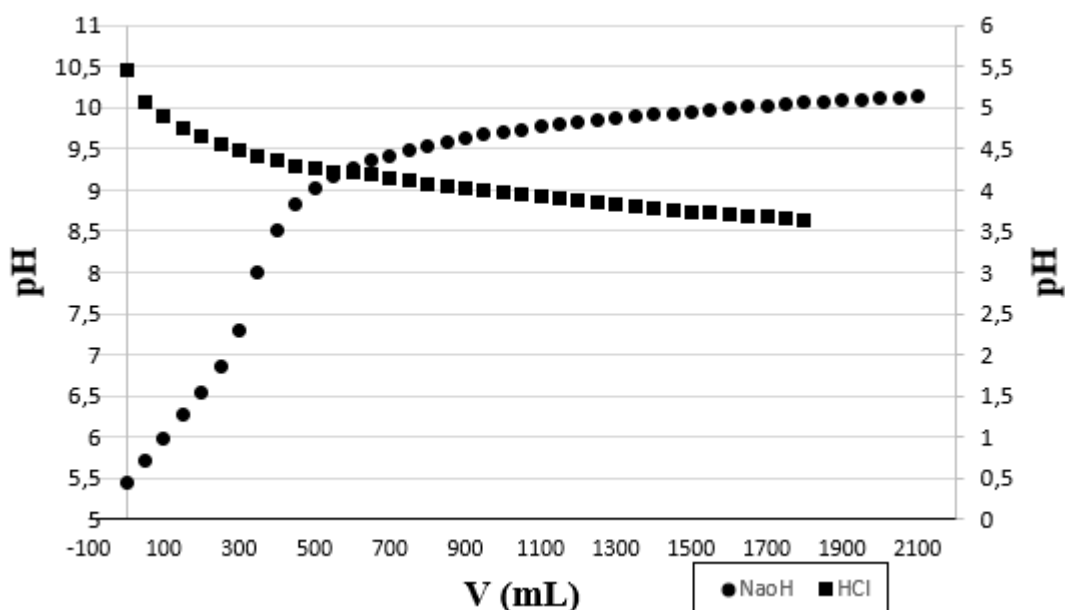


Figura 10. Titulação potenciométrica da lipase Eversa® Transform 2.0 diluída em água. Titulantes: (■) HCl $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ e (●) NaOH $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$.

O ponto isoelétrico da lipase presente na suspensão *Eversa® Transform 2.0* foi de 6,8, ou seja, próximo da faixa do pH utilizado na produção de biodiesel.

O ponto isoelétrico é uma medida essencial no estudo de enzimas e relaciona-se com a estabilidade das moléculas proteicas. No ponto isoelétrico a enzima é considerada instável, pois o somatório das suas cargas é zero, ou seja, são mínimas as forças de repulsão entre suas moléculas e as de interação com o solvente no qual está inserida. Este estado da enzima leva à formação de aglomerados e uma possível precipitação (DOS SANTOS *et al.*, 2018).

A produção de biodiesel por meio da reação de transesterificação ocorre próximo ao pH

neutro, natural dos óleos utilizados e do produto da reação, o biodiesel (MIYASHIRO *et al.*, 2013).

5.1.3. Mensuração do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico da enzima na suspensão

O potencial zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática das cargas superficiais entre partículas, ou seja, é o potencial na dupla camada elétrica, formada no campo de interação sólido-líquido de um material em solução aquosa, sendo um dos parâmetros fundamentais que, sabidamente, afetam a estabilidade de proteínas. É influenciada diretamente pelo pH e pela força iônica do meio aquoso (CHEN *et al.*, 2014). Sua medição oferece uma visão detalhada sobre as causas da dispersão, agregação ou floculação das enzimas, podendo ser aplicada para melhorar a formulação desses materiais.

O gráfico pH em função do volume de titulante obtido a partir da determinação do ponto isoelétrico (Figura 10, item 5.1.2) foi analisado e a partir dele foram selecionadas 7 faixas de pH de interesse. As soluções preparadas com a suspensão da enzima diluída em água destilada, nos valores de pH 2,0; 4,0; 5,4; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0, foram avaliadas quanto à carga superficial das partículas (Figura 11) e quanto à medida do diâmetro hidrodinâmico das partículas na suspensão (Figura 12).

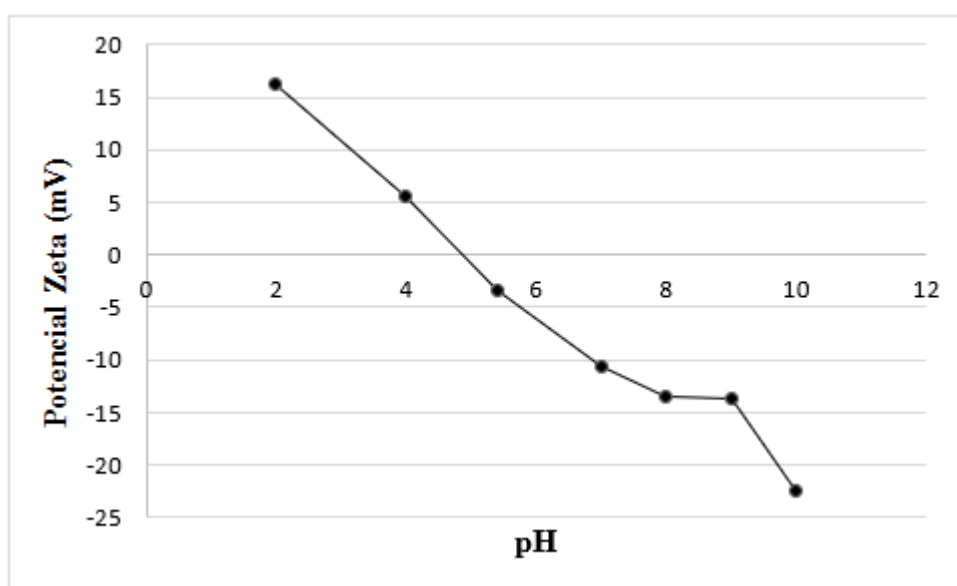


Figura 11. Potencial zeta da enzima livre (mV) em soluções com diferentes valores de pH.

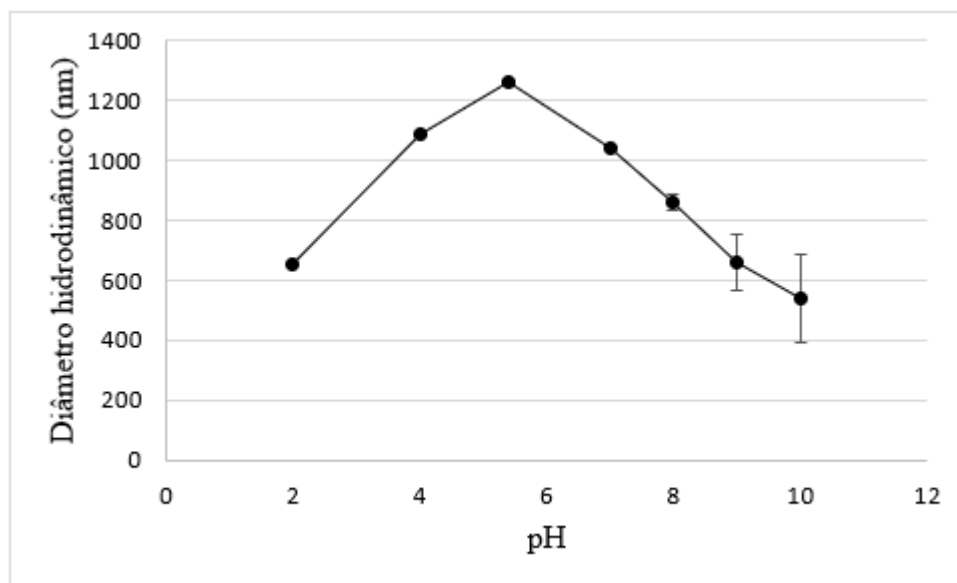


Figura 12. Valores dos diâmetros hidrodinâmicos das partículas nas suspensões contendo a enzima livre (nm) em soluções com diferentes valores de pH.

Quanto maior o valor absoluto do potencial zeta (negativo ou positivo), mais provável que a suspensão seja estável, pois, a energia de repulsão entre as partículas é maior, superando a força de agregação natural entre as mesmas (SILVA *et al.*, 2011). Quando a diferença de tensão elétrica, ou seja, o potencial zeta, entre a superfície de uma suspensão em um meio aquoso for 0 mV, é definido como ponto isoelétrico, com elevada propensão à coagulação e, ou, floculação. Portanto, quanto maior o potencial zeta mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação. Segundo a literatura, o grau de estabilidade e instabilidade entre suspensões é observada entre -30 mV e +30 mV (POLLASTRI *et al.*, 2014). Um valor negativo do potencial zeta é normalmente observado quando o pH da suspensão de um sólido finamente dividido e uniformemente distribuído em meio aquoso é superior ao ponto isoelétrico da enzima, enquanto o potencial zeta em função do pH será normalmente positivo para valores de pH abaixo desse valor (FERNANDES *et al.*, 2014).

Dentre os valores de pH estudados, aqueles que resultaram em menor agregação (menor diâmetro hidrodinâmico) das enzimas foram os da suspensão da lipase *Eversa® Transform 2.0* diluída em valores de pH extremos, o que ocorre devido ao fato de nestas suspensões a enzima possuir um potencial zeta com valor absoluto alto (Figura 10), ou seja, cargas superficiais

maiores e maior repulsão. Na solução de pH 5,4, pH da formulação enzimática comercializada, o potencial foi de -3,32 mV. Potenciais positivos foram obtidos nas soluções com pH inferior a este, enquanto potenciais negativos nas soluções com pH superior. Por meio destes resultados, calculou-se que o ponto isoelétrico da suspensão de enzima estaria em torno do pH 5,2 ($y = -4,5609X + 23,618$) (Figura 11) e o diâmetro hidrodinâmico de 1147,12 nm ($y = -35,921X^2 + 400,38X + 36,449$) (Figura 12), confirmando o estado de maior agregação neste valor de pH.

O resultado do ponto isoelétrico obtido por determinação do zeta pontecial (5,2, Figura 11) foi próximo ao valor alcançado por titulação potenciométrica (6,8, Figura 10), embora que o potencial zeta seja uma medida do potencial elétrico de cargas elétricas superficiais em relação a uma superfície de referência e a titulação potenciométrica seja baseada na medida do potencial elétrico de amostras líquidas, na ausência de corrente significativa (SKOOG *et al.*, 2006).

5.2. Imobilização enzimática

A imobilização da enzima nas esferas de alginato de cálcio a 1,2 % (m/v) causou a perda de 86 % da atividade específica da enzima livre, uma vez que a atividade específica da enzima imobilizada foi de apenas 0,61 U.mg⁻¹.

O processo de imobilização procedeu-se fazendo uso de parâmetros otimizados de acordo com o trabalho de Marques (2011). Entretanto, na proporção 40/60 de alginato e solução enzimática não ocorreu formação das esferas sólidas. Devido a isto, a razão alginato/enzima foi aumentada para 60/40, com a qual pôde-se observar a formação das esferas, com rendimento de imobilização de 14,61 % e eficiência de imobilização de 80 %.

No trabalho de Marques (2011), a lipase de *Burkholderia cepacia* foi imobilizada com rendimentos de 168,07 %. O rendimento de imobilização relaciona as atividades específicas da enzima imobilizada e da enzima livre. Ele é afetado por fatores como concentração de alginato, pH, temperatura, diâmetro da esfera, concentração de CaCl₂ e quantidade de enzima adicionada (MARQUES, 2011). As concentrações de alginato e de cloreto de cálcio interferiram na formação das esferas de alginato, especialmente em relação ao tamanho dos poros gerados (SANTOS, 2012). A temperatura do preparo afetou a operação de gelificação e a qualidade do gel formado (BON, 2008). Além disso, é possível que componentes presentes na suspensão enzimática tenham também interferido na formação das esferas e no rendimento de

imobilização. Como essa composição utilizada no presente trabalho não foi publicamente divulgada, não foi possível avaliar a interferência desses componentes.

O aumento na concentração final de alginato para proporcionar a formação das esferas (de 0,8 para 1,2 %) possibilitou a formação estrutural das esferas. O rendimento de imobilização obtido para a enzima (14,61 %) por meio do processo de imobilização testado foi baixo em comparação com a eficiência de imobilização (80 %). A eficiência de imobilização relaciona a quantidade de proteína aprisionada no suporte após o processo de imobilização (Equação 2). Isso significa que o processo de aprisionamento utilizado foi eficiente na retenção das enzimas em solução, porém, as enzimas imobilizadas não mantiveram a atividade após o processo. Isso pode ser observado por Teixeira (2011), que estudou a imobilização de lipase comercial de *P. fluorescences* (lipase AK) por aprisionamento em gel de alginato 2 %, e obteve rendimento de imobilização menor que 10 %. Por outro lado, a imobilização por interação direta da enzima com os suportes (adsorção física e ligação covalente) foi realizada com rendimentos de até 50 %.

Won *et al.* (2005) observaram que o rendimento de imobilização reduziu de 45 para 15 %, após o aumento na concentração final de alginato nas esferas (de 1 para 2 %), em contraste com o resultado da eficiência de imobilização, que aumentou de 70 para 80 %. De acordo com Calero *et al.* (2014), isso pode ser consequência de mudanças conformacionais na enzima geradas pelo processo de imobilização, como por exemplo agregação das moléculas, onde o sítio ativo pode não se expor aos substratos ou ainda, segundo Knezevic *et al.* (2012), de limitações na difusão do substrato pois a maior concentração de alginato leva à formação de esferas com poros de diâmetros menores.

É possível que o rendimento de imobilização da lipase nas esferas de alginato de cálcio tenha sido baixo devido ao pH utilizado no processo de imobilização (pH 3,68), o qual constituiria um ambiente em que a enzima está instável, pois é próximo ao pH do ponto isolétrico da enzima (6,8, por titulação – Figura 10, e 5,2, por zeta potencial – Figura 11). Neste caso, as enzimas presentes na solução podem ter agregado, portanto, os sítios ativos podem ter sido impedidos de atuarem.

Remonatto *et al.* (2018) imobilizaram a lipase *Eversa® Transform* e *Eversa® Transform 2.0* em quatro suportes hidrofóbicos (Sepabeads-C18, Lewatit 1600, Purolite-C18, Purolite Divinyl) por adsorção. Neste caso, os rendimentos alcançados foram superiores a 95 %, e a morfologia do suporte foi importante para a seletividade, mais do que para a atividade

da enzima. Segundo Chaubey *et al.* (2006), o suporte pode promover formas abertas ligeiramente diferentes da lipase adsorvida e, portanto, fornecer diferentes propriedades catalíticas em meio anidro.

Arana-Peña (2018) avaliou a imobilização da *Eversa® Transform 2.0* em esferas de agarose de octil e amina e comparou com a lipase mais utilizada na biocatálise, a isoforma B da *Candida antarctica* (CALB), imobilizada em esferas de octil-agarose. Para a primeira, este tipo de imobilização não ocasionou efeito significativo na atividade enzimática, mas levou à melhoria na estabilidade da enzima, quando comparada à imobilização em suporte aminado.

No presente trabalho, a *Eversa® Transform 2.0* foi imobilizada em esferas de alginato de cálcio, caracterizado como suporte extremamente hidrofílico. O suporte e o processo de imobilização por aprisionamento realizado em pH 3,68 podem ter fornecido à enzima uma mudança conformacional para o estado agregado e proporcionaram propriedades catalíticas inferiores a da enzima em seu estado livre, desde já observadas a partir do baixo rendimento de imobilização (14,61 %).

5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As esferas de alginato apresentaram diâmetro aproximado de 2 mm, formato esférico, superfície lisa. Os suportes que não continham a enzima possuíam coloração transparente (Figura 13 a), enquanto aqueles contendo a enzima possuíam coloração branca fosca (Figura 13 b). Essa coloração é provavelmente decorrente de componentes da suspensão utilizada que possuía coloração marrom escuro.

As esferas de alginato de cálcio formadas sem a enzima possuíam uma superfície externa lisa e sem rachaduras (Figura 14 a), e superfície interna rugosa (Figura 14 b). Fundueanu *et al.* (1999) e Teixeira (2011) encontraram linhas paralelas, como fendas, nas superfícies de esferas de alginato puras, as quais eles atribuíram à presença de rachaduras. Won e colaboradores (2005) concluíram que a morfologia da superfície de esferas desse tipo de material variava de acordo com a concentração de alginato utilizada.

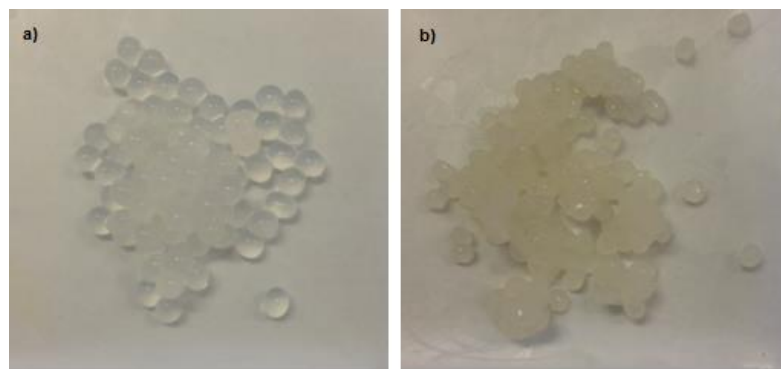


Figura 13. Esferas de alginato de cálcio. Figura a) sem enzima, Figura b) com enzima imobilizada.

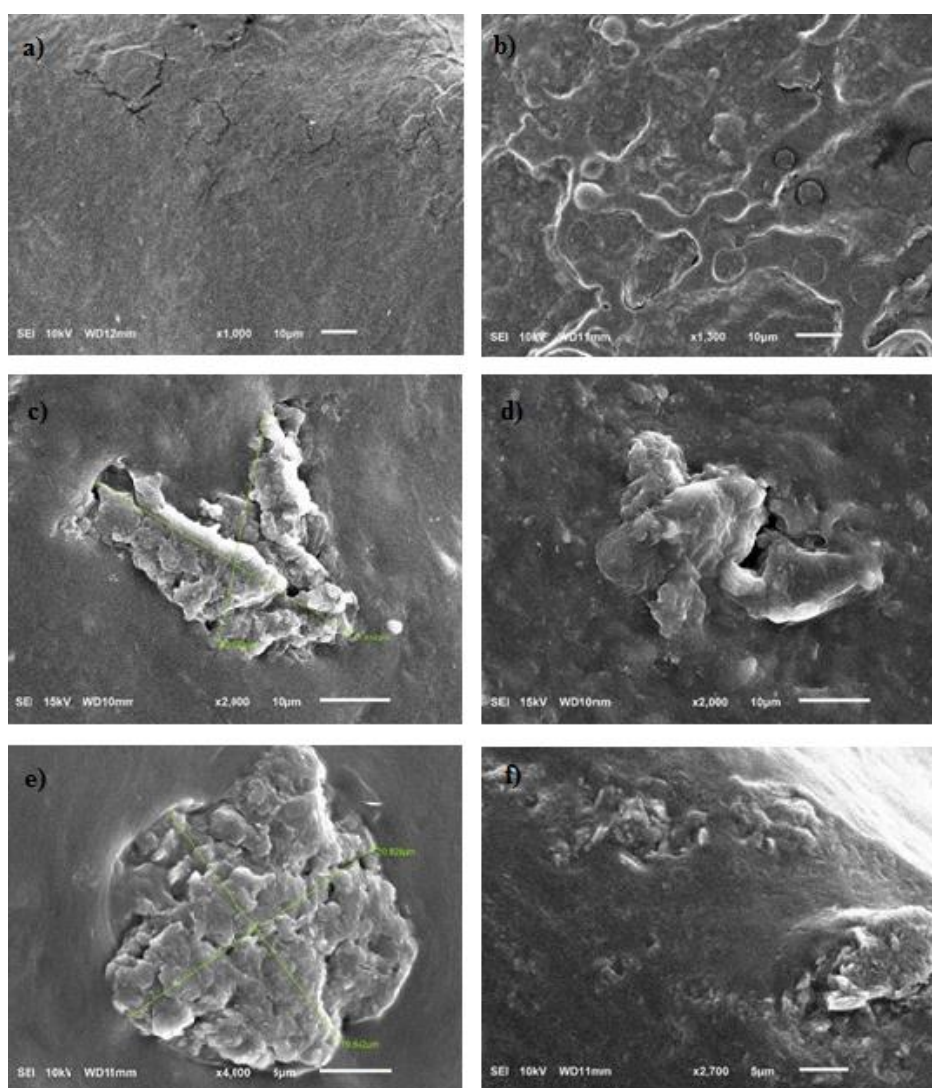


Figura 14. Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura: Figura a) superfícies externa sem enzima; Figura b) superfície interna sem enzima; Figura c) superfície externa com enzima antes do uso Figura d) superfície interna com enzima antes do uso Figura e) superfície externa com enzima após o 3º uso Figura f) superfície interna sem enzima após o 3º uso.

A enzima foi nitidamente aprisionada tanto na parte externa como na parte interna das esferas (Figura 14 c-f). As superfícies externas das esferas possuíam aglomerados de partículas com dimensões na faixa de 19.000 a 100.000 nm (não ilustrada). A ausência desses aglomerados nas superfícies das esferas formadas sem a enzima sugere que tais aglomerados podem ser formados pela própria enzima, juntamente com outras partículas possivelmente presentes na suspensão, e poderiam ter sido formados durante o processo de imobilização.

Teixeira (2011) também observou aglomerados superficiais nos suportes de enzimas imobilizadas por ligação covalente com a lipase AK.

As superfícies internas das esferas contendo as enzimas imobilizadas se apresentaram mais enrugadas, e não foram observadas diferenças visuais nas esferas antes e após as reações de transesterificação. Isso demonstra que as esferas possuem uma boa resistência à agitação e que após o uso não ocorre deformações ou quebras estruturais.

5.4. Reação de transesterificação da triacetina

Em geral, a lipase *Eversa® Transform 2.0* imobilizada obteve menores rendimentos em acetato de etila pela conversão da triacetina, que sua forma livre. A enzima livre foi capaz de converter até 39,2%, enquanto a imobilizada apenas 5,84 %, ambas utilizando teor de 2,5 % (v/v) de enzima e teor de água de 5 % (v/v) (Tabela 5). Entretanto, foi necessário tempo superior de reação para que a enzima imobilizada fosse atingisse o rendimento máximo.

O valor do coeficiente de regressão linear (R^2) para a enzima livre, que representa a porcentagem de variação na resposta que foi explicada pelo modelo do planejamento DCCR, onde o valor foi de 93,4 %, indicando um bom ajuste do modelo, fazendo uso do *MS Pure Error* de 0,6433. Para a enzima imobilizada, o valor do coeficiente de regressão linear (R^2), foi de 97,4 % indicando um bom ajuste do modelo, fazendo uso do *MS Pure Error* de 0,0968.

Os coeficientes significativos puderam ser avaliados tanto pela ANOVA quanto pelo gráfico de Pareto. O efeito que as variáveis utilizadas no planejamento estatístico, e suas interações, têm com a variável resposta está mostrado no gráfico de Pareto para a enzima livre (Figura 15) e para a enzima imobilizada (Figura 16).

Tabela 5. Porcentagens de rendimento em acetato de etila utilizando a enzima livre e imobilizada.

Amostras	Variáveis			Porcentagem de rendimento em acetato de etila	
	T (h)	E (%)	A (%)	EL	EI
1	8	1	2	6,9	1,07
2	20	1	2	15,2	2,4
3	8	2,5	2	28,0	2,14
4	20	2,5	2	31,5	3,98
5	8	1	5	18,7	1,4
6	20	1	5	21,4	3,15
7	8	2,5	5	39,2	2,57
8	20	2,5	5	29,5	5,84
9	3,9	1,75	3,5	12,1	0,96
10	24,1	1,75	3,5	27,9	4,85
11	14	0,49	3,5	8,1	1,43
12	14	3,01	3,5	35,4	5,19
13	14	1,75	1	16,1	2,56
14	14	1,75	6,02	29,2	3,96
15	14	1,75	3,5	24,8	3,37
16	14	1,75	3,5	24,5	3,39
17	14	1,75	3,5	24,5	3,45
18	14	1,75	3,5	23,0	3,21
19	14	1,75	3,5	25,2	3,45

T = tempo de reação; E = teor de enzima (v/v); A = teor de água (v/v); EL = enzima livre; EI = enzima imobilizada.

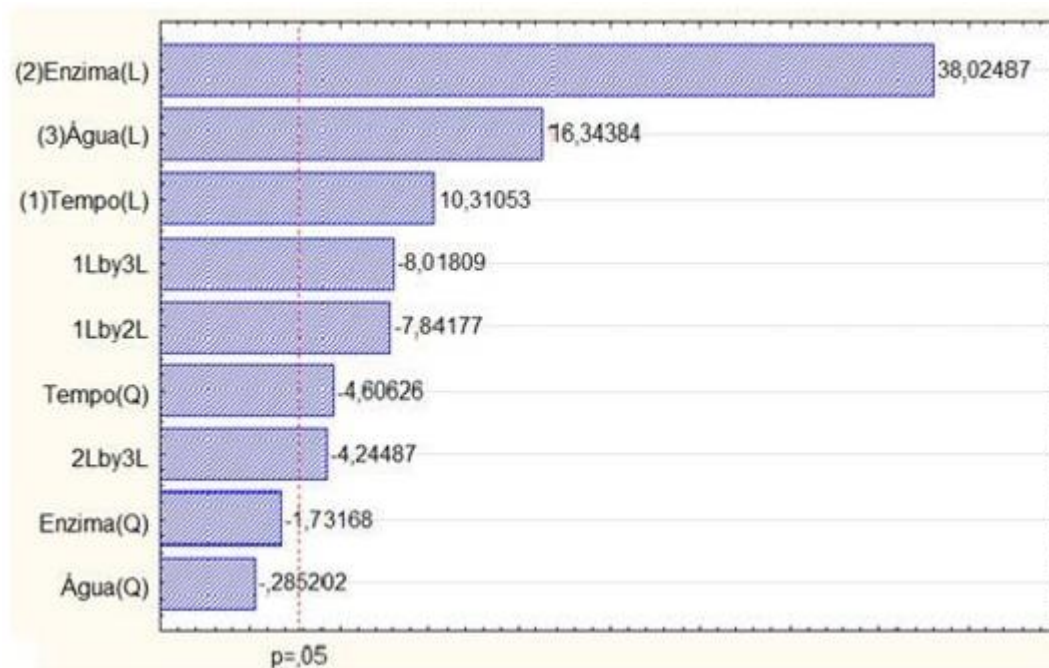


Figura 15. Gráfico de Pareto para a resposta “rendimento em acetato de etila” pela enzima livre, em que se pode visualizar os valores significativos das interações das variáveis em estudo.

Legenda: Linear (L), interação entre variáveis diferentes (LbyL) e interação quadrática (Q).

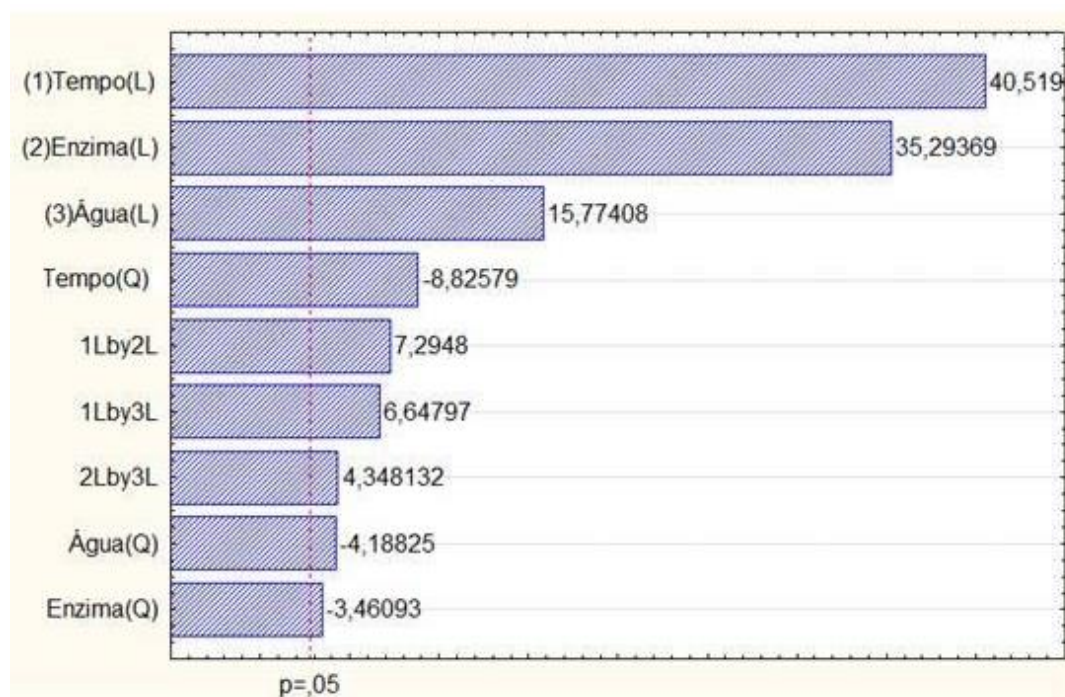


Figura 16. Gráfico de Pareto para a resposta “rendimento em acetato de etila” para a enzima imobilizada, onde pode-se visualizar os valores significativos das interações das variáveis em estudo.

Legenda: Linear (L), interação entre variáveis diferentes (LbyL) e interação quadrática (Q).

Todas as variáveis estudadas para a enzima livre e imobilizada apresentaram efeito linear significativo ($p > 0,05$) para o rendimento em acetato de etila. Para o efeito quadrático, apenas o teor de enzima e água para a enzima livre não foram significativos. Todas as interações entre as três variáveis estudadas para ambas as formas da enzima foram significativas.

A variável tempo foi a mais significativa para a enzima imobilizada, ao contrário da enzima livre, para a qual a variável tempo foi a menos significativa. As variáveis principais foram mais significativas que as suas interações e apresentaram valores positivos tanto para a enzima livre e imobilizada. Logo, considerando a faixa de valores estudada, as variáveis concentração de enzima, teor de água e tempo de reação, quando aumentadas, exercem influência positiva na variável dependente estudada, ou seja, no rendimento em acetato de etila. Isso significa que o aumento dos teores de enzima e água e do tempo de reação levam a um maior percentual de rendimento em acetato de etila, considerando a faixa de valores estudada. Da mesma forma, isso ocorreu para a interação entre duas variáveis distintas. Ao contrário, todas as interações, com valores menores de significância, para a enzima livre e as interações quadráticas para a enzima imobilizada apresentaram comportamento inverso.

Os parâmetros como o teor de enzima, água e tempo de reação aplicados no sistema onde a lipase está presente possuem um desempenho importante (BABAKI *et al.*, 2016; NIELSEN *et al.*, 2016; BABAKI *et al.*, 2016). O aumento na concentração da enzima eleva a taxa de reação (PEDERSEN *et al.*, 2014). Porém, a enzima poderia não ser totalmente aproveitada na reação, devido ao máximo da ativação interfacial ser atingido pela quantidade de água presente. Portanto, a adição de água poderia suprir essa limitação (PEDERSEN *et al.*, 2014).

O teor de enzima usada para a produção de biodiesel é um parâmetro essencial para aplicações industriais bem-sucedidas (JIANG *et al.*, 2014). O suprimennto do teor de água pode acarretar o aumento da coversão por parte da lipase (FIRDAUS *et al.*, 2016). Porém, a adição de água aos sistemas deve ser realizada de forma controlada, pois pode causar a desativação da enzima por propiciar a sua aglomeração, limitando a difusão e hidrólise do substrato. Adicionalmente, a reação de hidrólise é predominante à reação de transesterificação quando ocorre a adição de água em excesso (FIRDAUS *et al.*, 2016).

O tempo de reação para a catálise enzimática é consideravelmente superior quando comparado à catálise química, efetuando processos reacionais entre 24 a 72 h para a produção de biodiesel (ZHAO *et al.*, 2017; NIELSEN, *et al.*, 2016). As condições existentes na

imobilização de enzimas podem ser responsáveis pela queda da atividade de catálise e elevar o tempo de reação (MOREAU *et al.*, 2008).

Maiores teores de enzima (Figura 17) e água (Figura 18), em menores tempos de reação favorecem o rendimento em acetato de etila (> 40 %) em menores tempos de reação. Foram observados menores valores de rendimento em acetato de etila, acima de 35 % para teores de água e enzima para a variável tempo fixada de 14 h (Figura 19). Os valores de rendimento em acetato de etila observados no presente trabalho foram considerados baixos em comparação com estudos da literatura. No estudo da transesterificação de diferentes fontes de óleo (soja, colza e mamona) fazendo uso de enzimas líquidas como *Eversa® Transform* (FIRDAUS *et al.*, 2016; ANDRADE *et al.*, 2017) e Callera™ Trans L (NORDBLAD *et al.*, 2014) foram observados rendimentos maiores que 90 %. Os valores de rendimento em acetato de etila estão muito semelhantes tanto para os valores de teor de água (%) mais elevados como para valores inferiores avaliados no DCCR, indicando que na interação teor de água em função do teor de enzima, possivelmente o teor de água não é tão relevante no rendimento em acetato de etila, nas condições analisadas (Figura 19).

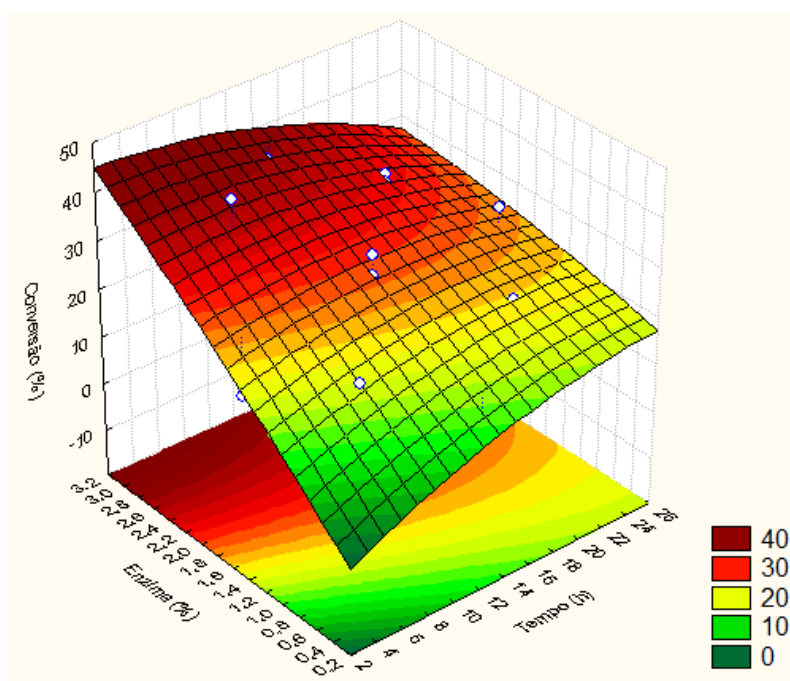


Figura 17. Porcentagem de rendimento em acetato de etila pela enzima livre, de acordo com a variação do teor de enzima e tempo de reação.

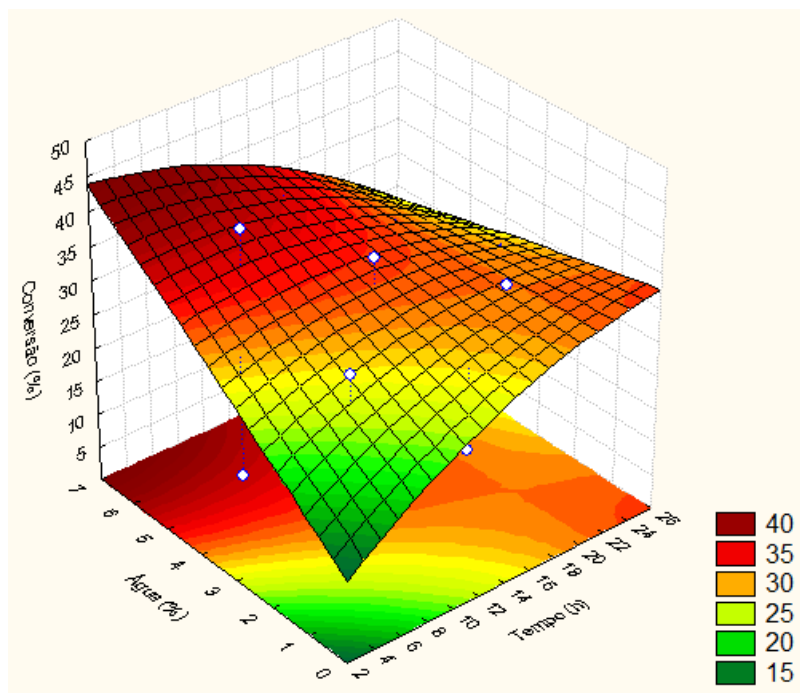


Figura 18. Porcentagem de rendimento em acetato de etila pela enzima livre, de acordo com a variação do teor de água e tempo de reação.

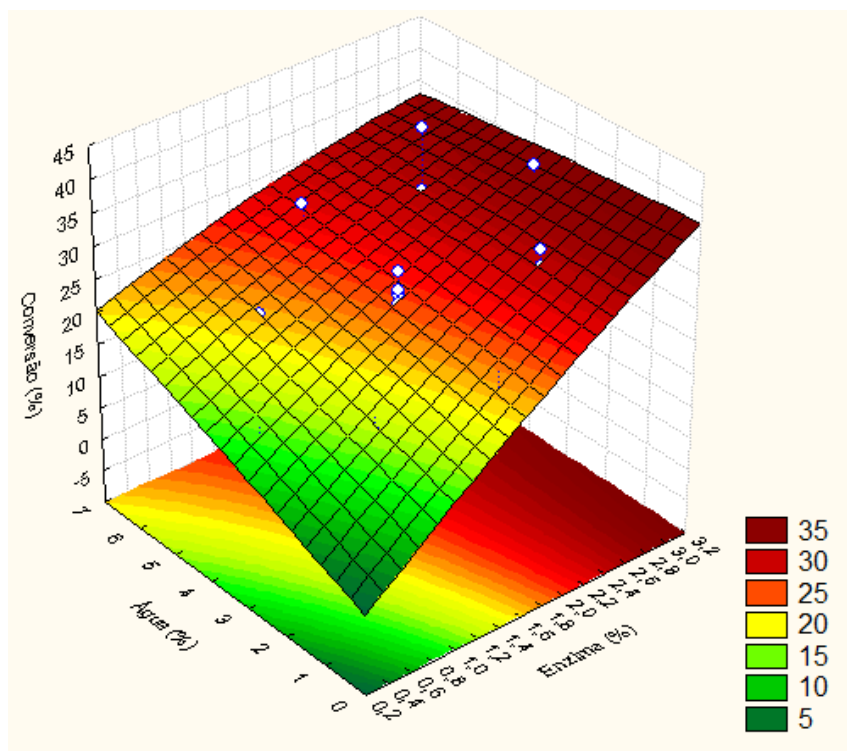


Figura 19. Porcentagem de rendimento em acetato de etila pela enzima livre, de acordo com a variação do teor de água e de enzima.

Para a enzima imobilizada, as interações de “Teor de enzima em função do tempo de reação”, “Teor de água em função do tempo de reação” e “Teor de água em função do teor e enzima” estão representados pelos gráficos das Figuras 20, 21 e 22, respectivamente. E pode-se notar que para os 3 gráficos, fixando a variável independente, o valor de rendimento em acetato de etila foi maior quando aumentou-se o valor das variáveis não fixadas do eixo X e Y e os melhores rendimentos foram observados de 6 a 8 %. Os valores de rendimento para a enzima imobilizada observados são muito inferiores aos que podem ser encontrados na literatura. Rendimentos acima de 60 % foram alcançados fazendo uso de lipases imobilizadas por aprisionamento na transesterificação de diferentes fontes de óleo (soja e usado) (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2017). Remonato *et al.*, (2018) observaram um notável rendimento, 99%, com o uso da *Eversa® Transform 2.0* imobilizada em Sepabeads-C18 na transesterificação de óleo de girassol.

Balasubramaniam *et al.*, (2012) obtiveram 74,12% de rendimento com o uso de lipase imobilizada, RO 262, e a lipase comercial em esferas de alginato de cálcio na transesterificação de óleo usado com etanol.

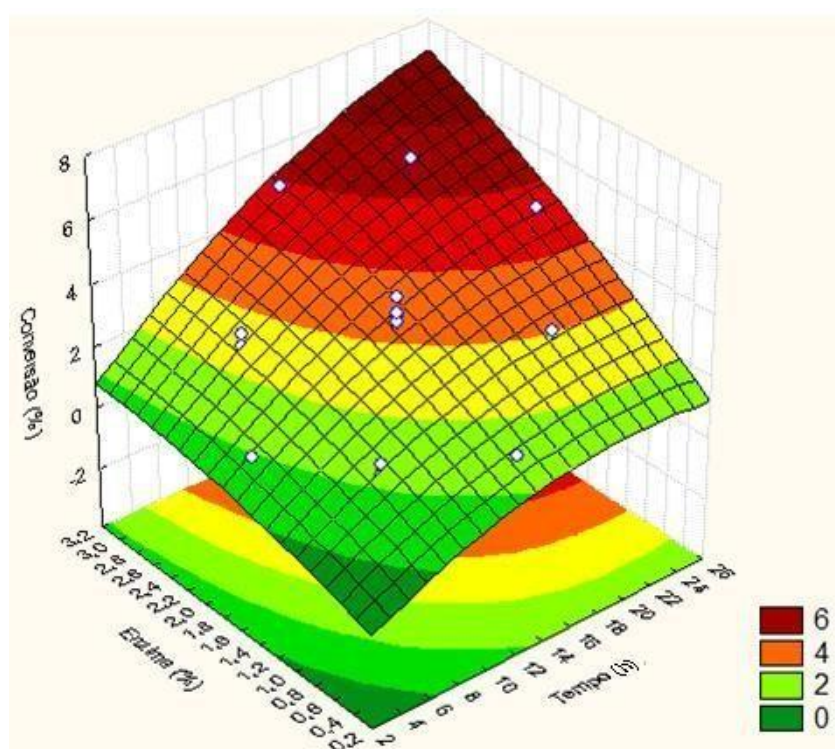


Figura 20. Porcentagem de rendimento em acetato de etila pela enzima imobilizada, de acordo com a variação do teor de enzima e água.

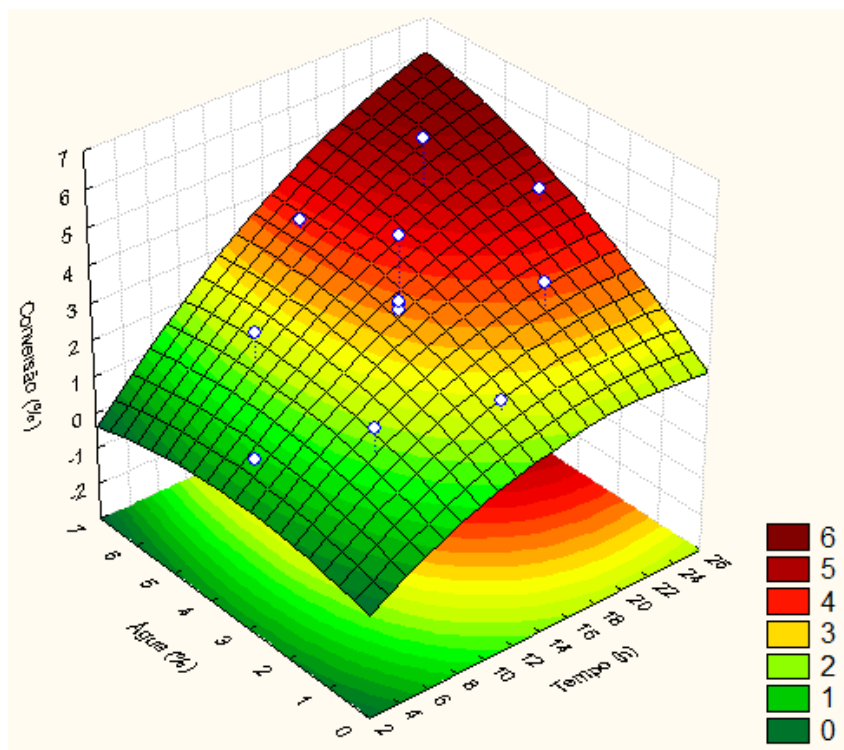


Figura 21. Porcentagem de rendimento em acetato de etila pela enzima imobilizada, de acordo com a variação do teor de água e tempo de reação.

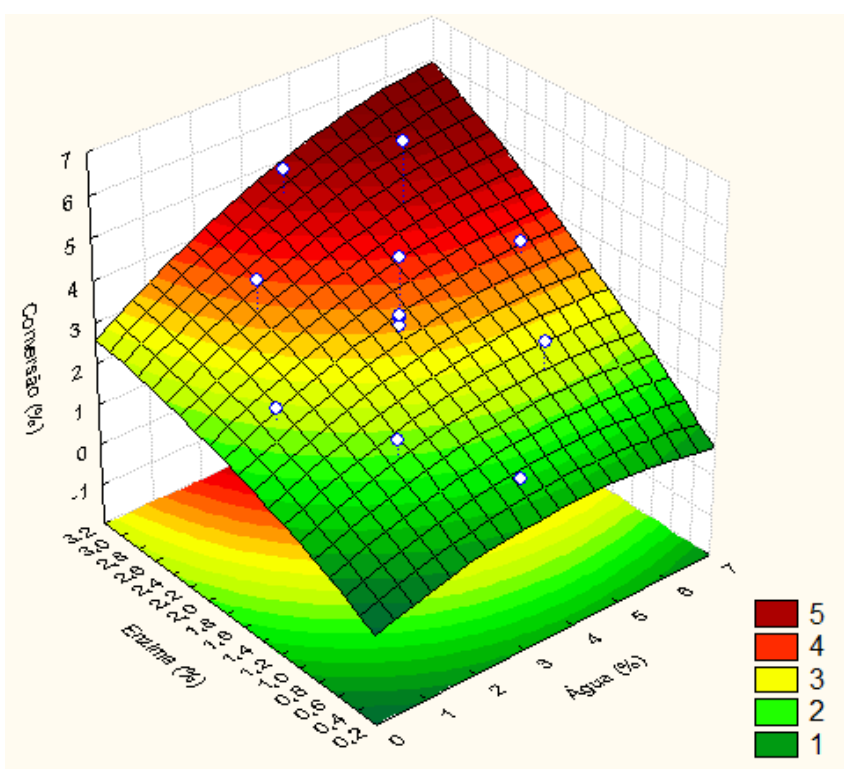


Figura 22. Porcentagem de rendimento em acetato de etila pela enzima imobilizada, de acordo com a variação do teor de enzima e de água.

O maior rendimento em acetato de etila pela enzima livre foi de 39,20 %, obtido a partir da condição de 2,5 % (v/v) de enzima, 5 % (v/v) de água e 8 h de reação. Andrade *et al.* (2017) obtiveram um rendimento de 36-44 % utilizando 5 % (m/m) de lipase (*Eversa® Transform*), sem adição de água, na transesterificação do óleo de mamona, durante 8 h. Estes autores observaram que aumentando para 10 % (m/m) o teor de lipase, o rendimento foi elevado para 86-94 %. Nordblad *et al.* (2014), estudando a reação de transesterificação do óleo de colza com enzimas líquidas, alcançaram elevadas conversões (95 %) com baixos teores de água (3 % (m/m)) elevando o teor de enzima de 0,2 para 0,5 % (m/m). No presente trabalho, na presença de 3,5 % (v/v) de água, o aumento progressivo da teor de enzima de 0,49 para 1,75 % (v/v) e, posteriormente, para 3,01 % levou a rendimentos progressivamente maiores de 8,1; 24 e 35,4 %, respectivamente.

Andrade *et al.* (2017) observaram que o uso de 5 % (m/m) de lipase e o aumento de 5 % (m/m) de água proporciona rendimentos elevados bem semelhantes aos já discutidos anteriormente. Este comportamento observado para o aumento de rendimento elevando o teor de água foi obtido no presente trabalho quando foi feito uso do teor de 1,75% de enzima e de água de 1%, onde um rendimento de 16,1% foi notado, já com a adição do teor de água em 6,02%, o rendimento foi de 29,2%.

De Oliveira *et al.* (2004) avaliaram a produção de biodiesel a partir do óleo de mamona fazendo uso das lipases Lipozyme IM (Novozymes) e Novozym 435 (Novozymes), durante 8 h a 35 °C. O uso de 5 % (m/m) de enzima sem acréscimo de água proporcionou rendimentos de 42,5 e 47,5 %, para cada enzima, respectivamente. O aumento do teor de enzima para 20 % e de água para 10 % (m/m) elevou o rendimento para 70,4 e 67 %, respectivamente. No presente trabalho foi possível observar um aumento do rendimento do acetato de etila de 16,1 para 35,4 % quando o teor de enzima e de água foram aumentados, simultaneamente, de 1,75 para 3,01 % e 1,0 para 3,5 %, respectivamente.

O aumento do rendimento do produto final pelas lipases na presença de água se deu devido à ativação interfacial dessas enzimas (FIRDAUS *et al.*, 2016). Ainda que as lipases líquidas já possuíssem água na formulação, um valor extra propiciou uma interação água-lipídio que favoreceu a ativação interfacial das lipases (MOGENSEN *et al.*, 2005). O meio reacional com um maior teor de enzima e água, portanto, pode ter proporcionado uma maior área de contato interfacial entre ambos.

A água possui grande influência no rendimento do produto final de reação. Além da já citada ativação interfacial da lipase pela água, a presença desse componente no meio também é essencial para a formação de *fatty acid methyl ester* (FAME) ou *fatty acid ethyl ester* (FAEE) (MOGENSEN *et al.*, 2005). O aumento da atividade da lipase foi fortemente influenciado por substratos insolúveis, ou seja, que criem um ambiente emulsionado, para a atividade da enzima na interface água-lipídeo (SHARMA *et al.*, 2001).

A conversão de óleo vegetal em biodiesel foi avaliada usando lipase líquida de *Thermomyces lanuginosus*, Eversa® Transform. Rendimentos de 92-97 % foram alcançados a partir da adição de 2 a 3 % (v/v) de água, 1 % (v/v) de enzima, após 24 h de reação a 35 °C (FIRDAUS *et al.*, 2016). No presente trabalho, apenas 15,2 % foi alcançado fazendo uso de 2 % (v/v) de água e 1 % (v/v) de enzima em 20 h de reação. Da mesma forma, para uso de 3,5 % de água e 1,75 % de enzima em 24 h de reação, foram alcançados 27,9 % de rendimento.

Para a enzima livre, as variáveis teor de enzima e teor de água foram mais significativas que a variável tempo para o rendimento em acetato de etila. Pedersen *et al.* (2014) observaram que um aumento no teor da enzima lipase Callera™ Trans L – (Novozymes) proporcionou um aumento na taxa de reação. O rendimento de 97,8 % foi obtido em 24 h com 1 % (m/m) de enzima, enquanto que com 2 % e 12 h de reação o mesmo rendimento já tinha sido alcançado. Entretanto, com 0,5 % e 24 h não foi atingido o equilíbrio. No presente trabalho, o rendimento de 21,4 % foi obtido nas condições de 20 h com 1 % (v/v) de enzima, com o aumento para 2,5% de enzima e 8 h, o rendimento aumentou para 39,2%.

Razack e Duraiarasan (2016) observaram no DCCR realizado que o melhor rendimento foi de 93,6 %, alcançado com 2g de lipases imobilizadas, com 60 h de reação de interesterificação do óleo de cozinha. Para o presente trabalho, foi possível observar que os maiores tempos do DCCR, 20, 14 e 24 h foram responsáveis pelos maiores rendimentos obtidos 5,8, 5,1 e 4,8 %, respectivamente, fazendo uso de 3,5 a 5,0 % (mg de proteína/mg de proteína) de lipase imobilizada. Assim como Ferreira *et al.* (2017) que atingiu 63% de rendimento com 96 h a 32°C e 400 rpm e 20% (p/p) da lipase Amano AK da *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em esferas de alginato de fibroína (FA-LPf) na reação de transesterificação do óleo de soja para produção de biodiesel (ésteres etílicos de ácidos gordos, FAEE). O tempo de reação é um parâmetro essencial para a viabilidade econômica e para o consumo de energia (MUPPANENI *et al.*, 2013).

Como existem problemas de difusão do substrato para o método de imobilização por aprisionamento físico (FERREIRA *et al.*, 2017), a razão para a variável tempo ser mais significativa está coerente, devido à necessidade de mais tempo para ocorrer a entrada do substrato nos poros do suporte de imobilização, onde estão aprisionadas as enzimas, a reação ocorrer e o produto sair. Estes problemas difusionais foram relatos por Balasubramaniam *et al.* (2012) quando estudaram a imobilização da lipase RO 262 e a lipase comercial em esferas de alginato de cálcio para uso na reação de transesterificação de óleo usado com etanol. Para a enzima livre, foi obtido rendimento de 89% e, para a enzima imobilizada, 74,12%. Foi notado que a enzima imobilizada possui menor capacidade catalítica que a enzima purificada, devido ao óleo ser incapaz de alcançar o sítio ativo da enzima de forma eficaz em comparação à sua forma livre.

A morfologia e os grupos funcionais do suporte onde a lipase é imobilizada podem influenciar na reação de transesterificação, devido à atividade da enzima e, especialmente, pela sua seletividade. No caso deste trabalho, os suportes de alginato de cálcio são hidrofílicos, diferentes no caso dos suportes do estudo de Remonatto *et al.* (2018) que são hidrofóbicos e obtiveram 99 % de rendimento (FAEE) ao trabalhar com a *Eversa® Transform 2.0* imobilizada em Sepabeads-C18. Além do que, a capacidade de a lipase alcançar rendimentos de quase 100 % de FAEE deve-se à seletividade da lipase imobilizada, com potencial de reconhecer as três posições do óleo, onde normalmente as lipases possuem seletividade de 1,3 não proporcionando rendimentos tão elevados. A ausência de água também pode explicar esses rendimentos, pois a reação de hidrólise reversível é evitada, porém como a enzima requer o uso de água para ser ativada, deve-se ficar atento a este parâmetro.

O excesso de água propicia a queda no rendimento de FAME, contribuindo com a reação de hidrólise, aumentando a produção de ácidos graxos livres (AGL) (ANDRADE *et al.*, 2017; FIRDAUS *et al.*, 2016). De acordo com Pedersen *et al.* (2014), a formação de *fatty acid methyl ester* (FAME) ou de *fatty acid ethyl ester* (FAEE) favorece a formação de glicerina e ambos favorecem o rendimento global do biodiesel. Porém, segundo Vyas *et al.*, (2009), a formação do subproduto glicerol, inibiu a reação.

O processo de agregação observado para a suspensão da enzima, aqui neste trabalho, ocorreu quando a suspensão se encontrava próximo ao seu ponto isoelétrico, ou seja, o ponto onde a carga líquida total estaria próximo à zero. Neste ponto, as forças de repulsão entre as moléculas de proteína e as forças de interação com o solvente são mínimas, formando

aglomerados com tendência a precipitação (DOS SANTOS *et al.*, 2018).

O processo de agregação foi observado para a lipase *Eversa® Transform 2.0* na análise de Potencial Zeta (item 5.1.3.) para a sua forma livre e confirmado por meio das imagens da análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (item 5.2.1.). Possivelmente, esses estados de agregação explicam os resultados do DCCR, que sugeriram o aumento do teor de enzimas para melhores resultados de rendimento na reação de transesterificação. Além de ser possível observar nas imagens feitas no MEV que a enzima imobilizada apresentou estados de agregação muito maiores (22.000 a 40.000 nm) que nos resultados do Potencial Zeta (539 nm a 1261 nm) para a enzima livre. Como observado, após o processo de imobilização, a enzima demonstrou um estado de agregação maior que da sua forma livre, portanto, o processo de agregação pode, juntamente, com os problemas difusionais ter influenciado negativamente no processo, ou seja, nos rendimentos do produto final.

A produção de biodiesel pode sofrer redução devido à quantidade de lipase adicionada. Isso também foi relatado por Li e Yan (2010) que estudaram a transesterificação do óleo de *Sapium sabiferum*. Em altas quantidades de lipase, o sítio ativo pode não se expor aos substratos e as moléculas da enzima sofrerem agregação (CALERO *et al.*, 2014).

5.5. Reuso da enzima imobilizada

O reuso é de grande importância para os catalisadores heterogêneos na aplicação industrial (YAN *et al.*, 2014). Porém, o reuso de enzimas imobilizadas ainda é um desafio para aplicação industrial, principalmente em relação à manutenção da atividade das enzimas imobilizadas devido à dessorção e à inibição ao substrato (BAJAJ *et al.*, 2010).

Os resultados deste trabalho para manutenção da atividade foram inferiores ao encontrado na literatura considerando vários ciclos de reuso. Razack e Duraiarasan (2016) estudaram a reutilização de lipase imobilizada de culturas mistas em esferas de alginato de cálcio 2 % e, após 20 ciclos, ela manteve a atividade. Remonatto *et al.* (2018) observaram que após 3 ciclos de reuso, a atividade da enzima Sepabeads-*Eversa® Transform 2.0* caiu apenas 25 % na produção de ésteres etílicos na transesterificação do óleo de girassol.

Tabela 6. Valores de rendimento em acetato de etila e de atividade recuperada para os 3 ciclos de reuso utilizando a enzima imobilizada.

Ciclo	Rendimento em acetato de etila (%)	Atividade recuperada (%)
0	5,84	100,0
1	4,90	83,9
2	2,28	39,0
3	1,39	23,8

Segundo Razack e Duraiarasan (2016), o biocatalisador sofre inativação na presença do metanol após o quarto ou quinto ciclo de reuso da lipase, sendo caracterizada como uma das principais limitações na produção do biodiesel por catálise enzimática. No presente trabalho, a reação de transesterificação foi realizada na presença de etanol, sendo possível a inativação de grande parte da enzima imobilizada pelo mesmo.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, a lipase *Eversa® Transform 2.0* foi caracterizada e imobilizada em esferas de alginato de cálcio 1,2 %, e, posteriormente, utilizada na avaliação do rendimento em acetato de etila por meio da conversão da triacetina em reações de transesterificação. A enzima apresentou massa molar aproximada de 30 kDa, ponto isoelétrico de 6,8, segundo resultado da titulação potenciométrica, e foi possível observar que a estabilidade da enzima foi menos afetada em valores de pH extremos, tanto ácido como básico. Mesmo diluída 1000 X, a enzima sofreu um processo de aglomeração.

Em sua forma livre, a enzima foi capaz de converter até 39,26 % da triacetina durante reações de transesterificação. Este valor foi obtido quando a concentração de enzima era de 2,5 % (v/v) e a concentração de água 5 % (v/v), após 8 h de reação, sendo todas essas variáveis consideradas significativas para a eficiência no rendimento da reação quando realizada pela enzima livre, sendo na seguinte ordem de significância: teor de enzima, teor de água e tempo. A aglomeração da enzima, neste caso, pode ter influenciado nos resultados da reação, devido ao número de sítios ativos presentes não estarem disponíveis. Os rendimentos alcançados na reação de transesterificação comprovam o potencial catalítico da lipase *Eversa Transform 2.0*, entretanto, as condições reacionais avaliadas neste estudo devem ser otimizadas.

A imobilização da enzima nas esferas de alginato de cálcio a 1,2 % foi realizada, resultando em um rendimento de imobilização de 14,61 % e eficiência de imobilização de 80 %. A análise das esferas por Microscopia Eletrônica de Varredura evidenciou que as enzimas foram aprisionadas na forma aglomerada, logo é possível que tenha interferido na análise das variáveis em estudo.

A enzima imobilizada foi capaz de converter a triacetina em acetato de etila até 5,84 %, quando utilizado o teor de enzima de 2,5 % (v/v) e teor de água 5 % (v/v), após 20 h de reação. De acordo com a análise estatística, as 3 variáveis principais testadas foram significativas, sendo na seguinte ordem o nível de significância: tempo, enzima e água. Provavelmente, a menor difusão do substrato nas esferas de alginato de cálcio levou à necessidade de um maior tempo para a reação.

A partir dos ciclos de reuso da enzima imobilizada, foi possível observar que a manutenção da atividade foi de 83,9 % após o 1º ciclo de reuso e muito baixa após o 2º e 3º ciclos, onde a atividade recuperada foi de 39,0 e 23,8 %, respectivamente.

Os rendimentos alcançados na reação de transesterificação com a lipase *Eversa*® *Transform 2.0* imobilizada para este estudo demonstram que algumas condições reacionais devem ser otimizadas para emprego eficiente da enzima com reuso no processo de produção de biodiesel.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Realizar um estudo cinético da transesterificação da triacetina por meio da via enzimática utilizando a *Eversa Transform 2.0*, a fim de verificar qual modelo representa melhor a reação.

Avaliar os aspectos cinéticos da lipase *Eversa Transform 2.0* em sua forma livre e imobilizada.

Simular o processo de produção do acetato de etila por meio da transesterificação com a lipase *Eversa Transform 2.0* por meio de softwares comerciais com o intuito de determinar o balanço de massa e energia, dimensionar os equipamentos envolvidos e realizar uma avaliação econômica para averiguar a viabilidade do processo.

Otimizar, através de um planejamento experimental, o uso de solventes orgânicos e diferentes valores de pH do meio reacional na reação de transesterificação enzimática estudada.

Realizar um estudo da lipase *Eversa Transform 2.0* com outras fontes de triglicerídeos, como óleo virgem e óleo usado, para obtenção do biodiesel e caracterizá-lo de acordo com especificações da ANP.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKOH, C. C. et al. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8995-9005, 2007.
- AMINI, Z. et al. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. **Energy conversion and management**, v. 141, p. 339-353, 2017.
- ANDRADE, T. A. et al. Castor Oil Transesterification Catalysed by Liquid Enzymes: Feasibility of Reuse under Various Reaction Conditions. **CHEMICAL ENGINEERING**, v. 57, 2017.
- ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel.asp> >. Acesso em: 12/12/2018.
- ARANA-PENÑA, S. et al. Immobilization of Eversa Lipase on Octyl Agarose Beads and Preliminary Characterization of Stability and Activity Features. **Catalysts**, v. 8, n. 11, p. 511, 2018.
- ARUMUGAM, A.; PONNUSAMI, V. Biodiesel production from Calophyllum inophyllum oil using lipase producing Rhizopus oryzae cells immobilized within reticulated foams. **Renewable Energy**, 64, 0, p. 276-282, 2014.
- BABAKI, Mohadese et al. Enzymatic production of biodiesel using lipases immobilized on silica nanoparticles as highly reusable biocatalysts: effect of water, t-butanol and blue silica gel contents. **Renewable Energy**, v. 91, p. 196-206, 2016.
- BACKES, A. M. **Desenvolvimento de produto cárneo fermentado adicionado de óleo de canola**. 2011. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2011.
- BADGUJAR, C.K. et al. Immobilization of Candida cylindracea lipase on poly lactic acid, polyvinyl alcohol and chitosan based ternary blend film: Characterization, activity, stability and its application for N-acylation reactions. **Process Biochemistry**, v.48, p.1335-1347, 2013.
- BAJAJ, A. et al. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.62, p.9-14, 2010.
- BALASUBRAMANIAM, B. et al. Comparative analysis for the production of fatty acid alkyl esterase using whole cell biocatalyst and purified enzyme from Rhizopus oryzae on waste cooking oil (sunflower oil). **Waste management**, v. 32, n. 8, p. 1539-1547, 2012.
- BARON, A. M. Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise. 2008.
- BASHA, S. A. et al. A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 13, n. 6, p. 1628-1634, 2009.

BERGAMASCO, J. et al. Enzymatic transesterification of soybean oil with ethanol using lipases immobilized on highly crystalline PVA microspheres. **Biomass and Bioenergy**, 59, 0, p. 218-233, 2013.

BETSY, T., & KEOGH, J. E. **Microbiology demystified**. McGraw-Hill, 2005.

BON, E. P. S. et al. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado; Interciência**: Rio de Janeiro, 2008.

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

BRÍGIDA, A. I. S. **Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais**. 2010. 197 p. Tese (Doutorado) Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

CALERO, J. et al. Selective ethanolysis of sunflower oil with Lipozyme RM IM, an immobilized *Rhizomucor miehei* lipase, to obtain a biodiesel-like biofuel, which avoids glycerol production through the monoglyceride formation. **New biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 596-601, 2014.

CETESB/SP. Ficha de informação de produtos químicos: Óleo de soja. Disponível em: <http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=%D3LEO%20DE%20SOJA>. Acessado em: 11/12/2018.

CHAUBEY, A. et al. Enantioselectivity modulation through immobilization of *Arthrobacter* sp. lipase: kinetic resolution of fluoxetine intermediate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, n. 1-2, p. 39-44, 2006.

CHEIRSILP, B. et al. Impact of transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase. **Biochemical engineering journal**, v. 42, n. 3, p. 261-269, 2008.

CHEN, L. et al. Zeta potential of limestone in a large range of salinity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 450, p. 1-8, 2014.

CIPOLATTI, E.P. et al. Synthesis and modification of polyurethane for immobilization of *Thermomyces lanuginosus* (TLL) lipase for ethanolysis of fish oil in solvent free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 163–169, 2015.

DALLA-VECCHIA, R. et al. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DAVIS, T. A. et al. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. **Water Research**, v. 37, p. 4311–4330, 2003.

DE OLIVEIRA, D. et al. **Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium**. In: Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO. Humana Press, Totowa, NJ, 2004. p. 771-780.

DE OLIVEIRA, Iago Francisco S. et al. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES DE AMIDO PLASTIFICADOS COM GLICEROL OU TRIACETINA**. FOCO: caderno de estudos e pesquisas, n. 7, 2016.

DEMIRBAS, A. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. **Energy Conversion and Management**, v. 49, n. 1, p. 125-130, 2008.

DEMIRBAS, A. et al. Biodiesel production from non-edible plant oils. **Energy Exploration & Exploitation**, v. 34, n. 2, p. 290-318, 2016.

DHAWANE, S. H. et al. Process optimisation and parametric effects on synthesis of lipase immobilised carbonaceous catalyst for conversion of rubber seed oil to biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 176, p. 55-68, 2018.

DIAMANTOPOULOS, N. et al. Comprehensive review on the biodiesel production using solid acid heterogeneous catalysts. **Journal of Thermodynamics & Catalysis**, v. 6, n. 1, p. 1, 2015.

DIZGE, N. et al. 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.

DOSSIN, T. F. et al. Kinetics of heterogeneously MgO-catalyzed transesterification. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 62, n. 1, p. 35-45, 2006.

EBENEZER, S. P. Noise reduction and comfort noise gain control using bark band weiner filter and linear attenuation. **U.S. Patent** n. 7,454,010, 18 nov. 2008.

ERICSSON, D. J. et al. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of molecular biology**, v. 376, n. 1, p. 109-119, 2008.

FEDOSOV, S. N.; XU, X. Enzymatic synthesis of biodiesel from fatty acids. Kinetics of the reaction measured by fluorescent response of Nile Red. **Biochemical engineering journal**, v. 56, n. 3, p. 172-183, 2011.

FERNANDES, I. A. et al. Nanopartículas de poli-hidroxibutirato-covalerato como suporte para a imobilização da lipase de *Candida antarctica* fração B. **Quim. Nova**, v. 37, n. 2, p. 331-336, 2014.

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

FERRATO, F. et al. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. **Methods in enzymology**, v. 286, p. 327-347, 1997.

FERREIRA, I. M. et al. Ethylic Biodiesel Production Using Lipase Immobilized in Silk Fibroin-Alginate Spheres by Encapsulation. **Catalysis Letters**, v. 147, n. 1, p. 269-280, 2017.

FIRDAUS, M. Y. et al. Kinetic model of biodiesel production catalyzed by free liquid lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 55-64, 2016.

FRAGA, F. C. et al. Effect of magnetic field on the Eversa® Transform 2.0 enzyme: Enzymatic activity and structural conformation. **International journal of biological macromolecules**, v. 122, p. 653-658, 2019.

FREITAS, V. O. **Avaliação do uso da tecnologia de ultrassom na síntese enzimática de ésteres etílicos**. 2018. 78 p. Dissertação (Mestrado em Eng. Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2018.

FUNDUEANU, G. et al. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. **Biomaterials**, v. 20, n. 15, p. 1427-1435, 1999.

GAO, J. et al. Monodisperse core-shell magnetic organosilica nanoflowers with radial wrinkle for lipase immobilization. **Chemical Engineering Journal**, v. 309, p. 70-79, 2017.

GARCIA-CRUZ, C. H. et al. “Alginato Bacteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção”. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.

GERIS, R., et al. **Biodiesel de soja-reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica**. v. 30, n. 5, p. 1369-1323, 2007.

GHALY, A. E. et al. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology** 6, p. 103-110, 2010.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, n. 8, p. 1721-1754, 2007.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. Protein release from alginate matrices. **Advanced drug delivery reviews**, v. 31, n. 3, p. 267-285, 1998.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. 2nd ed. New Jersey, Eua: Humana Press, xiv, p.449, 2006.

GULDHE, A. et al. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1447–1464, 2015.

HALIM, S. F. A. et al. 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. et al. Akihiko. How lipase technology contributes to evolution of biodiesel production using multiple feedstocks. **Current opinion in biotechnology**, v. 50, p. 57-64, 2018.

HASAN, F. et al. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HOUDE, A. et al. Lipases and their industrial applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155, 2004.

HUANG, Y. et al. Optimization of Lipase-Catalyzed Transesterification of Lard for Biodiesel Production Using Response Surface Methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 160, 2, p. 504-515, 2010/01/01 2010.

IDRIS, A., BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology Advances** 30, 550-563, 2012.

ISSARIYAKUL T, D. A. **Biodiesel from vegetable oils. Renew Sust Energ Rev** 2014;31:446-71.

JEGANNATHAN, K.R.et al. Lipase-a produção de biodiesel utilizando imobilizado revisão crítica. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, pp. 253-264, 2008.

JESIONOWSKI, T. et al. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, n. 5-6, p. 801-821, 2014.

JIANG, Y. et al. Pickering emulsion stabilized by lipase-containing periodic mesoporous organosilica particles: A robust biocatalyst system for biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 153, p. 278-283, 2014.

KARATAY, S. E.; DÖNMEZ, G. Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. **Applied Energy**, 88, 11, p. 3632-3635, 2011.

KING, V. A. E. et al. Ethanol fermentation of whey using calcium alginate entrapped yeasts. **Process biochemistry**, v. 18, n. 6, p. 17-20, 1983.

KNEZEVIC, Z. et al. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 313-318, 2002.

KNOTHE, G., et al. **Manual do Biodiesel**, (Ed.) Edgard Blucher. São Paulo, 2006.

KRIEGER, N. **Produção, Purificação e Caracterização de Lipases de *Penicillium citrinum***. 1995. 260 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.

LI, Q.; YAN, Y. Production of biodiesel catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from *Sapium sebiferum* oil in micro-aqueous phase. **Applied Energy**, v. 87, n. 10, p. 3148-3154, 2010.

LI, Y. et al. Acidic ionic liquid-catalyzed esterification of oleic acid for biodiesel synthesis. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 35, n. 3, p. 396-406, 2014.

LIMA, E. D. P. D. A. et al. Purificação da enzima polifenoloxidase (PFO) de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura. **Food Science and Technology** (Campinas), 2001.

LÓPEZ, D. E. et al. Transesterification of triacetin with methanol on solid acid and base catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 295, n. 2, p. 97-105, 2005.

LOTERO, E. et al. Synthesis of biodiesel via acid catalysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.44, p.5353-5363, 2005.

MAGNER, E. Immobilization of enzymes on mesoporous silicate materials. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6213-6222, 2013.

MAPA, Portaria 795/1993 de 20/12/1993. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1431040401>>. Acessado em: 11/12/2018.

MARQUES, P. P. et al. **Estudo da imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em alginato de sódio**. 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado em Eng. Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.

MCHUGH, D. J. Production, properties and uses of alginates in production and utilization of products from commercial seaweeds. Australia. **FAO Fisheries Technical Paper**. Cap. 2, p. 58-115, 1987.

MEHER, L. C. et al. Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 10, n. 3, p. 248-268, 2006.

MENDES, A. A. et al. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119-134, 2012.

MERTINS, O. et al. Characterization of soybean phosphatidylcholine purity by ¹H and ³¹P NMR. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1856-1859, 2008.

MIYASHIRO, C. S. et al. Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos residuais. **Revista brasileira de energias renováveis**, v. 2, n. 3, 2013.

MOGENSEN, J. E. et al. Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. **Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 1719-1730, 2005.

MOHAMMADI, M. et al. One pot three-component reaction for covalent immobilization of enzymes: application of immobilized lipases for kinetic resolution of rac-ibuprofen. **RSC Advances**, v. 6, n. 58, p. 52838-52849, 2016.

MOREAU, R. A. et al. The identification and quantification of steryl glucosides in precipitates from commercial biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 8, p. 761-770, 2008.

MUFRODI, Z., R., SUTIJAN, B. A. Continuous Process of Reactive Distillation to Produce Bio-additive Triacetin From Glycerol. **Modern Applied Science**; n. 10; 70-78, 2013.

- MUÑIZ, J. et al. Density functional theory study of the reactivity and electronic structure of the transesterification of triacetin in biodiesel production via a sulfated zirconia heterogeneous catalysis. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 116, n. 13, p. 988-999, 2016.
- MUPPANENI, T. et al. Optimization of biodiesel production from palm oil under supercritical ethanol conditions using hexane as co-solvent: a response surface methodology approach. **Fuel**, v. 107, p. 633-640, 2013.
- NARASIMHARAO, K. et al. Catalysts in production of biodiesel: a review. **Journal of biobased materials and bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 19-30, 2007.
- NAUTIYAL, P. et al. Production and characterization of biodiesel from algae. **Fuel Processing Technology**, v. 120, p. 79-88, 2014.
- NELSON, D. L. et al. **Lehninger Principles of Biochemistry**, p. 127, 2000.
- NIELSEN, P. M. et al. Production of biodiesel using liquid lipase formulations. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 7, p. 905-910, 2016.
- NORDBLAD, M. et al. Identification of critical parameters in liquid enzyme-catalyzed biodiesel production. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 12, p. 2446-2453, 2014.
- NORJANNAH, B. et al. Enzymatic transesterification for biodiesel production: a comprehensive review. **RSC Advances**, v. 6, n. 65, p. 60034-60055, 2016.
- NOUREDINI, H. et al. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource technology**, v. 96, n. 7, p. 769-777, 2005.
- NOVOZYMES, 2017. The novozymes enzymatic biodiesel handbook. Disponível em: ><http://www.novozymes.com/en/about-us/brochures>< (acessado em Dezembro de 2018).
- NOVOZYMES, 2015. The novozymes enzymatic biodiesel handbook. Disponível em: ><http://www.novozymes.com/en/solutions/bioenergy/enzymaticbiodiesel/Pages/enzymatic-biodiesel-handbook.aspx>< (acessado em Dezembro de 2018).
- PALOMO, J. M. et al. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, n. 1, p. 267-273, 2004.
- PALOMO, J. M., et al. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19, p. 279-286, 2002.
- PEDERSEN, A. T. et al. Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 89-94, 2014.
- PEREIRA, M.G. et al. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 561, 2015.
- PINHO, D. M. M.; SUAREZ, P. A. Z. Do. Óleo de Amendoim ao Biodiesel-Histórico e Política Brasileira para o Uso Energético de Óleos e Gorduras. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, 2017.

POLLASTRI, S. et al. The zeta potential of mineral fibres. **Journal of Hazardous Materials**, v. 276, p. 469–479, 2014.

RAMPIN, Marcia Alexandra. **Síntese de ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de mamona e soja utilizando a lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* (LIPOZYME TL IM)**. 2007. f. Dissertação (Mestre em Química). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2007

RAZACK, S. A.; DURAIARASAN, S. Response surface methodology assisted biodiesel production from waste cooking oil using encapsulated mixed enzyme. **Waste Management**, v. 47, p. 98-104, 2016.

REMONATTO, D. et al. Production of FAME and FAEE via Alcoholysis of Sunflower Oil by Eversa Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports. **Applied biochemistry and biotechnology**, p. 1-12, 2018.

RODRIGUES, F. G. et al. Atividade de enzimas digestivas e parâmetros de crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com farelo de linhaça in natura e demucilada. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, 2013.

RODRIGUES, R. C. **Síntese de Biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalizada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual**. 2009. 183 f. Tese (Doutorado em Eng. Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

ROSSET, I. G. et al. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and ¹H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General**, v. 392, n. 1, p. 136-142, 2011.

RUHUL, A. M. et al. State of the art of biodiesel production processes: a review of the heterogeneous catalyst. **RSC Advances**, v. 5, n. 122, p. 101023-101044, 2016.

SANT'ANNA, J. R. GL Produção de enzimas microbianas. LIMA, UA; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.(Coords.). **Biotecnologia industrial-processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p. 351-362, 2001.

SANTOS, A. F. dos. **Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP, 2010.

SANTOS, R. L. dos et al. **Avaliação da produção de alginato por *Pseudomonas mendocina***. 2012. 117 f. Dissertação (Mestrado em Eng. de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2012.

SCHMID, A. et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 258, 2001.

SHARMA, R. et al. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SHARMA, Y. C. et al. Advancements in solid acid catalysts for ecofriendly and economically viable synthesis of biodiesel. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 5, n. 1, p. 69-92, 2011.

SHU, C. H. et al. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 734-738, 2006.

SILVA, A. N. da; GARCIA-CRUZ, C. H. “A metodologia de superfície de resposta como ferramenta para a avaliação da produção de alginato e poli-hidroxibutirato pela *Azotobacter vinelandii*”. **Acta Scientiarum Technology**, v.32,n.2,p.105-112,2010.

SILVA, G. BS et al. Avaliação da influência de diferentes plastificantes em composições de poli (cloreto de vinila). **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 19, n. 1, p. 20-28, 2018.

SILVA, K. M. M. N. **Caracterização de hidrogéis semi- interpenetrantes de alginato e quitosana reticulados com cloreto de cálcio ou glutaraldeído: estudo do efeito das condições de preparo em suas propriedades mecânicas e físico-químicas**. 2015. 136 f. Dissertação (Mestrado em Eng. Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2015.

SILVA, L. L. **Estudos de óleos residuais oriundos de processo de fritura e qualificação desses para obtenção de monoésteres (Biodiesel)**. 2008. 65 f. Dissertação (Mestrado em Eng. Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceio, AL, 2008.

SILVA, M. V. R. da et al. **Adsorção de cromo hexavalente por carvão ativado granulado comercial na presença de surfactante aniônico (LAS)**. 2011. Universidade do Paraná. 2011

SINGH, B. et al. Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 216–24, 2014.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**, Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006. **Skoog, DA**, p. 0-50.

SOTOFT, L. F. et al. Process simulation and economical evaluation of enzymatic biodiesel production plant. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5266-5274, 2010.

STERGIOU, P.Y. et al. Advances in lipases-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v.31, p.1846-1859, 2013.

SU, F. et al. Biodiesel production from woody oil catalyzed by *Candida rugosa* lipase in ionic liquid. **Renewable Energy**, v. 90, p. 329-335, 2016.

SU, F.; GUO, Y. Advancements in solid acid catalysts for biodiesel production. **Green Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 2934-2957, 2014.

TANASKOVIĆ, S. J. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on kaolin and its application in synthesis of lipophilic antioxidants. **Applied Clay Science**, v. 135, p. 103-111, 2017.

TAQUIEDDIN, E.; AMIJ, M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core shell microencapsules. **Biomaterials** 2004, 25, 1937–1945.

TEIXEIRA, V. F. **Estudo da obtenção de biocatalisadores com matrizes de alginato de cálcio visando a produção de biodiesel**. 2011.

TEMÓTEO, R. L. et al. A Kinetic Investigation of Triacetin Methanolysis and Assessment of the Stability of a Sulfated Zirconium Oxide Catalyst. **J Am Oil Chem Soc**, v. 95. P. 865-874, 2018.

VIEIRA, J. S. C. et al., Homogeneous esterification and transesterification of vegetable oils with high free fatty acids content. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p.10-16, 2018.

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

VIOMAR, A. et al. **Estudo das variáveis da produção de biodiesel**. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do CentroOeste, Guarapuava, PR, 2013

VYAS, A. P. et al. Production of biodiesel through transesterification of Jatropha oil using KNO₃/Al₂O₃ solid catalyst. **Fuel**, p 625-628, 2009.

WELTER, R. A. et al. Estudo do equilibrio dos sistemas binarios e ternario de troca ionica dos ions cobre, cadmio e calcio pelo biopolimero alginato. 2009. 226 f. Dissertação (Mestrado em Eng. Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009

WINGENDER, J. et al. Interaction of extracellular Pseudomonas lipase with alginate and its potential use in biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 139-145, 1987.

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.

WISEMAN, A. “**Handbook of enzyme biotechnology**”, 3rd ed., Ellis Horwood, London, pp. 385, 1995.

XU, Yuan et al. In situ visualization and effect of glycerol in lipase-catalyzed ethanolysis of rapeseed oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 213-219, 2011.

YAN, J. et al. A novel and robust recombinant Pichia pastoris yeast whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a Thermomyces lanuginosus lipase: preparation, characterization and application in biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 151, p. 43-48, 2014.

YANG, W. et al. Uma nova lipase termo-solvente estável extracelular de *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identificação, caracterização e aplicação para a produção de biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 126, p. 76-89, 2016.

ZABETI, M. et al. Activity of solid catalysts for biodiesel production: A review. **Fuel Processing Technology**, v.90, p.770-777, 2009.

ZAIN, N. A. M. et al. Hydrolysis of liquid pineapple waste by invertase immobilized in PVA–alginate matrix. **Biochemical Engineering Journal**, v. 50, n. 3, p. 83-89, 2010.

ZAMBON, A. A. et al. Produccion dealginatos comerciales a partir de algas pardas patagonicas, **Revista Industria y Química**, no 344, 2002.

ZHANG, H. et al. Efficient production of biodiesel with promising fuel properties from *Koelreuteria integrifoliola* oil using a magnetically recyclable acidic ionic liquid. **Energy conversion and management**, v. 138, p. 45-53, 2017.

ZHAO, K. et al. Synthesis, characterization and optimization of a two-step immobilized lipase. **Renewable energy**, v. 103, p. 383-387, 2017.

ZHAO, T. et al. Novel strategy for lipase-catalyzed synthesis of biodiesel using blended alcohol as an acyl acceptor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 17-22, 2014.

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

ZIEBA, A. et al. Transesterification of triacetin with methanol on various solid acid catalysts: A role of catalyst properties. **Applied Catalysis A: General**, v. 387, p. 13–25, 2007.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14139-14194, 2014.