

Adriana Dantas

**IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE NS-40116  
EM POLIESTIRENO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos. Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow. Coorientadoras: Prof. Dr<sup>a</sup>. Débora de Oliveira e Dr<sup>a</sup>. Alexandra Valerio.

Florianópolis – SC  
2017

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

Dantas, Adriana

Imobilização e caracterização da lipase NS-40116 em poliestireno / Adriana Dantas ; orientador, Jorge Luiz Ninow ; coorientadora, Débora de Oliveira, coorientadora, Alessandra Valerio. - Florianópolis, SC, 2017.

113 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Lipase. 3. Partículas de poliestireno. 4. Éster metílico. I. Ninow, Jorge Luiz . II. Oliveira, Débora de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

# **“IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE NS-40116 EM POLIESTIRENO”**

Por

**Adriana Dantas**

Dissertação julgada para obtenção do Título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow  
**Orientador**

---

Prof.a. Dra. Débora de Oliveira  
**Coorientadora**

---

Dra. Alexsandra Valério  
**Coorientadora**

---

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi  
**Coordenador**

## **Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

---

Prof.a. Dra. Maria Manuela  
Camino Feltes

---

Dr. Lindomar Alberto Lerin

---

Dr. Josamaique Gilson Veneral

**Florianópolis, 24 de fevereiro de 2017.**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, pela minha saúde, e pelas pessoas maravilhosas que colocou no meu caminho durante esta jornada.

À minha querida amiga Palloma Rodrigues, por acreditar em mim, e em consequência, ser o principal motivo da minha candidatura no PPGEAL.

À minha família, por nunca medirem esforços para me apoiar e me ajudar no que for preciso. Meus pais Maria e Jorge, sem vocês eu nada seria! Não tenho palavras para expressar o quanto me orgulho de tê-los na minha vida e o quanto agradeço a Deus por isso. Meus irmãos Cristina e Davi e meus cunhados Daniel e Rosângela, obrigada pelo amor, afeto e incentivo, vocês são meus exemplos de vida.

Aos meus orientadores prof. Jorge, prof<sup>a</sup>. Débora e Alessandra Valerio. Muito obrigada pela oportunidade de fazer esse trabalho com vocês, pela paciência, por toda a dedicação e conhecimentos repassados. Obrigada pelos momentos de descontração em meio à correria da pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório Jacqueline Pires, Janaína Lima, Daniela Bresolin, Lindomar Lerin e Mara Cristina, por estarem sempre dispostos a tirar minhas dúvidas, e assim, contribuírem de forma significativa para a realização deste projeto.

Aos amigos da minha turma da pós, Talyta, Ingrid, Edilberto, Henrique, Bruno, Aline e Josimária. Vivemos juntos os piores e melhores momentos de um pós-graduando, compartilhamos cada pequena vitória, sorrimos e crescemos juntos. Sou muito grata a cada um de vocês!

Àqueles amigos que mesmo de longe sempre torceram por mim e pelo meu sucesso: Adiléia, Wanderson Gonçalves, Eliana, Cipriano, Ana Carolina, Jacqueline Mota, Samara, Pedro Júnior, Nataly, Lena Rodrigues e Sol. Sem vocês esta caminhada teria o triplo de empecilhos e dificuldades.

À Ana Júlia, aluna da graduação que se voluntariou para me ajudar. Agradeço pela colaboração, pela disponibilidade, cooperação, e por sempre fazer o seu melhor.

Ao Davi Saba, pelo amor, carinho e por se tornar meu porto seguro.

A todos os colegas e técnicos do Engebio, LCP e Central de Análises, pela amizade e companheirismo.

À CAPES e PPGEAL-UFSC, pelo apoio financeiro e disponibilização da infraestrutura, respectivamente.



Não sou nada.  
Nunca serei nada.  
Não posso querer ser nada.  
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.

(Fernando Pessoa)





## RESUMO

Lipases de *Thermomyces lanuginosus* apresentam um papel importante na indústria química e de alimentos. A lipase NS-40116 é uma nova lipase produzida a partir de *Thermomyces lanuginosus*, e será lançada no mercado com baixo custo em relação às lipases já comercializadas. A imobilização desta enzima em um suporte inerte, de baixo custo, que aumente sua estabilidade em diferentes condições de processo, e que permita sua reutilização, aparece como uma alternativa aos métodos de imobilização já existentes. Com o objetivo de conhecer o melhor método de interação entre partículas de poliestireno e a lipase NS-40116, diferentes métodos de imobilização foram estudados: adsorção ao suporte, retenção física em matriz, e ligação covalente pelo tratamento das partículas com glutaraldeído. Foram empregados dois métodos de polimerização para a produção do suporte. Na polimerização por suspensão em pérola foram utilizados estireno, polivinilpirrolidona e Trigonox® 141 como iniciador. O outro método foi a polimerização em emulsão através de estireno, álcool polivinílico, divinil benzeno, Span 80 e Trigonox® 141 como iniciador. O derivado com melhor atividade (7,96 U/g) foi obtido pela imobilização por adsorção ao suporte (partículas obtidas da polimerização em emulsão). A retenção física em matriz através da polimerização em suspensão resultou num derivado com atividade de 2,87 U/g, sendo que esta enzima foi escolhida para as posteriores caracterizações e aplicações, devido ao seu tamanho, que facilitou sua recuperação na síntese de ésteres metílicos a partir de gordura abdominal de frango. A caracterização das superfícies do suporte e da enzima imobilizada foi realizada por microscopia eletrônica de varredura. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (EITF) também foi realizada para caracterizar a enzima livre, o suporte e enzima imobilizada. A atividade enzimática foi medida por hidrólise utilizando *p*-NPP (*p*-nitrofenil palmitato) como substrato. A enzima livre e o derivado enzimático imobilizado foram avaliados por 2 h em diferentes pHs (2,1, 3, 3,43, 4,75, 7, 8, 9, 10, 11 e 12), temperaturas (30, 40, 50, 60, 65 e 75 °C), e solventes (metanol, etanol, hexano e propanol). Os parâmetros cinéticos das duas enzimas ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) foram obtidos através do sistema gráfico de Lineweaver & Burk. Para a estabilidade ao armazenamento, as enzimas foram monitoradas por 106 dias em temperatura ambiente, e 122 dias sob refrigeração (6 °C). O derivado imobilizado foi eficazmente utilizado na produção de ácidos graxos livres a partir do óleo de soja, bem como apresentou potencial de aplicação em reações de transesterificação e esterificação utilizando gordura abdominal

de frango como substrato. Na hidrólise do óleo de soja, o derivado demonstrou estabilidade operacional após cinco ciclos de uso.

**Palavras-chave:** Imobilização; Lipase NS-40116; Reuso; Esterificação.

## ABSTRACT

Lipases B from *Thermomyces lanuginosus* has an important role in chemical and food industry. The lipase NS-40116 is a novel lipase produced from *Thermomyces lanuginosus*, and it will be launch in the market with low cost in relation to lipases already commercialized. The immobilization of the enzyme on an inert support, low cost, to increase its stability under different process conditions, and allows their reuse is an alternative to existing methods of immobilization. With the aim of knowing the best method to interact polystyrene particles and lipase NS-40116, different methods of immobilization were studied: support adsorption, entrapment and covalent bond by treating the particles with glutaraldehyde. Two polymerization methods were used for the production of the support. In the pearl suspension polymerization were used styrene, polyvinylpyrrolidone and Trigonox<sup>®</sup> 141 was used as the initiator. The other method was emulsion polymerization through styrene, polyvinyl alcohol, divinyl benzene, Span 80 and Trigonox<sup>®</sup> 141 as the initiator. The highest enzyme activity (7.96 U/g) was obtained in support adsorption method. The entrapment through suspension polymerization resulted in a derivative with activity of 2.87 U/g, and this enzyme was chosen for the later characterizations and applications, due to its size, than facilitated its recovery in the synthesis of methyl esters from chicken abdominal fat. The characterization of the surfaces of the support and immobilized enzyme was performed by scanning electron microscopy. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was also performed to characterize the free enzyme, the support and immobilized enzyme. The enzymatic activity was measured by hydrolysis of *p*-NPP (4-nitrophenyl palmitate) as substrate. The free enzyme and immobilized enzyme derivative were evaluated during 2 h at different pHs (2.1, 3, 3.43, 4.75, 7, 8, 9, 10, 11 and 12), temperatures (30, 40, 50, 60, 65 and 75 °C), and solvents (methanol, ethanol, hexane and propanol). The kinetic parameters of the two enzymes ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) were obtained through the Lineweaver & Burk graph system. For storage stability, the enzymes were monitored for 106 days at room temperature, and 122 days under refrigeration (6 °C). The immobilized derivative was effectively used in the production of free fatty acids from soybean oil, and also showed application potential in transesterification and esterification reactions using chicken abdominal fat as substrate. In the hydrolysis of soybean oil, the derivative demonstrated operational stability after five cycles of use.

**Keywords:** Immobilization; Lipase NS-40116; Reuse; Esterification.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema estrutural da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> . .....	32
Figura 2 – Métodos de imobilização de enzimas. ....	35
Figura 3 – Fórmula estrutural geral do poliestireno. ....	38
Figura 4 – Fórmula estrutural de iniciadores utilizados para polimerização do estireno. (a) peróxido de benzoíla. (b) 2,5-Dimethyl-2,5-di(ethylhexanoylperoxy)hexane, que foi utilizado neste trabalho. ....	39
Figura 5 – Representação esquemática da polimerização via radicais livres (radicalar) do estireno. ....	39
Figura 6 – Hidrólise sequencial dos grupos acila no acilglicerol, catalisada por lipases. ....	42
Figura 7 – Equação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo. .....	43
Figura 8 – Esquema simplificado de produção de ésteres por hidroesterificação. ....	45
Figura 9 – Reator encamisado utilizado na etapa de polimerização das partículas. ....	53
Figura 10 – Imagens MEV das partículas sintetizadas via polimerização em emulsão. Antes da imobilização da lipase (a), (b) e (c); após imobilização da lipase por adsorção física (d). ....	71
Figura 11 – Imagens MEV da lipase imobilizada em partículas de poliestireno (polimerização em suspensão em pérola) por retenção física em matriz. ....	72
Figura 12 – Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (EITF) de partículas de PS sintetizadas por polimerização em suspensão. (a) Partículas de poliestireno, (b) Enzima imobilizada nas partículas de poliestireno (PS), e (c) Enzima livre. ....	73
Figura 13 – Atividade relativa para 2 h em diferentes valores de pH, da enzima livre (□) e imobilizada em poliestireno (●). ....	75
Figura 14 – Efeito da temperatura após 2 h de incubação na atividade da lipase livre (□) e lipase imobilizada (●). ....	76
Figura 15 – Estabilidade à temperatura de 50 °C da enzima livre (□) e imobilizada em poliestireno (●) durante 20 h. ....	77
Figura 16 – Influência de solventes orgânicos na atividade hidrolítica de lipases. ....	79
Figura 17 – Estabilidade ao armazenamento das enzimas livre e imobilizada: livre à 6 °C (□), livre à temperatura ambiente (○), derivado	

imobilizado PS à 6 °C (●) e derivado imobilizado PS à temperatura ambiente (■).....	80
Figura 18 – Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja com diferentes concentrações dos biocatalisadores: 1,41 g do derivado imobilizado PS (◆), 5,0 g do derivado imobilizado PS (■), 10,0 g do derivado imobilizado PS (●), 15,0 g do derivado imobilizado PS (▲), e 0,5 g da lipase NS-40116 livre (□).....	81
Figura 19 – Estudo de reutilização da lipase imobilizada.....	83
Figura 20 – Imagens MEV da lipase imobilizada após sucessivos ciclos de uso na hidrólise do óleo de soja. ....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens da transesterificação enzimática. ....	44
Tabela 2 – Formulação da polimerização em suspensão em pérola. ....	52
Tabela 3 – Formulação da polimerização em emulsão. ....	54
Tabela 4 – Formulação do procedimento de imobilização por retenção física em matriz. ....	55
Tabela 5 – Efeito da concentração de enzima na atividade enzimática (AE) de lipase imobilizada em partículas de poliestireno por adsorção ao suporte. ....	66
Tabela 6 – Atividade enzimática (AE) dos derivados imobilizados por ligação covalente. ....	67
Tabela 7 – Atividade enzimática (AE) dos derivados imobilizados por retenção física em matriz. ....	68
Tabela 8 – Parâmetros de imobilização. ....	70
Tabela 9 – Parâmetros cinéticos para enzima livre e enzima imobilizada em partículas de poliestireno. ....	74
Tabela 10 – Perfil de ácidos graxos da gordura abdominal de frango. ....	84
Tabela 11– Síntese enzimática de ésteres metílicos por esterificação a partir de duas fontes de ácidos graxos livres. ....	85
Tabela 12 – Síntese enzimática de ésteres metílicos por transesterificação a partir de gordura abdominal de frango. ....	87





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	atividade enzimática
AGL	ácidos graxos livres
CG	cromatógrafo em fase gasosa
DAG	diacilgliceróis
EITF	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GA	glutaraldeído
MAG	monoacilgliceróis
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mL	mililitros
mg	miligrama
Mol	moles
M	molaridade
min	minutos
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -nitrofenil palmitato
PS	poliestireno
PVA	álcool polivinílico
PVP	polivinilpirrolidona
rpm	rotação por minuto
TAG	triacilgliceróis
U/g	unidade de atividade enzimática por grama de amostra
V	volume



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
1.1 OBJETIVOS .....	26
<b>1.1.1 Objetivo geral</b> .....	26
<b>1.1.2 Objetivos específicos</b> .....	27
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>29</b>
2.1 ENZIMAS .....	29
2.2 LIPASES .....	30
<b>2.2.1 Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i></b> .....	32
2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	33
<b>2.3.1 Métodos de imobilização de enzimas</b> .....	35
<b>2.3.2 Imobilização de lipases</b> .....	37
2.4 POLIESTIRENO (PS) .....	38
2.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	41
2.6 SÍNTESE DE ÉSTERES .....	42
<b>2.6.1 Transesterificação</b> .....	42
<b>2.6.2 Hidroesterificação</b> .....	44
2.7 PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL A PARTIR DE GORDURA DE FRANGO .....	46
2.8 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE .....	47
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
3.1 MATERIAL .....	49
<b>3.1.1 Reagentes e enzimas</b> .....	49
3.2 MÉTODOS .....	51
<b>3.2.1 Diálise da enzima</b> .....	51
<b>3.2.2 Síntese das partículas de poliestireno</b> .....	51
<b>3.2.3 Imobilização da lipase NS-40116 em partículas de poliestireno (PS)</b> .....	54

3.2.4 Determinação da atividade hidrolítica .....	56
3.2.5 Determinação do conteúdo de proteína .....	56
3.2.6 Caracterização da lipase NS-40116 livre e imobilizada .....	57
3.2.7 Aplicação da enzima livre e imobilizada na hidrólise do óleo de soja refinado.....	59
3.2.8 Estudo de sucessivos ciclos de uso do derivado enzimático imobilizado em poliestireno PS na hidrólise do óleo de soja refinado .....	60
3.2.9 Caracterização parcial da gordura abdominal de frango e do ácido graxo comercial SGS .....	60
3.2.10 Síntese enzimática de ésteres metílicos por transesterificação .....	61
3.2.11 Síntese enzimática de ésteres metílicos por hidroesterificação .....	62
3.2.12 Quantificação de ésteres metílicos por cromatografia gasosa .....	63
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
4.1 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NS-40116 EM PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO OBTIDAS ATRAVÉS DE POLIMEREZAÇÃO EM SUSPENSÃO EM PÉROLA.....	65
4.1.1 Enzima imobilizada por adsorção ao suporte .....	65
4.1.2 Enzima imobilizada por ligação covalente .....	66
4.1.3 Enzima imobilizada por retenção física em matriz .....	67
4.2 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NS-40116 EM PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO OBTIDAS ATRAVÉS DE POLIMEREZAÇÃO EM EMULSÃO .....	68
4.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROTEÍNA E EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO .....	69
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE NS-40116 LIVRE E IMOBILIZADA .....	70
4.4.1 Morfologia da enzima imobilizada nos diferentes métodos de polimerização .....	70

4.4.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada (EITF) .....	72
4.4.3 Determinação dos parâmetros cinéticos .....	73
4.4.4 Determinação da temperatura e pH ótimos .....	74
4.4.5 Estabilidade à temperatura .....	77
4.4.6 Influência de solventes orgânicos na atividade hidrolítica de lipases .....	78
4.4.7 Estabilidade ao armazenamento .....	79
4.5 APLICAÇÃO DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA NA HIDRÓLISE DO ÓLEO DE SOJA .....	80
4.5.1 Estudo de sucessivos ciclos de uso do derivado enzimático imobilizado em poliestireno PS na hidrólise do óleo de soja refinado .....	82
4.6 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA GORDURA ABDOMINAL DE FRANGO, GORDURA ABDOMINAL DE FRANGO APÓS HIDRÓLISE, E ÁCIDO GRAXO VEGETAL COMERCIAL .....	84
4.6.1 Síntese enzimática de ésteres metílicos .....	85
4.7 APLICAÇÃO DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA NA SÍNTESE DE ÉSTERES METÍLICOS VIA TRANSESTERIFICAÇÃO .....	86
<b>5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>89</b>
5.1 CONCLUSÕES .....	89
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS .....	90
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>91</b>
<b>APÊNDICE A – Determinação do perfil de ácidos graxos</b> .....	<b>109</b>
<b>APÊNDICE B – Determinação dos parâmetros cinéticos</b> .....	<b>111</b>
<b>APÊNDICE C – Cromatograma</b> .....	<b>113</b>



## DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

### IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE NS-40116 EM POLIESTIRENO

Por quê?

- Importância da imobilização de enzimas para aplicação industrial;
- Investigar o uso de poliestireno (suporte de baixo custo) na imobilização da lipase NS-40116;
- Investigar o potencial da lipase imobilizada na produção de ésteres e ácidos graxos livres, tendo como substratos, gordura abdominal de frango e óleo de soja, respectivamente.

Quem já fez?

- Não foram encontrados na literatura trabalhos de imobilização da lipase NS-40116;
- Também não há relatos de aplicação dessa enzima em processos de transesterificação/esterificação em que se utiliza gordura abdominal de frango.

Hipóteses?

- A imobilização da NS-40116 em suporte polimérico obtido via polimerização em suspensão e emulsão pode ser realizada de maneira eficiente?
- De que forma o procedimento de imobilização afeta as propriedades catalíticas e de estabilidade da enzima?
- É possível aplicar o derivado imobilizado em reações de catálise interessantes industrialmente?

Como fazer?

- Aplicar diferentes técnicas de imobilização enzimática;
- Analisar modificações na atividade enzimática;
- Caracterizar as enzimas livre e imobilizada quanto ao pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade ao armazenamento e diferentes substratos.

Resposta

- Determinar quais dos métodos de imobilização resultou em melhor interação enzima-suporte;
- Conhecer as condições ótimas (solvente, pH, temperatura) da enzima imobilizada para facilitar posteriores aplicações;
- Estimar a melhor forma de estocagem das lipases;
- Avaliar a estabilidade operacional (reuso) da lipase imobilizada em reações de hidrólise.





## 1 INTRODUÇÃO

As lipases são as enzimas mais utilizadas na síntese orgânica, sendo aplicadas em inúmeras preparações comerciais, devido a sua ampla especificidade e maior estabilidade (em comparação com outras enzimas) (KAPOOR; GUPTA, 2012). As lipases vêm conquistando uma faixa crescente do mercado global de enzimas. Embora muitas das aplicações industriais destas estejam concentradas nas indústrias de detergentes, novas aplicações estão ganhando destaque, com possibilidades de emprego na indústria farmacêutica, química fina, cosméticos, couros, polpa de celulose e papel, e no tratamento de resíduos industriais (DE CASTRO et al., 2004).

A lipase NS-40116 é uma formulação líquida produzida a partir do cultivo do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* geneticamente modificado, ainda não disponível para comercialização. É apresentada aos pesquisadores como uma enzima específica para matérias-primas de alto teor de ácidos graxos livres (AGL), uma vez que realiza reações de hidrólise, esterificação e transesterificação, e será lançada no mercado com baixo custo em relação às lipases já comercializadas.

A melhoria das propriedades enzimáticas através das técnicas de imobilização é importante em diferentes campos. A imobilização pode aprimorar as propriedades funcionais das enzimas em condições severas, tais como estabilidade, especificidade e atividade. A enzima imobilizada também pode permanecer ativa por longos intervalos de tempo e ser reutilizada várias vezes em reatores industriais (JAFARY et al., 2016; NISHA; KARTHICK; GOBI, 2012).

Há diversos métodos utilizados na imobilização de lipases, incluindo métodos de adsorção (CHEN et al., 2008), ligação covalente (MENG et al., 2014), aprisionamento (KOVALENKO et al., 2013), entre outros. A utilização de um método rápido, fácil, de baixo custo e que apresente resistência a solventes orgânicos aumentaria e facilitaria a aplicação da NS-40116. Dentro deste contexto está o poliestireno (PS), que é um polímero termoplástico, facilmente sintetizado, processado e reciclado, e de baixo custo. Também é relativamente resistente à degradação (COUTINHO et al., 2007).

Dentre as reações de interesse da indústria química e dos ramos de minas e energia, temos a síntese de ésteres. Isso decorre de um cenário problemático envolvendo o petróleo, uma das principais fontes de energia no mundo. O esgotamento de sua reserva, a instabilidade do preço e a instabilidade política que algumas regiões produtoras vivem, aliados à

emissão de gases que agravam o efeito estufa, são fatores que incentivam a pesquisa de novas fontes de energia sustentável (CÉSAR; BATALHA, 2008; ROSSET et al., 2011). Nesse quadro, o interesse na produção de biodiesel aumentou por ser um combustível sustentável e biodegradável, o qual é considerado uma energia alternativa, advinda de fontes renováveis como: óleos vegetais (soja, algodão), óleos vegetais residuais, gorduras animais (bovinos, suínos e frangos), algas, dentre outros. Além dessas vantagens, a produção de biodiesel gera novos empregos na sua cadeia produtiva, enfatizando a sua importância social na comunidade (WIDYAN; SHHYOUKH, 2002).

O processo mais comum para obtenção de ésteres a partir de triacilgliceróis é a transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais. Mais recentemente vem sendo estudado também o processo de hidroesterificação, o qual permite, além da utilização de uma ampla variedade de lipases de baixo valor comercial, o uso de uma maior variedade de matérias primas, incluindo óleos de fritura, óleos de elevada acidez, bem como matérias graxas residuais do processamento de óleos (ZENEVICZ, 2015).

Na literatura, ainda não foram encontrados estudos com a NS-40116 no sentido de imobilizá-la. Considerando a importância tecnológica desta lipase, é de grande valia sua aplicação na forma imobilizada, agregando valor a este biocatalisador, podendo assim, melhorar sua estabilidade, possibilitando ainda sua reutilização. Portanto, com o intuito de contribuir para o avanço da tecnologia de imobilização de enzimas e consolidação de aplicação das lipases, esse trabalho teve como objetivo estudar a imobilização da lipase em partículas de poliestireno através de diferentes métodos de interação enzima-suporte (retenção física em matriz, adsorção física e ligação covalente).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral imobilizar a lipase NS-40116 em poliestireno produzido via polimerização em suspensão e emulsão, avaliar a eficiência dos métodos utilizados, e aplicar a enzima na hidrólise do óleo de soja e na síntese de ésteres metílicos utilizando gordura de frango como substrato.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Testar a imobilização de lipase NS-40116 em poliestireno por diferentes métodos de interação enzima-suporte: retenção física em matriz (PS), adsorção física (PS-E) e ligação covalente através de tratamento prévio com glutaraldeído (PS-GA-E);
- Determinar o melhor método de imobilização dentre os anteriormente citados para dar continuidade aos estudos;
- Caracterizar a enzima livre e imobilizada em relação à temperatura (30, 40, 50, 60, 65 e 75 °C) e ao pH (2,1, 3, 3,43, 4,75, 7, 8, 9, 10, 11 e 12);
- Avaliar o efeito da imobilização na estabilidade térmica;
- Avaliar os parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada;
- Caracterizar os derivados enzimáticos imobilizados em poliestireno por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (EITF);
- Avaliar a estabilidade da enzima livre e imobilizada frente ao armazenamento;
- Avaliar a aplicação da lipase imobilizada na hidrólise do óleo de soja refinado;
- Verificar a capacidade de reutilização da enzima imobilizada na reação de hidrólise do óleo de soja;
- Aplicar a lipase imobilizada na síntese de ésteres metílicos a partir de gordura abdominal de frango através de reações de transesterificação;
- Aplicar a lipase imobilizada na síntese de ésteres metílicos, utilizado como substrato gordura abdominal de frango previamente hidrolisada e ácido graxo comercial SGS, através de reações de esterificação.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão sobre assuntos relevantes para a compreensão e contextualização do trabalho. Na primeira seção será apresentada uma abordagem geral sobre enzimas e, na seção seguinte será discutido mais especificamente sobre as lipases. Na terceira seção serão expostos os principais aspectos relacionados à imobilização de enzimas, e em seguida, o suporte escolhido neste trabalho (poliestireno) será estudado detalhadamente, inclusive suas últimas aplicações na imobilização enzimática. A quinta e sexta seção fala a respeito dos processos de modificação enzimática de óleos e gorduras, como a hidrólise enzimática e os meios de obtenção de ésteres, respectivamente. Por fim, será discutido sobre a promissora obtenção de ésteres utilizando como substrato a gordura abdominal de frango.

### 2.1 ENZIMAS

As enzimas são catalisadores biológicos, de natureza principalmente proteica, que participam de várias reações bioquímicas, tendo como papel fundamental o controle metabólico (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). Os catalisadores aumentam as velocidades de reação, diminuindo as energias de ativação, logo, as enzimas não afetam o equilíbrio de reação (NELSON; COX; LEHNINGER, 2006). Elas viabilizam a atividade das células, quebrando moléculas ou juntando-as para formar novos compostos, sendo extremamente versáteis, estereoespecíficas, e de elevada importância nos processos biotecnológicos (FURIGO; PEREIRA, 2001).

Sua atratividade deve-se a outras propriedades desejáveis que as mesmas possuem:

- Alta estabilidade, alta eficiência catalítica, além de permitir a obtenção de produtos com melhor qualidade quando comparado a outros métodos catalíticos (POLSHETTIWART et al., 2011);
- Possuem mecanismo de “turnover”, desempenhando a mesma função consecutivamente, sem serem consumidas no processo (OGURI, 2007);
- É possível regular a atividade enzimática, pois para isso basta modificar a natureza do meio de reação, alterar o pH ou adicionar suplementos (PIZARRO; PARK, 2003);

- Toda enzima catalisa as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas, comuns em sínteses químicas, devido à sua especificidade (PATEL, 2002).

Essa especificidade significa que cada enzima catalisa um tipo de reação para um dado substrato em particular ou para um pequeno grupo de substratos intimamente relacionados (MARZZOCO; TORRES, 2007). Por exemplo, algumas enzimas são específicas para determinado tipo de ligação química, outras, para um tipo particular de isômero ótico (FURIGO; PEREIRA, 2001). Essa característica é atribuída a uma região denominada sítio ativo. Para que uma molécula seja reconhecida como substrato, ela precisa ter a forma adequada para se acomodar no sítio ativo, além de grupos químicos capazes de formar ligações com os grupos R presentes (NELSON; COX; LEHNINGER, 2006).

A fim de estabelecer um processo de conversão (substrato em produto de interesse), é possível optar por rotas químicas ou enzimáticas. A via química é eficiente e rápida, mas gera resíduos tóxicos que devem ser tratados, aumentando o número de operações e consumindo mais energia, tornando o processo economicamente desfavorável (MISHIMA et al., 2006). Já a via enzimática forma menos subprodutos indesejáveis e utiliza condições mais amenas de temperatura e pressão. Porém, é mais lenta, e apresenta como barreira a construção de processos eficientes e viáveis de produção de enzimas a custo que não inviabilize seu uso (MATOS, 2010).

Um dos principais objetivos da química moderna é o desenvolvimento de um processo químico sustentável. Por isso – apesar dos gargalos anteriormente citados – segundo Villeneuve (2007), o mercado mundial de enzimas cresce a cada dia em diferentes campos de aplicação, tais como, indústria química, farmacêutica, cosmética ou de alimentos. As pesquisas nessa área levaram a uma melhor compreensão do comportamento catalítico das enzimas, e juntamente com a engenharia e biologia molecular, conduziram a novas aplicações de várias enzimas, como por exemplo, proteases, acilases, oxidases, amilases, glicosidases, celulases e lipases.

## 2.2 LIPASES

As lipases pertencem ao grupo das hidrolases, sendo classificadas como glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3). São amplamente

distribuídas na natureza, podendo ser obtidas de fontes animais, vegetais e microbianas (DE CASTRO et al., 2004; GAIS; THEIL, 2002).

Essas enzimas catalisam a quebra de gorduras e óleos, com subsequente liberação de ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. A reação de hidrólise de triacilgliceróis é reversível, podendo forçar a lipase a catalisar o glicerol e os ácidos graxos livres, isso ocorre quando a atividade de água é reduzida (VILLENEUVE et al., 2000).

A catálise ocorre na interface de um substrato insolúvel e da fase aquosa, logo, as lipases atuam sobre moléculas polares e apolares (BORNSCHEUER, 2002). A quantidade de água presente na enzima tem um papel importante para sua atividade catalítica, podendo ser influenciada pela solubilidade da água no meio reacional e pela capacidade de atração de água pelo suporte (no caso das enzimas imobilizadas) (ADLERCREUTZ, 1996).

O teor de água ideal para a atividade máxima da enzima depende do biocatalisador. Um teor de água residual geralmente de 0,5 a 1% (m/v), correspondente a uma atividade de água ( $a_w$ ) de 0,25 a 0,45, é necessário para a atividade catalítica da maioria das lipases (VILLENEUVE, 2007). A quantidade de água ótima, no entanto, pode chegar a valores mais elevados como 11% (m/v) (LI; WARD, 1993; MALCATA et al., 1992).

Contudo, as lipases apresentam atividade catalítica não somente em água, mas também em meios não aquosos (ADLERCREUTZ, 2013; FESSNER; ANTHONSEN, 2008; GAIS; THEIL, 2002; GUPTA, 2000; HUDSON; EPPLER; CLARK, 2005; ROUSSEAU; MARANGONI, 2002). Desta forma, estes biocatalisadores são bastante versáteis (XU, 2004), apresentando potencialidade para aplicação na bioconversão de óleos e gorduras em diferentes processos (VILLENEUVE et al., 2000; PILISSÃO, 2006).

A massa molecular das lipases pode variar entre 20 a 75 kDa, dependendo da origem. Apresentam faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 4 e 9 e temperatura variando de 25 a 70 °C. Porém, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da fonte, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (DE CASTRO et al., 2004; KAPOOR; GUPTA, 2012).

O uso de lipases como catalisadores vem contribuindo para o rápido crescimento da área de síntese orgânica (ANDRADE et al., 2010). A pesquisa nessa área busca a utilização de técnicas de modificação de

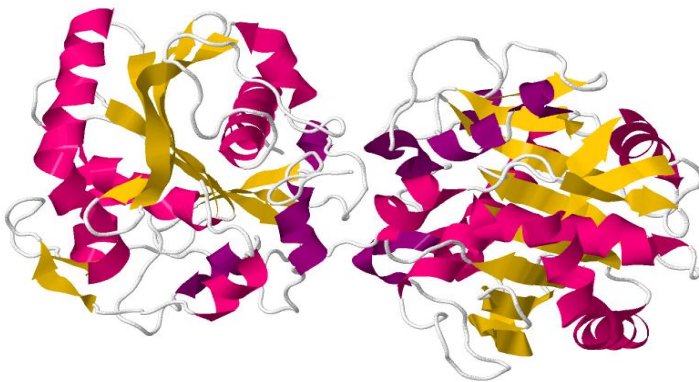
enzimas, novas fontes de lipases, estudo de biorreatores, novos suportes e otimização das condições de reação. Neste contexto, o uso de enzimas imobilizadas é uma das alternativas mais utilizadas para desenvolver catalisadores técnica e economicamente viáveis, já que permite, entre outras vantagens, a recuperação da enzima para reutilização posterior.

### 2.2.1 Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

A lipase NS-40116 é uma formulação líquida produzida a partir do cultivo de um microrganismo geneticamente modificado – *Thermomyces lanuginosus* (PRICE et al., 2016).

Segundo Kumar et al. (2015), a lipase de *Thermomyces lanuginosus* é uma hidrolase que consiste em 269 resíduos de aminoácidos com um peso molecular de aproximadamente 29 kDa. Apresenta pH ótimo entre 11-12. Um esquema da estrutura desta lipase desenvolvido por cristalografia pelo mesmo autor está disponível no banco de dados *ProteinDataBase* (<http://www.rcsb.org/pdb>) e é apresentado na Figura 1. Nela está demonstrada a enzima em seu estado nativo. Seu sítio ativo é composto pela tríade catalítica Ser-Asp-His (SKJOLD-JØRGENSEN et al., 2016).

Figura 1 – Esquema estrutural da lipase de *Thermomyces lanuginosus*.



Fonte: PDB, 2015.



Devido à capacidade inata de lipases para catalisar, inclusive em altas temperaturas, pH alcalino, em solventes orgânicos e em baixas atividades de água, o uso destas enzimas como biocatalisadores industriais é difundida e inclui aplicações dentro de formulação de detergentes, combustíveis, química fina, papel e couro (SKJOLD-JØRGENSEN et al., 2016). No caso da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, a mesma é utilizada em processos de biodiesel, ésteres aromatizantes, lipídeos estruturados, pré-tratamento de efluentes com elevados teores de lipídeos, degradação de polímeros, resolução de misturas racêmicas e na hidrólise seletiva de diferentes óleos e gorduras (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; MENDES et al., 2011a; MENDES et al., 2012).

Considerando a importância tecnológica da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, é de grande valia sua aplicação na forma imobilizada, agregando valor a este biocatalisador, podendo assim, melhorar sua estabilidade, possibilitando ainda sua reutilização. Esta lipase é atualmente comercializada pela Novozymes na forma livre (NS-40116).

## 2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Enzimas são amplamente utilizadas nos alimentos, indústrias energéticas e farmacêuticas devido à sua elevada eficiência catalítica, condições brandas de reação e ausência de poluição (GAO et al., 2013). Há alguns inconvenientes que limitam a aplicação de enzimas livres, tais como baixa estabilidade operacional e dificuldade de recuperação e reutilização do biocatalisador (GROSOVA; ROSENBERG; REBROS, 2008). A imobilização de enzimas é um método potencial para aumentar a estabilidade de enzimas, diminuir o custo e, em consequência, tornar o biocatalisador mais eficiente e amigável ambientalmente (TRAN; BALKUS, 2011).

De acordo com a 1ª Conferência em Engenharia de Enzimas (Henniker, Estados Unidos, 1971), biocatalisadores imobilizados, enzimas ou células, são catalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizadas repetida ou continuamente (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006).

Além da facilidade no manuseio de enzimas imobilizadas, a imobilização permite sua separação do meio reacional, minimizando ou eliminando a contaminação do produto final pela enzima. Além disso, a enzima imobilizada não penetra facilmente na pele, e por isso, exibe baixa ou nenhuma alergenicidade (SHELDON; VAN PELT, 2013). Outra vantagem da imobilização é que esta possibilita o emprego de operação contínua em biorreatores.

Processos de imobilização podem inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém, não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (FRAMPTON; ZELISKO, 2014). Como exemplo de fator que acarreta uma perda de atividade aparente tem-se as restrições difusionais, ou seja, limitações do substrato ao sítio ativo devido à presença da matriz sólida (a enzima fica com sua mobilidade restringida pelo fato de estar ligada a um suporte) (DE CASTRO et al., 2008).

Vários suportes são encontrados na literatura, sendo testados para a imobilização de enzimas mediante diversas técnicas. Quanto à composição química, os suportes são classificados em orgânicos (naturais e sintéticos) e inorgânicos (mineraiis e fabricados). Como exemplo de suportes orgânicos naturais podem ser citados os polissacarídeos (celulose, ágar, quitina, quitosana, amido, entre outros) e as proteínas (colágeno, albumina, gelatina, glúten e seda). Dentre os sintéticos encontram-se o poliestireno, os poliacrilatos, os polivinílicos, o náilon, entre outros. Os suportes inorgânicos mineraiis mais utilizados são: areia, bentonita, homeblenda e pedra-pomes. Dentre os fabricados pode-se citar: vidro, cerâmica e sílica de porosidade controlada, aluminossilicatos, óxido de ferro, óxido de níquel e aços inoxidáveis (DE CASTRO et al., 2008).

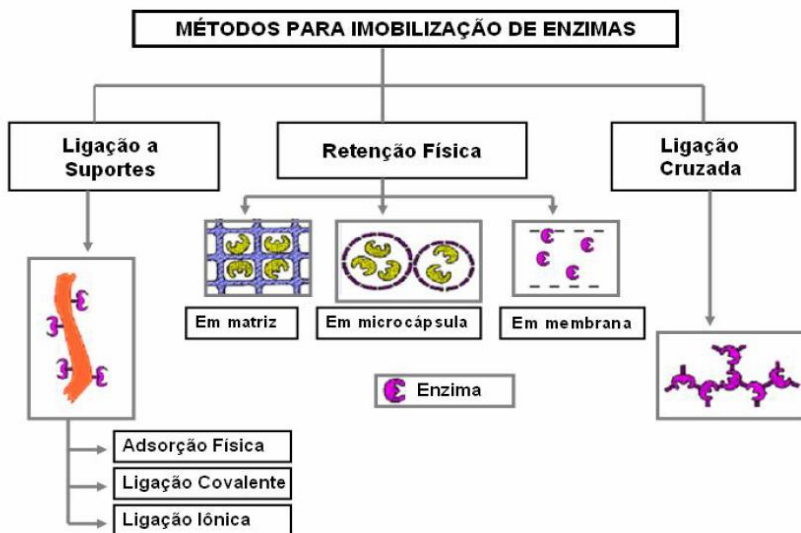
A imobilização de enzimas deve considerar diversos aspectos e integrar o conhecimento em diversas áreas, incluindo enzimologia, reações químicas, ciência dos materiais e superfícies. O desenvolvimento de um processo de imobilização deve almejar os seguintes aspectos: (i) resistência mecânica da enzima imobilizada; (ii) simplicidade do protocolo de imobilização; (iii) possibilidade de acoplar a imobilização com a purificação da enzima; (iv) impacto da imobilização na atividade catalítica; (v) estabilização da enzima através da prevenção de interações intermoleculares pelo enrijecimento estrutural da enzima ou pela prevenção da dissociação de subunidades da enzima; (vi) modulação da

seletividade e/ou especificidade da enzima; (vii) redução dos problemas de inibição (GARCIA-GALAN et al., 2011).

### 2.3.1 Métodos de imobilização de enzimas

Resumidamente, os métodos de imobilização de enzimas podem ser divididos em três categorias: ligação a um suporte, retenção física ou encapsulação, e entrecruzamento ou ligação cruzada. Um esquema é apresentado na Figura 2.

Figura 2 – Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: FISCHER, 2010.

A ligação da enzima a um suporte pode ser de natureza física (interações van der Waals, pontes de hidrogênio ou hidrofóbicas), iônica ou covalente (CAO, 2005). Apesar da simplicidade da ligação por interações físicas, este método é limitado pela tendência de dessorção da enzima do suporte e por ser sensível às condições do ambiente, como temperatura e concentração de íons (GROSOVA; ROSENBERG; REBROS, 2008). Ligações iônicas são geralmente mais fortes e ligações

covalentes previnem que a enzima se solte do suporte. Por outro lado, a imobilização por ligações covalentes tem a desvantagem de que, caso a enzima perca sua atividade, ambos, enzima e suporte, não poderão ser reutilizados em um novo processo de imobilização (SHELDON; VAN PELT, 2013).

A retenção física consiste na inclusão da enzima em uma estrutura polimérica tridimensional que impede sua difusão para fora do polímero. O tamanho dos poros da matriz deve ser tal que permita a passagem dos substratos e dos produtos resultantes da reação, mas não a da enzima (ORDÓÑEZ, 2005). Os suportes mais utilizados são: poli(acrilamida), gelatina, alginato, poliuretano e silanos (SHELDON; VAN PELT, 2013; MENDES et al., 2011b). Eles podem apresentar configurações distintas, como esferas, fibras, etc.

A retenção de enzimas em géis poliméricos insolúveis é feita misturando a enzima em solução com um monômero solúvel. Uma vez realizada a mistura, provoca-se a polimerização e a insolubilização do polímero mediante diversas estratégias. A polimerização apresenta dois riscos para a enzima: os monômeros e os radicais formados durante a reação podem reagir com a enzima e inativá-la; o calor gerado durante a polimerização pode inativar a enzima (ORDÓÑEZ, 2005).

A imobilização por ligação cruzada é livre de suporte, e as enzimas estão ligadas umas às outras, ou a proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura tridimensional complexa. Pode ser obtida via métodos físicos ou químicos. Quando obtidas por métodos químicos são resultantes das ligações covalentes entre as enzimas e são favorecidas pelo uso de agentes bi- ou multifuncionais (CARDOSO et al., 2009).

Uma desvantagem de utilizar enzimas ligadas a suportes, independente do método utilizado, é a introdução de uma grande porção de massa não-catalítica, ou seja, grande parte da massa total não é enzima, geralmente de 90 a 99,9%. Inevitavelmente, isso leva a menores rendimentos de espaço-tempo e menor produtividade (CAO; LANGEN; SHELDON, 2003). Assim, é interessante a utilização de enzimas imobilizadas sem suporte, como os cristais de enzima entrecruzados (ROY; ABRAHAM, 2004) e os agregados enzimáticos entrecruzados (SHELDON, 2011). Estes métodos oferecem vantagens como alta concentração de atividade enzimática no biocatalisador, alta estabilidade e baixo custo já que não é necessária a utilização de um suporte (SHELDON; VAN PELT, 2013).

### 2.3.2 Imobilização de lipases

Em decorrência da crescente aplicação de lipases e o interesse na melhoria catalítica das mesmas, muitos estudos foram desenvolvidos, o que resulta em uma evolução expressiva na publicação de artigos e patentes na área de biocatálise, contribuindo para a competitividade em termos de pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico e aplicações industriais (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

As lipases estão entre as enzimas mais utilizadas em processos de imobilização, devido a sua tendência em se adsorver em suportes hidrofóbicos, característica esta que pode ser utilizada para desenvolver protocolos de imobilização específicos para essas enzimas (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008). Adicionalmente, muitos tipos de suportes e materiais podem ser encontrados na literatura e descritos como eficientes na imobilização de lipases, como a sílica (BLANCO et al., 2004), esferas de vidro (YILMAZ et al., 2011), cerâmicas (KAMORI et al., 2000), quitosana (TANG; QIAN; SHI, 2007), grafeno (REETZ; ZONTA; SIMPELKAMP, 1996; YILMAZ; SEZGIN; YILMAZ, 2011), suportes magnéticos (CHIARADIA et al., 2016; TAN; FENG; JI, 2012) e as microesferas poliméricas (CUI et al., 2012; EL-AASSAR, 2013; PURI; BARROW; VERMA, 2013).

A imobilização de lipases por adsorção, ligação covalente e/ou multifuncional em matrizes poliméricas são apontadas como técnicas promissoras para aplicação em meio orgânico, e muitas vezes, apresentam aumento da atividade e estabilidade da enzima (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Recentes estudos (CIPOLLATI et al., 2015; NYARI et al., 2016; LIMA et al., 2016; NICOLETTI et al., 2015; VALERIO et al., 2015); publicados por nosso grupo de pesquisa confirmam o potencial de polímeros como suporte na imobilização de lipases. No trabalho de Nicoletti et al. (2015), a lipase foi imobilizada em espuma de poliuretano não somente por adsorção e ligação covalente, mas também por incorporação ao suporte, e este derivado apresentou atividade enzimática maior que a enzima livre.

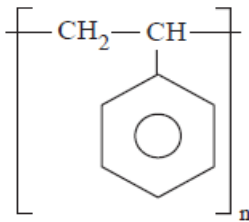
Nesse contexto, o poliestireno também pode ser estudado nos processos de imobilização, pois apresenta certas características que devem ser consideradas na escolha de um suporte: resistência ao ataque microbiano (ALBERTSSON; HUANG, 1995), insolubilidade, tamanho e

forma moldáveis, capacidade de reutilização, facilidade de manuseio e baixo custo.

## 2.4 POLIESTIRENO (PS)

O PS é um polímero vinílico, sendo uma cadeia hidrocarbônica com um grupo fenila unido a um dos carbonos do grupo vinila. Este é produzido a partir do estireno através de polimerização via radicais livres e sua fórmula estrutural está representada na figura 3 (BILLMEYER JR, 1984).

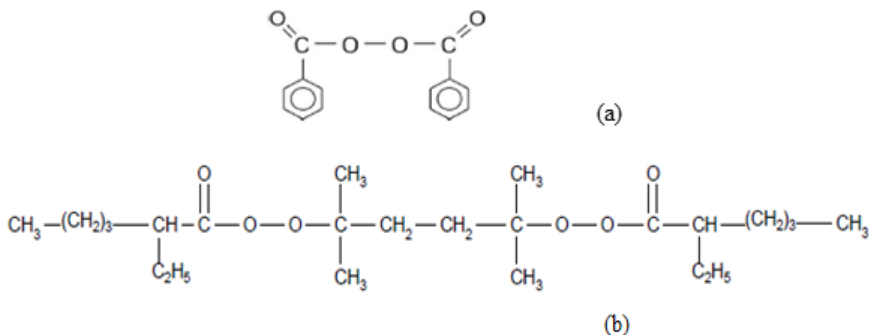
Figura 3 – Fórmula estrutural geral do poliestireno.



Fonte: EBEWELE, 1996.

A polimerização vinílica via radicais livres do monômero estireno é ativada por um iniciador, por exemplo, o peróxido de benzofila ou o 2,5-Dimethyl-2,5-di(ethylhexanoylperoxy)hexane (Trigonox<sup>®</sup> 141) cujas fórmulas estruturais estão representadas na figura 4.

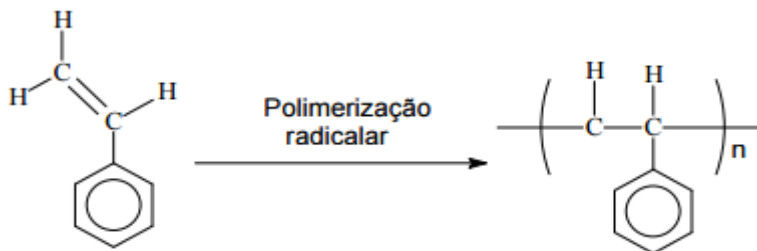
Figura 4 – Fórmula estrutural de iniciadores utilizados para polimerização do estireno. (a) peróxido de benzofla. (b) 2,5-Dimethyl-2,5-di(ethylhexanoylperoxy)hexane, que foi utilizado neste trabalho.



Fonte: SARKIS, 2009; AKZONOBEL, 2008.

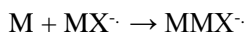
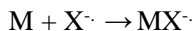
A reação de polimerização, do tipo radicalar, é iniciada assim que os radicais livres primários resultantes da decomposição térmica do iniciador são formados. A figura 5 representa simplificada esta reação.

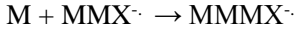
Figura 5 – Representação esquemática da polimerização via radicais livres (radicalar) do estireno.



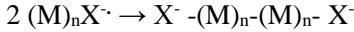
Fonte: HALMA, 2008.

Segundo Halma (2008), as moléculas de monômero M, dissolvidas em água, reagem com os radicais livres  $X^\cdot$  do iniciador, formando radicais  $(M)_nX^\cdot$  que vão crescendo a partir de adições sucessivas de moléculas de monômero:





Estes oligômeros se tornam cada vez mais hidrofóbicos à medida que a cadeia se alonga. Eles podem se associar e formar micelas e se adsorver na superfície de uma gota de monômero, ou se combinar para formar uma cadeia polimérica:



O polímero cresce até o consumo total dos monômeros dissolvidos. A reação termina uma vez que todo o monômero é polimerizado na forma de esferas. O diâmetro das esferas normalmente varia de 100 nanômetros a vários micrômetros. Por exemplo, uma esfera de 100 nm de diâmetro contém em torno de 1000 macromoléculas associadas em espiral, cada uma começando e terminando por um grupo funcional resultante do iniciador (SCHRODEN; STEIN, 2004).

As principais características do poliestireno são: alta temperatura de transição vítrea, transparência, facilidade de processamento, estabilidade térmica, alto módulo de elasticidade, excelentes propriedades elétricas e baixo custo (VERONESE, 2003). Levando em consideração esses atributos, e o fato de que a hidrofobicidade dos suportes para a imobilização de lipases tem grandes efeitos sobre as propriedades de atividade/estabilidade dessas enzimas (DIZGE; KESKINLER; TANRISEVEN, 2009), nota-se que na literatura são encontrados alguns estudos sobre imobilização utilizando este polímero.

O poliestireno foi utilizado para a imobilização de lipase de *Candida Antarctica B* na forma de nanopartículas, apresentando atividade catalítica superior à da enzima livre e da lipase comercial Novozym 435 (MILETIC' et al., 2010). Li et al. (2010) analisaram a influência do diâmetro de macroporos (30-40  $\mu\text{m}$ ) de poliestireno sobre a atividade catalítica e parâmetros cinéticos na imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*. Lima et al. (2015) testou o poliestireno como suporte na imobilização de lipase de *Pseudomonas fluorescens* a fim de utilizar o biocatalisador em processo de etanólise de óleos de soja e babaçu em sistemas livres de solventes. No trabalho de Dizge; Keskinler; Tanriseven (2009) foi produzido um copolímero de estireno-divinilbenzeno. Este foi utilizado para imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* por adsorção física e ligação covalente, os quais apresentaram 60% e 85% de rendimento de imobilização, respectivamente. Há destaque também para o estudo de Zhao et al. (2013), que mostrou que a cinética de adsorção de lipase em pérolas de resina de poliestireno pode ser significativamente afetada pela razão resina:lipase.



## 2.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

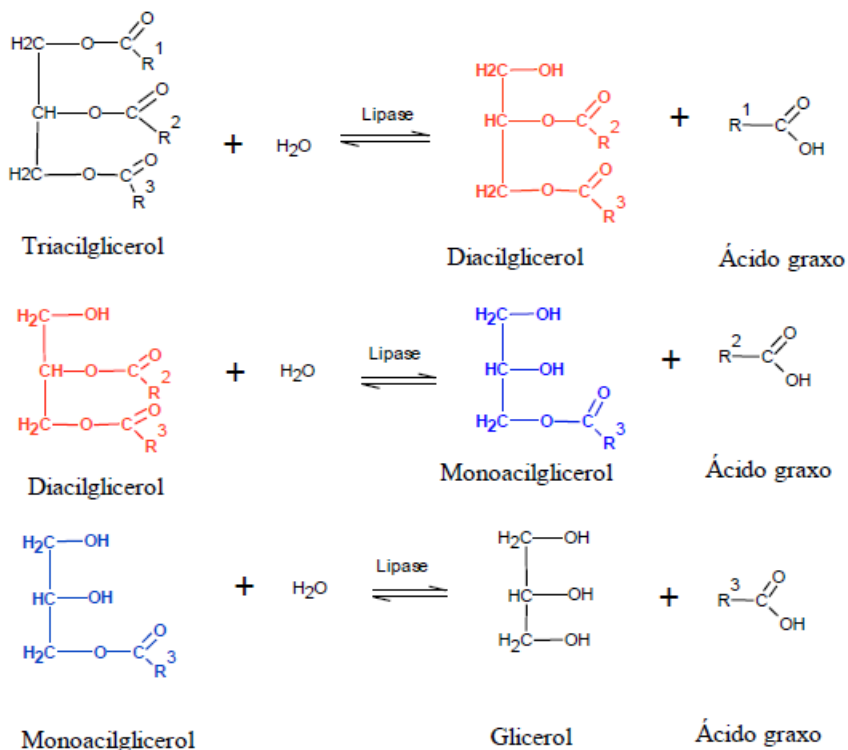
Os óleos e gorduras são substâncias hidrofóbicas (insolúveis em água) que pertencem à classe química dos lipídeos, podendo ser de origem animal, vegetal ou microbiana. Os lipídeos são uma classe abundante na natureza, sendo constituída por diversos compostos químicos, sendo os mais importantes os ácidos graxos livres e seus derivados, como acilgliceróis e fosfatídeos (RAMOS et al., 2017).

Nos últimos anos tem surgido um crescente interesse na tecnologia de modificação dos óleos e gorduras. Esta tendência pode ser atribuída principalmente ao fato desses materiais serem empregados como importantes matérias-primas para as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias (DE CASTRO et al., 2004). Por exemplo, os ácidos graxos são utilizados num significativo número de produtos de alto valor agregado como revestimentos, colas, óleos lubrificantes, xampus e outros produtos de cuidados pessoais (MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002).

Nesse contexto, uma das tecnologias bastante difundida é a hidrólise de óleos e gorduras, que tem como finalidade produzir ácidos graxos livres, acilgliceróis parciais e glicerol (GIOIELLI et al., 1995). Esta reação pode ser catalisada utilizando lipase, base ou ácido, apesar de também ocorrer sob condições específicas de pressão e temperatura. O processo tradicional de hidrólise do triacilglicerol (TAG) exige uma temperatura de 250 °C ou mais, e uma pressão de quase 4,82 MPa para alcançar alta conversão (98%). Assim, esse processo é notavelmente excessivo em energia. Visando reduzir o consumo de energia e diminuir a degradação térmica dos produtos, os pesquisadores desenvolveram uma alternativa, a hidrólise catalisada por enzimas, que ocorre à temperatura ambiente (POURZOLFAGHAR et al., 2016). Desse modo, a hidrólise enzimática geralmente é realizada sob condições mais brandas e leva à obtenção de produtos mais específicos (BEUVE; MORISON, 2010).

A hidrólise parcial tem como intermediários DAG e MAG, que consistem em TAG sem um ou dois ácidos graxos, respectivamente. Diversos fatores definem se a reação será completa ou não, como o tempo de reação e a disponibilidade de reagentes para a conversão completa (DE CASTRO et al., 2004). A Figura 6 mostra as etapas de reação de hidrólise de triacilglicerol.

Figura 6 – Hidrólise sequencial dos grupos acila no acilglicerol, catalisada por lipases.



Fonte: DE CASTRO et al., 2004.

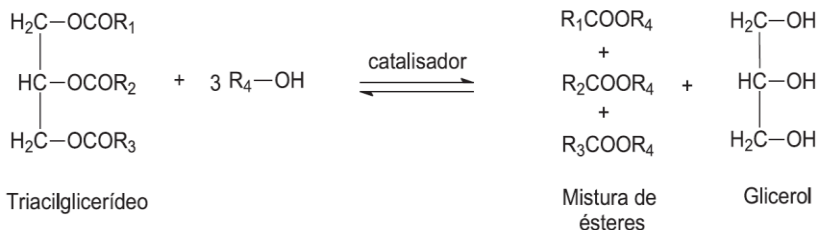
## 2.6 SÍNTESE DE ÉSTERES

### 2.6.1 Transesterificação

O processo mais comum para obtenção de ésteres a partir de triacilgliceróis é a transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais. Nesta reação, um triacilglicerol reage com um álcool na presença de um catalisador, produzindo uma mistura de ésteres de ácidos graxos e glicerol (GUAN et al., 2009), conforme esquematizado na Figura 7. O processo

geral é uma sequência de três reações consecutivas, na qual mono e diacilgliceróis são formados como intermediários.

Figura 7 – Equação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo.



Fonte: GERIS et al., 2007.

A catálise da reação pode se dar via química (ácida ou alcalina), via enzimática (enzima – lipases) ou supercrítica (GUAN et al., 2009). Para uma transesterificação estequiométrica completa, uma proporção molar 3:1 de álcool por triacilglicerol é necessária. Entretanto, devido ao caráter reversível da reação, o agente transesterificante (álcool) geralmente é adicionado em excesso, contribuindo assim, para aumentar o rendimento do éster, bem como permitir a sua separação do glicerol formado (GERIS et al., 2007). Os álcoois metanol e etanol são os mais utilizados na produção de ésteres, pois são álcoois de cadeia curta, polares, e de baixo custo (HELWANI et al., 2009).

Contudo, o metanol é preferível na maioria dos países devido à redução dos custos no processo (pois consome menos energia) e às suas vantagens físicas e químicas (polaridade, álcool de cadeia mais curta se comparado ao etanol, reage rapidamente com o triacilglicerol e dissolve facilmente o catalisador básico) (LEUNG; WU, LEUNG, 2010; STAMENKOVIC; VELICKOVIC; VELJKOVIC, 2011). Além disso, permite uma maior facilidade na separação dos produtos (ésteres e glicerol) (SILVA et al., 2014). A mesma reação usando etanol é mais complicada, pois requer um álcool anidro, bem como um óleo com baixo teor de água para levar à separação do glicerol (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998). Dessa forma, a produção nacional de biodiesel é feita quase em sua totalidade utilizando metanol, que torna o processo mais barato (SILVA et al., 2014).

A transesterificação utilizando enzimas como catalisadores surgiu a fim de substituir e minimizar os problemas ambientais causados pelos

catalisadores químicos. A Tabela 1 apresenta as vantagens e desvantagens da transesterificação enzimática.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens da transesterificação enzimática.

<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Baixo gasto de energia;	Alto preço das enzimas;
Reação ocorre na presença de ácidos graxos livres e de água;	Alta concentração de álcool pode inativar as enzimas;
Reutilização das enzimas, quando na forma imobilizada;	Tempo de reação longo.
Condições brandas de temperatura, pH e pressão;	
Fácil purificação;	
Tecnologia limpa;	
Alto rendimento;	
Não há formação de sabão no sistema.	

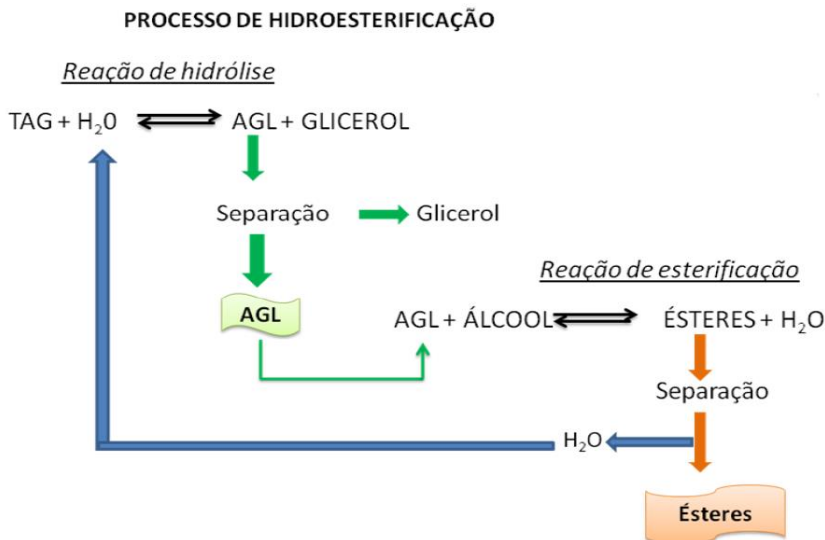
Fonte: SILVA, 2014.

## 2.6.2 Hidroesterificação

O processo de hidroesterificação é uma interessante alternativa para a produção de ésteres, pois permite o uso de qualquer matéria-prima graxa (gordura animal, óleo vegetal, óleo de fritura usado, borras ácidas de refino de óleos vegetais, entre outros) independente da acidez e da umidade que possuem (ZENEVICZ et al., 2016).

A hidroesterificação consiste basicamente de duas etapas: hidrólise seguida de uma reação de esterificação. Um dos primeiros passos para a obtenção de derivados químicos de óleos vegetais é a hidrólise, que como já foi mencionado, conduz a glicerol, mono e diacilglicerol e uma mistura de ácidos graxos (ENCARNAÇÃO, 2008). Na Figura 8 se encontra o esquema simplificado da produção de ésteres por hidroesterificação.

Figura 8 – Esquema simplificado de produção de ésteres por hidroesterificação.



Fonte: ZENEVICZ, 2015.

Após a hidrólise, o glicerol é removido e os ácidos graxos gerados são esterificados com metanol ou etanol, obtendo-se o metil ou etil éster com elevada pureza. Na reação também se obtém, como subproduto, a água, que pode retornar para o processo de hidrólise (ZENEVICZ et al., 2016).

Como já foi discutido anteriormente, a hidrólise de óleos é feita tradicionalmente utilizando um catalisador químico a alta temperatura e pressão (250 °C e 70 bar) (MURTY et al., 2002). Nestas condições, reações indesejáveis podem ocorrer, como oxidação, desidratação dos ácidos graxos livres, ou interesterificação dos triglicerídeos (MURTY et al., 2002; ROONEY; WEATHERLEY, 2001). Por outro lado, as reações de hidrólise catalisadas por lipases podem ser realizadas a temperaturas mais baixas (fator que gera economia de energia), exibe uma alta seletividade que leva à alta qualidade dos produtos, que por sua vez terão menos compostos secundários de reação (HASAN; SHAH; HAMEE, 2006; SHARMA; GANGAL; RAUF, 2009).

## 2.7 PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL A PARTIR DE GORDURA DE FRANGO

O biodiesel, nome genérico dado a combustíveis e aditivos derivados de fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais, é uma aposta para o futuro em duas direções. Uma delas visa minimizar o impacto da redução na oferta do petróleo sobre a economia. A segunda é ambiental, já que o biodiesel é bem menos poluente. Após várias oscilações nos preços do petróleo e derivados, percebeu-se a necessidade de fontes energéticas alternativas (CENTENARO; FURLAN; SOUZA-SOARES, 2008).

A utilização de uma matéria-prima de baixo custo e em abundância ganhou atenção devido à redução total dos custos de produção do biodiesel. Os resíduos de óleos de cozinha e gorduras animais são matérias-primas atraentes porque são duas ou três vezes mais baratas do que os óleos vegetais refinados e estão disponíveis em abundância para atender a demanda de mercado para a produção de biodiesel (SHIN et al., 2012).

A gordura abdominal de frango corresponde a aproximadamente 2 a 2,5% do peso total da ave abatida. Esta gordura pode ser aproveitada como um ingrediente na fabricação de rações e embutidos, pois apresenta altos teores de ácido oleico, palmítico e linoleico. Contudo, os pequenos abatedouros a descartam, juntamente com as vísceras, penas e sangue, contribuindo, desta forma, com o aumento dos dejetos lançados na natureza (CHIU; GIOIELLI, 2002). A utilização deste material gorduroso para produção de ração animal, sabão, ou como fonte para produção de energia, como o biocombustível, aparece como uma excelente alternativa para a indústria, com grande apelo quando relacionado à preservação do meio ambiente (CENTENARO; FURLAN; SOUZA-SOARES, 2008).

Na literatura são relatados alguns estudos sobre a promissora obtenção de ésteres utilizando gordura de frango como substrato. Shi et al. (2013) desenvolveram um sistema composto de membranas e metóxido de sódio como catalisador, pelo qual conseguiram obter um rendimento de conversão de 98,1% ao final da transesterificação. Marulanda; Anitescu; Tavlarides (2010) investigaram a transesterificação em condições supercríticas, atingindo na condição ótima (400 °C, 200 bar, razão molar metanol:gordura 6:1, 6 min de tempo de residência) 88% de rendimento. Alptekin; Canakci; Sanli (2014) estudaram o óleo de milho, gordura de frango, e gorduras de carcaças de animais na transesterificação metanólica utilizando catalisador químico alcalino. Porém, foi necessário

fazer um pré-tratamento nas gorduras de animais para reduzir o nível de ácidos graxos livres para menos de 1%. A partir de então, realizou-se a transesterificação, onde foi alcançado um rendimento de 81,5% para gordura de frango. Pesquisadores da EMBRAPA (2012) fizeram testes preliminares com resíduos de gordura utilizando um catalisador ácido, e em 2h de reação foi obtido 90,3% de conversão em ésteres.

Frente ao exposto, nota-se que, se a gordura de frango for corretamente explorada, a mesma pode se constituir numa matéria-prima favorável para a produção de ésteres. No que tange à essa “exploração”, a rota enzimática também deve ser testada e seus resultados comparados e estudados, a fim de fornecer a possibilidade de escolha do sistema que mais se aproxima do ecologicamente correto e economicamente viável.

## 2.8 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

Com base no exposto ao longo deste capítulo, pode-se verificar que as enzimas têm grande potencial em aplicações industriais. Enzimas imobilizadas, idealmente, devem ser recuperadas e reutilizadas facilmente, o que significa um melhor processo de custo-benefício.

Nesse contexto, vários suportes são relatados no estudo da imobilização de enzimas visando aumentar a sua estabilidade para aplicação em processos industriais, dentre estes o poliestireno. A utilização de poliestireno para imobilização de lipases tem sido reportada com êxito em estudos como o de Wang et al. (2015) e Miletic´ et al. (2010). Porém, essas imobilizações foram feitas posteriormente à polimerização, através de adsorção física ou ligação covalente. Apesar desses métodos serem eficientes, o procedimento de imobilização se torna demorado por causa da sucessão de etapas (síntese das partículas, preparação e/ou modificação das partículas, imobilização da enzima). Em decorrência, o custo também pode aumentar. Este trabalho além de estudar as técnicas anteriormente citadas, busca ainda uma forma mais prática de imobilização, como a técnica de retenção física ou incorporação ao suporte, em que enzima imobilizada e polímero são preparados simultaneamente.

A partir do levantamento dos trabalhos relevantes sobre imobilização de lipases em poliestireno discutidos ao longo do capítulo, nota-se também que a lipase foi imobilizada na maioria das vezes em nano ou micropartículas. Caso a enzima seja imobilizada em uma macropartícula, conseqüentemente poderá ser utilizada numa maior gama de aplicações. Assim, esse é mais um diferencial deste estudo, pois a

lipase foi imobilizada em duas partículas de tamanhos diferentes (se enquadram em macro e micro).

Além de tudo, a lipase utilizada neste trabalho (NS-40116) ainda não foi mencionada na literatura em processos de imobilização. Tendo como base sua importância tecnológica, é de grande valia sua forma imobilizada, pois possibilita o reuso, uma maior flexibilidade no projeto de reatores, além de poder ser utilizada em sistemas contínuos. Assim, o presente trabalho aborda a imobilização de NS-40116 em partículas de poliestireno visando contribuir com o desenvolvimento e consolidação da tecnologia enzimática.



## 3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos os materiais e métodos adotados para a realização dos experimentos, assim como os procedimentos laboratoriais utilizados. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO), Laboratório de Controle de Processos (LCP) e Central de Análises, todos pertencentes ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A determinação do perfil de ácidos graxos da gordura abdominal de frango foi realizada no Laboratório de Grasas y Aceites da Faculdade de Química da Universidade La Republica (UDELAR), no Uruguai.

### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 Reagentes e enzimas

Foram utilizados os seguintes reagentes para a polimerização do estireno e imobilização da enzima:

- Lipase NS-40116: Trata-se de uma formulação líquida produzida a partir do cultivo de *Thermomyces lanuginosus* geneticamente modificado. Foi gentilmente cedida pela Novozymes Brasil/Araucária-PR;

- Água deionizada;
- Água destilada;
- Estireno: Fornecido pela Termotécnica Ltda, adquirido da Innova S.A.;
- Polivinilpirrolidona (PVP):  $M_v = 360.000 \text{ g mol}^{-1}$ , grau técnico, fornecido pela Termotécnica Ltda;
- Glutaraldeído P.S. (sol. 25% em  $\text{H}_2\text{O}$ ) (Vetec);
- Trigonox<sup>®</sup> 141: utilizado como iniciador nas reações de polimerização (AkzoNobel);
- Span 80;
- Divinil benzeno (Deltech Corporation);
- Álcool polivinílico (PVA): 80% hidrolisado (Polysciences, Inc.).

Para as reações de transesterificação, hidrólise e esterificação, foram utilizados:

- Água destilada;

- Álcool metílico 99,8% (Vetec);
- Gordura abdominal de frango gentilmente cedida pela companhia de alimentos BRF S.A., unidade de Chapecó - SC. Em temperatura ambiente, permanece no estado líquido;
- Óleo de soja Soya (Bunge Alimentos S.A.);
- Lipase NS-40116;
- Novozym 435: Produzida a partir da lipase de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica, pela Novozymes Brasil/Araucária-PR. A enzima atua randomicamente nas 3 posições do triacilglicerol. O produto é constituído por partículas de formato esferoidal, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm, e densidade de aproximadamente 430 kg/m<sup>3</sup>. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 40-70 °C (NOVOZYMES);

- Lipozyme TL IM: Lipase do fungo geneticamente modificado *Thermomyces lanuginosus* (TL), produzida em fermentação submersa, purificada e imobilizada em sílica. É uma lipase 1,3-específica, isto é, hidrolisa apenas ésteres de ácidos graxos primários, na posição 1,3 do triacilglicerol. Possui tamanho de partícula entre 0,3 e 1,0 mm e densidade média de 400 kg/m<sup>3</sup>. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 30-70 °C (NOVOZYMES);

- NS 88011: Lipase de *Candida antarctica* imobilizada em uma resina polimérica hidrofóbica (NOVOZYMES);

- Hexano (99,5 % de pureza, Lafan) (usado na lavagem do catalisador);

- Álcool isopropílico (P.A, Vetec) (usado na lavagem do catalisador);

- Ácido graxo produzido na etapa de hidrólise da gordura de frango (sólido à temperatura ambiente);

- Ácido graxo vegetal comercial (lote: PA 8060.009 D14) produzido por SGS Agricultura e Indústria Ltda, de Ponta Grossa-PR. Em temperatura ambiente, permanece semi-sólido.

Foram utilizados os seguintes reagentes para as determinações da atividade hidrolítica das enzimas:

- *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) (Sigma-Aldrich);
- Solução tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7;
- Etanol (95 % de pureza, Vetec);
- Hidróxido de sódio (Vetec).

As soluções tampões utilizadas na determinação do pH ótimo foram:

- Solução tampão ácido fosfórico/fosfato de potássio pH 2,1 0,05 M;
- Solução tampão ácido fosfórico/fosfato de potássio pH 3;
- Solução tampão ácido acético/acetato de sódio pH 3,43;
- Solução tampão ácido acético/acetato de sódio pH 4,75 0,05 M;
- Solução tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7;
- Solução tampão fosfato de potássio pH 8 0,05 M;
- Tampões pH 9 e 10 de ácido bórico/cloreto de potássio (Neon);
- Tampão pH 11 de ácido bórico/cloreto de potássio (Lafan);
- Tampão pH 12 de fosfato dissódico/hidróxido de sódio (Neon).

Para a determinação do teor de ácidos graxos livres das amostras (Teor de AGL (%), (m/m)) e índice de acidez (mg KOH/g) foram utilizados:

- Hidróxido de potássio (Vetec);
- Hidróxido de sódio perolado P.A. (LAFAN)
- Etanol (95 % de pureza, Vetec);
- Etanol: Éter etílico (1:1 v/v) (95 % de pureza, Vetec);
- Fenolftaleína.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Diálise da enzima

Em algumas tentativas de imobilização foi utilizada a enzima dialisada. A finalidade do procedimento é a remoção de estabilizantes e possíveis impurezas do preparado comercial. A diálise foi realizada em solução tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, por 48 h. Após, a enzima foi congelada (-80 °C), liofilizada por 24 h e armazenada sob refrigeração (4 °C) para posteriores reações.

### 3.2.2 Síntese das partículas de poliestireno

Duas técnicas de polimerização do estireno foram empregadas para as posteriores imobilizações. Primeiramente, será reportado a síntese de partículas de poliestireno por suspensão em pérola, em que, através desse método, a lipase foi imobilizada por adsorção física, ligação covalente, e retenção física em matriz. O segundo método baseia-se em uma polimerização em emulsão, no qual as partículas obtidas foram utilizadas em imobilização por adsorção física.

### 3.2.2.1 Síntese de partículas de poliestireno por suspensão

Este procedimento baseou-se na polimerização em suspensão em pérola. A fase dispersa foi formada pelo monômero e o iniciador (Trigonox® 141, 5% em massa em relação ao monômero), sendo a fase contínua a água acrescida do agente de suspensão polivinilpirrolidona (PVP) (3% em massa em relação à fase aquosa). A formulação é apresentada na Tabela 2.

A reação foi conduzida em reator encamisado com agitação magnética (figura 9) durante aproximadamente 4,5 horas. Primeiramente, a fase aquosa e a fase dispersa foram adicionados ao reator sob agitação de 350 rpm, procedeu-se então ao aquecimento até 70 °C. A essa temperatura o agente de suspensão foi adicionado, e manteve-se a mesma constante até a formação das partículas na suspensão, com o subsequente término do processo de polimerização. As partículas foram filtradas a vácuo, lavadas com água quatro vezes e secas à temperatura ambiente.

Tabela 2 – Formulação da polimerização em suspensão em pérola.

<b>Componente</b>	<b>Massa (g)</b>
Estireno	46,35
Água destilada	120
PVP	3,6
Iniciador	2,32

Figura 9 – Reator encamisado utilizado na etapa de polimerização das partículas.



Fonte: Acervo da autora.

### 3.2.2.2 Síntese de partículas de poliestireno através de polimerização em emulsão

Este método foi adaptado do trabalho de Zhou et al. (2007), que resulta na síntese de partículas de poliestireno através de uma emulsão. A mistura do monômero (estireno), divinil benzeno, Span 80 e iniciador Trigonox® 141 se constituiu na fase dispersa (fase monomérica). Água e o estabilizante álcool polivinílico (PVA) formaram a fase contínua (Tabela 3).

A reação foi conduzida em reator encamisado com agitação magnética durante aproximadamente 4,5 horas. Primeiramente, a fase aquosa e a fase dispersa foram adicionados ao reator sob agitação de 350 rpm, procedeu-se então ao aquecimento até 70 °C. A essa temperatura o

agente estabilizante foi adicionado, e manteve-se a mesma constante até o término da reação. As partículas foram filtradas a vácuo, lavadas com água quatro vezes e secas à temperatura ambiente.

Tabela 3 – Formulação da polimerização em emulsão.

<b>Componente</b>	<b>Massa (g)</b>
Estireno	4,0
Divinil benzeno	1,0
Span 80	1,6
Água destilada	100
PVA	1,0
Iniciador	0,16

### **3.2.3 Imobilização da lipase NS-40116 em partículas de poliestireno (PS)**

#### **3.2.3.1 Imobilização nas partículas obtidas por polimerização em suspensão**

Para a imobilização da NS-40116 nas partículas de poliestireno obtidas por esse método, foram utilizados 3 mecanismos:

(1.a) Enzima imobilizada por adsorção ao suporte a partir de lipase previamente dialisada e liofilizada: a imobilização foi realizada adicionando as partículas a uma suspensão de lipase em tampão fosfato (50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0) à diferentes concentrações (30, 50, 110 e 200 mg mL<sup>-1</sup>) (adaptado de LIMA, 2016; NICOLETTI et al., 2015). A agitação foi mantida suave à temperatura de 25 °C e após 7,5h as partículas foram separadas por filtração e lavadas com água deionizada. Depois de secar em temperatura ambiente, a enzima imobilizada foi armazenada a 6 °C;

(1.b) Enzima imobilizada por adsorção ao suporte a partir de lipase sem tratamento prévio: a imobilização foi realizada adicionando as partículas a uma solução de caldo enzimático e tampão fosfato (50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0) à diferentes concentrações (40 e 80 % ( $v_{enzima}/v_{tampão}$ )). A agitação foi mantida suave à temperatura de 25 °C e após 7,5h as partículas foram separadas por filtração e lavadas com água deionizada. Depois de secar em temperatura ambiente, a enzima imobilizada foi armazenada a 6 °C;

(2.a) Enzima imobilizada por ligação covalente a partir de lipase previamente dialisada e liofilizada: neste método, 5 g de poliestireno foram incubados com 60 mL de solução (25% em H<sub>2</sub>O) glutaraldeído (GA) e 40 mL de tampão fosfato pH 7 (50 mmol.L<sup>-1</sup>) durante 11 h sob agitação branda e temperatura ambiente. O suporte ativado foi lavado com água destilada para remover o excesso de GA (WU; LEE; LEE, 1998). Após, a enzima foi imobilizada covalentemente utilizando o método descrito em (1.a) apenas para a concentração de 110 mg mL<sup>-1</sup>;

(2.b) Enzima imobilizada por ligação covalente a partir de lipase sem tratamento prévio: a ativação com glutaraldeído foi feita seguindo o método descrito em (2.a), e a imobilização realizada de acordo com a metodologia descrita em (1.b) apenas para a concentração de 40%;

(3) Enzima imobilizada por retenção física em matriz: os experimentos foram fundamentados no método de polimerização por suspensão em pérola (seção 3.2.2.1). A princípio, conduziu-se a reação nas mesmas condições e proporções do método. Após aproximadamente 2h35min de reação, uma quantidade da enzima (Tabela 4) foi adicionada à reação de polimerização. Temperatura e agitação foram mantidas como inicialmente até o fim do processo. As partículas foram filtradas à vácuo, lavadas com água deionizada e secas à temperatura ambiente.

Tabela 4 – Formulação do procedimento de imobilização por retenção física em matriz.

Componente (g)	Experimento			
	1	2	3	4
Estireno	46,35	46,35	46,35	46,35
Água destilada	120	120	120	120
PVP	3,6	3,6	3,6	3,6
Iniciador	2,32	2,32	2,32	2,32
NS-40116 dialisada e liofilizada	2,0	-	-	-
NS-40116 sem tratamento preliminar	-	11,85	35,57	71,15

### 3.2.3.2 Imobilização nas partículas obtidas por polimerização em emulsão

A enzima foi imobilizada por adsorção ao suporte utilizando a lipase dialisada e liofilizada. As partículas foram adicionadas a uma suspensão de lipase em tampão fosfato (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0) na concentração de 110 mg mL<sup>-1</sup>. A agitação foi mantida suave (30 rpm) à temperatura de 25 °C, e após 7,5h, o derivado imobilizado foi separado

por filtração e lavado com água deionizada. Depois de secar em temperatura ambiente, a lipase imobilizada foi armazenada a 6 °C.

### 3.2.3.2 Imobilização nas partículas obtidas por polimerização em emulsão

A enzima foi imobilizada por adsorção ao suporte utilizando a lipase dialisada e liofilizada. As partículas foram adicionadas a uma suspensão de lipase em tampão fosfato (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0) na concentração de 110 mg mL<sup>-1</sup>. A agitação foi mantida suave (30 rpm) à temperatura de 25 °C, e após 7,5h, o derivado imobilizado foi separado por filtração e lavado com água deionizada. Depois de secar em temperatura ambiente, a lipase imobilizada foi armazenada a 6 °C.

### 3.2.4 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade de hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) foi medida em solução 0,5% de *p*-NPP (m/v) em etanol. O aumento da absorbância causado pela liberação do *p*-nitrofenol na hidrólise do *p*-NPP foi medido espectrofotometricamente. Foram realizados ensaios com os preparados enzimáticos e com a enzima livre, pesando 0,1 g de cada um. Após pesagem, foram adicionados 1 mL do substrato e 1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. E então, seguiu-se para incubação em banho termostatizado por 5 min à 30 °C. Após, foram adicionados 2 mL de NaOH 0,1 M seguido de centrifugação à 10000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi diluído e realizada leitura no espectro a 400 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida pela quantidade de enzima que catalisa a produção de 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto sob as condições experimentais (adaptado de CHIOU; WU, 2004).

### 3.2.5 Determinação do conteúdo de proteína

A determinação de conteúdo de proteína foi realizada de acordo com método proposto por Bradford (1976), utilizando curva padrão de albumina de soro bovino.

As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, da adição de 0,1 mL de amostra (previamente diluída) com 5 mL do reagente de Bradford.



Foi encontrado o teor de proteína para a enzima livre e para a enzima imobilizada por retenção física em matriz, esta foi feita através do sobrenadante da reação de polimerização. A diferença entre a quantidade de proteína na enzima livre e quantidade de proteína no sobrenadante resultou na quantidade de proteína da enzima imobilizada. A eficiência de imobilização (quantidade de proteína que permanece ativa) foi determinada como sendo a razão entre a porcentagem de imobilização e a porcentagem de proteína retida (JAFARY et al., 2016).

### **3.2.6 Caracterização da lipase NS-40116 livre e imobilizada**

#### **3.2.6.1 Morfologia da enzima imobilizada nos diferentes métodos de polimerização**

A morfologia do suporte, da enzima imobilizada, e da enzima imobilizada após reuso foi verificada em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) JEOL JSM- 6390LV. As partículas foram fixadas com fita de carbono em um suporte e, em seguida, recobertas com carbono. As magnitudes utilizadas foram de 65, 100, 130, 160, 400, 600 e 3000 vezes. As análises de MEV foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O diâmetro médio de umas das partículas foi obtido pelo software LAS AF Lite versão 2.6.3 da Leica Microsystems®.

#### **3.2.6.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada (EITF)**

As análises espectroscópicas no infravermelho foram realizadas na Central de Análises, do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Os espectros de absorção na região do infravermelho da enzima livre, derivado imobilizado e do suporte (PS) foram obtidos no equipamento da marca Agilent Technologies, modelo Cary 600 Series, em intervalo de comprimento de onda de 3900 a 584  $\text{cm}^{-1}$  e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Os dados foram tratados pelo software do equipamento, e após plotados no software Origin.

### 3.2.6.3 Determinação dos parâmetros cinéticos

As constantes cinéticas foram determinadas utilizando como substrato *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) em diferentes concentrações na atividade enzimática, possibilitando a determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da velocidade máxima de reação ( $V_{máx}$ ) pelo sistema gráfico de Lineweaver & Burk.

Para a enzima livre, utilizou-se valores de concentração de substrato 0,4, 0,8, 1,6, 2,8, 4,9 e 5,7 mM. Já para o derivado imobilizado, os valores de  $K_m$  e  $V_{máx}$  foram calculados a partir das concentrações 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,3 e 1,6 mM.

### 3.2.6.4 Determinação da temperatura e pH ótimos

Na determinação do pH ótimo, as enzimas livre e imobilizada foram mantidas à temperatura ambiente durante 2 h em diferentes valores de pH: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 2,1 e 3), tampão acetato de sódio 50 mM (pH 3,43 e 4,75), tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7 e 8), tampão cloreto de potássio (pH 9–11) e tampão hidróxido de sódio pH 12. Após o tempo de incubação determinado, as atividades das enzimas foram medidas de acordo com a metodologia descrita anteriormente (Seção 3.2.4).

Para a determinação da temperatura ótima (ou faixa de temperatura), as enzimas livre e imobilizada foram mantidas por 2 h em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 65 e 75 °C) e pH constante igual a 10. Após este tempo, prosseguiu-se à medição da atividade enzimática conforme Seção 3.2.4.

### 3.2.6.5 Estabilidade à temperatura

A estabilidade à temperatura de 50 °C da enzima livre e do derivado imobilizado foi realizada em função do tempo de incubação. Para tal, 0,1 g da lipase foi diluído em 1 mL de tampão cloreto de potássio pH 10, depois incubados a 50 °C durante diferentes tempos (1, 4, 7, 10, 15 e 20 h) (CIPOLATTI et al., 2015). A atividade enzimática foi avaliada de acordo com a Seção 3.2.4.

### 3.2.6.6 Estabilidade ao armazenamento

Para avaliar a estabilidade ao armazenamento, as enzimas livre e imobilizada foram armazenadas à temperatura ambiente (variação de 20–

30 °C) e também sob refrigeração (6 °C). As enzimas armazenadas em temperatura ambiente foram avaliadas durante 106 dias em diferentes intervalos de tempo, e as lipases mantidas sob refrigeração foram armazenadas por 122 dias. Assim, amostras foram colhidas e suas atividades medidas conforme Seção 3.2.4.

### 3.2.6.7 Influência de solventes orgânicos na atividade hidrolítica de lipases

A estabilidade em solventes orgânicos foi estudada para a enzima imobilizada neste trabalho (PS), e lipase imobilizada comercial Novozym® 435 para fins de comparação. Incubaram-se à temperatura ambiente 0,5g de enzima e 3 mL de etanol, metanol, hexano e propanol. Após 2 h de contato, as enzimas foram separadas por filtração, lavadas com água destilada e secas em temperatura ambiente. A medida de atividade foi feita conforme seção 3.2.4. A atividade relativa foi calculada com base na diferença de valores obtidos para a atividade enzimática inicial e após 2 h para cada um dos solventes.

### 3.2.7 Aplicação da enzima livre e imobilizada na hidrólise do óleo de soja refinado

A hidrólise do óleo de soja foi medida por meio da acidez do meio devido à presença de ácidos graxos livres. Os experimentos foram realizados por 90 min em reator encamisado (250 mL) com agitação magnética de 300 rpm e temperatura mantida constante à 45 °C. O meio reacional foi composto de 100 g de óleo de soja refinado Soya®, 2 mL de água e 0,5 g da lipase NS-40116 livre (adaptado de REMONATTO et al., 2016). Para a lipase imobilizada em poliestireno foram utilizadas diferentes quantidades (1,41, 5,0, 10,0 e 15,0 g).

A determinação do teor de ácidos graxos livres na amostra foi realizada por titulação com NaOH. Resumidamente, diluíram-se aproximadamente 3 g da amostra e 3-4 gotas de fenolftaleína em 40 mL de etanol. Esta mistura foi então titulada com NaOH 0,1 M sob agitação vigorosa até alteração sutil de cor. A acidez da solução foi determinada de acordo com a Equação 1:

$$C_{AGL} = \frac{V_{NaOH} \times M_{NaOH} \times MM_{AGL}}{10 \times M_a} \quad (1)$$

Onde:  $C_{AGL}$  é o teor de ácidos graxos livres (AGL) (% m/m);  $V_{NaOH}$  é o volume de solução de NaOH (mL) gasto na titulação;  $M_{NaOH}$  é a molaridade da solução de NaOH (mol/L);  $MM_{AGL}$  corresponde à massa molecular média dos ácidos graxos presentes no óleo (g/mol);  $M_a$  é a massa da amostra (g).

### **3.2.8 Estudo de sucessivos ciclos de uso do derivado enzimático imobilizado em poliestireno PS na hidrólise do óleo de soja refinado**

Para o teste de reuso da enzima foram consideradas as seguintes condições: 50 g de óleo de soja refinado Soya<sup>®</sup>, 1 mL de água destilada, 10% (m/m) de enzima em relação à massa do substrato, temperatura 45 °C, tempo reacional 90 min e agitação de 300 rpm. Para recuperar o derivado enzimático imobilizado ao final de cada reação, o biocatalisador foi separado do meio reacional por filtração com auxílio de tela filtrante de nylon. Em seguida, realizou-se lavagem com 30 mL de hexano e uma lavagem com água destilada. A enzima secou-se naturalmente durante 3 horas e foi novamente utilizada na hidrólise do óleo de soja, e assim, sucessivamente até que foi observado declínio na conversão. O teor de ácidos graxos livre foi mensurado conforme seção 3.2.7.

### **3.2.9 Caracterização parcial da gordura abdominal de frango e do ácido graxo comercial SGS**

#### **3.2.9.1 Perfil de ácidos graxos**

A determinação do perfil de ácidos graxos da gordura abdominal de frango seguiu as normas da AOCS Ce 2-66, sendo a análise realizada em um cromatógrafo gasoso. O resultado para o perfil de ácidos graxos é expresso em relação à porcentagem das áreas dos picos. Essa análise foi realizada no Laboratório de Grasas y Aceites da Faculdade de Química da Universidade La Republica (UDELAR), no Uruguai. O Apêndice A apresenta a descrição do procedimento analítico utilizado.

#### **3.2.9.2 Índice de acidez**

O índice de acidez da gordura abdominal de frango e do ácido graxo comercial SGS foi realizado segundo metodologia AOCS Cd 3d-

63 e consiste na determinação da acidez do meio, devido a presença dos ácidos graxos livres. Este procedimento é realizado com a pesagem de uma alíquota de 2 g de amostra em um erlenmeyer de 300 mL. Em seguida, adiciona-se 50 mL de uma solução etanol anidro:éter etílico (v/v), e homogeneizado à este, adiciona-se 3 gotas de indicador fenolftaleína 1% para indicar o ponto de viragem (mudança de cor) na titulação com solução KOH 0,1 mol/L. O índice de acidez é determinado pela Equação 2.

$$IA = \frac{(MM_{KOH} * V_{KOH} * C_{KOH})}{M_a} \quad (2)$$

Onde: IA é índice de acidez (mg KOH/g);  $MM_{KOH}$  é a massa molar de KOH (56,1 g/mol);  $V_{KOH}$  é volume de KOH gasto na titulação (mL);  $C_{KOH}$  é a concentração molar do KOH usado na titulação (mol/L);  $M_a$  é a massa de amostra utilizada para titular (g).

### 3.2.10 Síntese enzimática de ésteres metílicos por transesterificação

O processo de metanólise foi realizado em Erlenmeyer de 50 mL, incubado em agitador orbital “shaker” (TECNAL, modelo TE-424) a 32 °C e 250 rpm. O meio reacional foi composto de 10 g de gordura abdominal de frango de massa molar 861,05 g/mol, 1:4,5 razão molar de gordura:metanol, 2% de água, 0,3% de massa para a enzima livre e 6% de massa para as enzimas imobilizadas (lipase comercial NS 88011 e lipase imobilizada em poliestireno). As reações foram conduzidas durante 16 e 24 horas (adaptado de REMONATTO et al., 2016).

A quantidade de metanol referente ao valor de 1:4,5 molar foi adicionada à reação de forma fracionada e em partes iguais (total de 6 adições de metanol) para prevenir inibição da enzima. As adições ocorreram em 0, 1, 3, 4, 5 e 6 h (REMONATTO et al., 2016).

Para recuperar o derivado enzimático imobilizado ao final de cada reação, o biocatalisador foi separado do meio reacional por filtração com auxílio de tela filtrante de nylon. Em seguida, realizou-se duas lavagens com 10 mL de hexano e uma lavagem com água destilada. A enzima secou-se naturalmente durante 24 horas e, após esse período, foi armazenada sob refrigeração.

Quanto ao meio reacional procedente da metanólise, este foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 min para a separação das fases. O sobrenadante foi coletado e seguiu-se à análise por cromatografia gasosa.

### 3.2.11 Síntese enzimática de ésteres metílicos por hidroesterificação

#### 3.2.11.1 Hidrólise enzimática da gordura abdominal de frango

A hidrólise da gordura abdominal de frango para obtenção de ácidos graxos livres foi feita de acordo com as condições otimizadas de Zenevicz et al. (2016). A reação de hidrólise enzimática foi conduzida em banho de ultrassom onde um frasco (50 mL) foi imerso em água com o meio reacional agitado mecanicamente (agitador digital IKA-RW 20) a uma velocidade de agitação constante de 300 rpm. A unidade ultrassônica opera numa frequência de 40 kHz e potência máxima de 132 W.

Foi utilizado 25 g de gordura de frango, razão molar gordura/água de 1:20 e 10% em massa (em relação à massa total de substrato) da enzima comercial Lipozyme TL IM de *Thermomyces lanuginosus* (Novozymes – Araucária, Paraná, Brasil). Conduziu-se a reação por 2 h à temperatura de 40 °C. Ao término, álcool isopropílico foi utilizado para lavagem e recuperação da enzima, sendo então necessário a passagem dos produtos pelo evaporador rotativo (IKA HB 10 Basic) para retirada do solvente. Após, a mistura foi centrifugada a 4000 rpm durante 10 min para a separação do glicerol formado na reação. O sobrenadante foi coletado e congelado (-4 °C) para o posterior emprego na esterificação.

#### 3.2.11.2 Esterificação

Na esterificação foram utilizados como fonte de ácidos graxos livres o derivado da hidrólise enzimática da gordura de frango, e também o ácido graxo vegetal comercial SGS.

O processo de metanólise foi realizado em Erlenmeyer de 50 mL, incubado em agitador orbital shaker (TECNAL, modelo TE-424) a 32 °C, 250 rpm, por 16 e 24 horas. O meio reacional foi composto de 10 g de um dos substratos citados acima, razão molar de 1:4,5 de gordura para metanol, 0,3% de massa para a enzima livre, 2% de massa para a enzima comercial Novozym® 435 (ZENEVICZ et al., 2016) e 6% de massa tanto para a enzima comercial NS 88011 como para o derivado enzimático imobilizado neste trabalho.

A adição de metanol, recuperação da enzima e centrifugação do meio reacional seguiram o mesmo padrão da seção 3.2.10.

### 3.2.12 Quantificação de ésteres metílicos por cromatografia gasosa

A quantificação de ésteres de ácidos graxos foi realizada nas condições cromatográficas descritas pela norma EN 14103 (2003), do Comitê Europeu para Padronizações com algumas adaptações. As amostras foram previamente preparadas, pesando-se 0,250 g das mesmas em um balão volumétrico de 10 mL completando o volume até o menisco com acetato de etila. Após, transferiu-se uma alíquota de 50 µL desta solução para um balão volumétrico de 1 mL e adicionou-se 50 µL do padrão interno heptadecanoato de metila na concentração de 5 g/L e completava-se o volume com acetato de etila.

A solução foi então injetada (1 µL) em um cromatógrafo gasoso (CG) (Shimadzu 2010), com injetor automático (Split) e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar MXT-Biodiesel TG (15 m x 0,32 mm x 0,1 µm). A temperatura inicial da coluna foi 70 °C permanecendo por 1 minuto, seguido pelo aquecimento de 10 °C/min até 180 °C permanecendo por 2 minutos, e novamente aquecendo 0,5 °C/min até 188 °C, e por último, aquecimento até 380 °C a uma taxa de 50 °C/min permanecendo por 4,16 min. Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste (50,5 kPa) e a temperatura do injetor e detector eram 250 °C.

Assim, foi possível a determinação do teor de ésteres metílicos da reação, cujo cálculo está descrito abaixo com base na EN 14103 (2003):

$$T_E = \frac{(\Sigma A) - A_{EI}}{A_{EI}} * \frac{C_{EI} * V_{EI}}{m} * 100 \quad (3)$$

Onde:

$T_E$  – Teor de ésteres metílicos na amostra (% m/m);

$\Sigma A$  – Somatório das áreas correspondentes aos picos dos ésteres metílicos ( $C_{14}$  a  $C_{24:1}$ );

$A_{EI}$  – Área correspondente ao pico do heptadecanoato de metila;

$C_{EI}$  – Concentração em mg/mL da solução de heptadecanoato de metila utilizada;

$V_{EI}$  – Volume, em mL, da solução de heptadecanoato de metila utilizado;

$m$  – massa, em mg, da amostra.





## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo estão apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento desta pesquisa, referentes à imobilização da lipase NS-40116 em partículas de poliestireno e posterior aplicação do derivado enzimático na síntese de ésteres metílicos e ácidos graxos livres. São apresentados também a determinação de pH e temperatura ótimos, estabilidade à temperatura, estabilidade a solventes, estabilidade ao armazenamento, capacidade de ciclos reacionais e características dos suportes e dos derivados imobilizados.

### 4.1 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NS-40116 EM PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO OBTIDAS ATRAVÉS DE POLIMEREZAÇÃO EM SUSPENSÃO EM PÉROLA

A enzima NS-40116 (liofilizada e em seu estado líquido) foi imobilizada em partículas de poliestireno utilizando diferentes metodologias, com o objetivo de estudar a interação do biocatalisador com o suporte e escolher o método mais promissor para posterior aplicação.

#### 4.1.1 Enzima imobilizada por adsorção ao suporte

A enzima NS-40116 liofilizada foi imobilizada em partículas de poliestireno a diferentes concentrações (30, 50, 110 e 200 mg mL<sup>-1</sup>) (Tabela 5). Até certo ponto, a atividade enzimática aumentou com o aumento da concentração. Porém, na maior concentração (200 mg mL<sup>-1</sup>) foi observado um pequeno decréscimo na atividade, apesar da média não diferir significativamente do resultado obtido com a concentração de 110 mg mL<sup>-1</sup>. Essa redução na atividade pode ser atribuída a alguns fatores: (a) o bloqueio do sítio ativo pelo próprio efeito de imobilização, (b) a presença de moléculas de enzimas próximas a outras, reduzindo assim o acesso do substrato ao sítio ativo, (c) a sobrecarga do suporte, com a conseqüente formação de uma multicamada de moléculas de enzimas na superfície das partículas (KLEIN et al., 2012), (d) formação de aglomerados durante o processo de imobilização, o que pode estar associado à ausência de estabilizantes, removidos durante a diálise, essenciais para manter as enzimas em suspensão (LIMA, 2016).

Tabela 5 – Efeito da concentração de enzima na atividade enzimática (AE) de lipase imobilizada em partículas de poliestireno por adsorção ao suporte.

<b>Enzima utilizada na imobilização</b>	<b>Concentração</b>	<b>AE (U/g)*</b>
NS-40116 livre	-	5,81 ± 0,01 <sup>a</sup>
NS-40116 dialisada e liofilizada	30 mg mL <sup>-1</sup>	1,95 ± 0,09 <sup>c</sup>
NS-40116 dialisada e liofilizada	50 mg mL <sup>-1</sup>	2,13 ± 0,12 <sup>c</sup>
NS-40116 dialisada e liofilizada	110 mg mL <sup>-1</sup>	2,45 ± 0,39 <sup>b</sup>
NS-40116 dialisada e liofilizada	200 mg mL <sup>-1</sup>	2,31 ± 0,32 <sup>b</sup>
NS-40116 sem tratamento preliminar	40 % (v/v)	2,33 ± 0,41 <sup>b</sup>
NS-40116 sem tratamento preliminar	80 % (v/v)	2,40 ± 0,12 <sup>b</sup>

\*Média ± desvio padrão (n=3) p ≤ 0,05.

Quando utilizada a enzima NS-40116 sem nenhum preparo preliminar (Tabela 5), nota-se que para um aumento de 50 % na concentração enzimática, não houve aumento significativo de atividade, provavelmente pelas mesmas razões citadas anteriormente (a – c). Assim, para os próximos testes, em que foram usadas partículas ativadas com glutaraldeído, as concentrações empregadas para a enzima liofilizada e caldo enzimático foram 110 mg mL<sup>-1</sup> e 40 %, respectivamente.

#### **4.1.2 Enzima imobilizada por ligação covalente**

Em busca de melhores resultados, foi estudado o método de imobilização covalente com glutaraldeído (GA), já que este é frequentemente empregado no sentido de favorecer a imobilização, como agente de ligação (KAWAGUTI; SATO, 2008). O glutaraldeído tem elevada reatividade nos grupos aldeídos, que reagem facilmente com os grupos amina das enzimas formando ligações iminas. Sua aplicação se estende ainda à vantagem de evitar o fenômeno de dessorção (WANG; TURHAN; GUNASEKARAN, 2004).

Contudo, conforme resultados expressos na Tabela 6, ficou claro que a ativação das partículas com GA não surtiu efeito na atividade dos derivados imobilizados.

Tabela 6 – Atividade enzimática (AE) dos derivados imobilizados por ligação covalente.

<b>Enzima utilizada na imobilização</b>	<b>Concentração</b>	<b>AE (U/g)</b>
NS-40116 livre	-	5,81 ± 0,01
NS-40116 dialisada e liofilizada	110 mg mL <sup>-1</sup>	2,37 ± 0,18
NS-40116 sem tratamento preliminar	40 % (v/v)	2,38 ± 0,32

Para a imobilização enzimática, é de interesse que uma das extremidades da molécula do GA se ligue ao suporte e a outra fique livre para a ligação da enzima. No entanto, todas as extremidades de uma mesma molécula de GA podem se ligar na superfície da partícula de PS. Essa situação não é vantajosa, pois não restaria extremidade livre para reagir com a enzima (LIMA, 2016). Além disso, de acordo com Adriano et al. (2005), concentrações elevadas de glutaraldeído podem resultar na perda de atividade catalítica em consequência da interação multipontual com o suporte. Todavia, não é possível afirmar que isso ocorreu neste trabalho, pois seria necessário avaliar o efeito da concentração de glutaraldeído na eficiência de imobilização e na estabilidade da enzima imobilizada. Portanto, para trabalhos futuros, sugere-se o desenvolvimento desse estudo.

#### **4.1.3 Enzima imobilizada por retenção física em matriz**

A Tabela 7 apresenta a atividade enzimática (AE) para a enzima livre e para os derivados imobilizados por retenção física em poliestireno. O derivado no qual foi utilizado maior concentração de lipase apresentou também o melhor resultado (49,40% de imobilização). Ao comparar o derivado imobilizado a partir de lipase NS-40116 liofilizada, percebe-se que o mesmo apresentou bons resultados em relação aos demais derivados, já que a concentração foi 6 vezes menor do que a menor concentração utilizada na imobilização através de NS-40116 sem tratamento. Assim, caso fosse utilizada uma maior concentração de NS-40116 liofilizada, o resultado de atividade poderia ser realçado. Porém, também haveria chance desse processo se tornar inviável, visto que para produzir uma pequena quantidade de enzima liofilizada, é preciso uma grande quantidade do caldo enzimático (em média 160 mL produzem 2g), fora os gastos com energia para o posterior congelamento e liofilização das amostras. Portanto, considerou-se como o sendo o melhor resultado nestes estudos, o derivado imobilizado por retenção física em que foi utilizado NS-40116 sem tratamento, na concentração de 153,50% (em

relação ao monômero). A vantagem se deve também ao fato da facilidade de imobilização, visto que a mesma é feita junto à polimerização, em uma única etapa.

Tabela 7 – Atividade enzimática (AE) dos derivados imobilizados por retenção física em matriz.

Enzima utilizada na imobilização	Concentração (% <i>, m/m</i> ) <sup>a</sup>	AE (U/g) <sup>b</sup>
NS-40116 livre	-	5,81 ± 0,01 <sup>a</sup>
NS-40116 sem tratamento preliminar	25,56	1,88 ± 0,08 <sup>c</sup>
NS-40116 sem tratamento preliminar	76,74	2,34 ± 0,14 <sup>bc</sup>
NS-40116 sem tratamento preliminar	153,50	2,87 ± 0,13 <sup>b</sup>
NS-40116 dialisada e liofilizada	4,31	2,29 ± 0,23 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Em relação ao monômero estireno.

<sup>b</sup> Média ± desvio padrão (n=3) p ≤ 0,05.

## 4.2 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NS-40116 EM PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO OBTIDAS ATRAVÉS DE POLIMEREZAÇÃO EM EMULSÃO

Ainda para conhecer o comportamento da lipase NS-40116 frente à diferentes técnicas de imobilização, partículas de PS obtidas por outro método de polimerização foram utilizadas como suporte para a imobilização dessa enzima. Para tal, a técnica empregada foi a adsorção física, na qual foi utilizada a concentração mais promissora de enzima liofilizada do estudo anterior (110 mg mL<sup>-1</sup>).

O derivado imobilizado nessa condição e com esse suporte se destacou dos demais em termos de atividade hidrolítica (7,96 U/g). Através das Figura 10 e 11, pode-se verificar que as partículas utilizadas nessa imobilização são menores, o que representa aumento da superfície de contato. Em consequência, é provável que toda a enzima a ser imobilizada ficou aderida ao suporte, não havendo perdas.

Conforme será discutido mais adiante (seção de caracterização dos derivados imobilizados – 4.4.1), as partículas obtidas via polimerização em emulsão e polimerização em suspensão podem ser classificadas como micropartículas e macropartículas, respectivamente. Fazendo um comparativo entre os resultados de imobilização por adsorção das duas partículas (macro e micro), vimos que em relação à retenção da atividade

após imobilização, as macropartículas apresentaram valores mais baixos. A menor retenção de atividade pode evidenciar que nem toda a área de superfície das macropartículas está disponível para a ligação da enzima. Além disso, as moléculas enzimáticas provavelmente não podem entrar no interior das macropartículas, ficando imobilizadas principalmente em suas superfícies externas (KLEIN et al., 2012).

Importante ressaltar que na polimerização das micropartículas, PVA foi adicionado, sendo que este é conhecido como possível estabilizador de lipases (REETZ; ZONTA; SIMPELKAMP, 1996), e também tende a estabelecer fortes interações polares com as moléculas de proteína (WANG; HSIEH, 2008).

Como um dos objetivos deste trabalho era a aplicação da enzima imobilizada na síntese de ésteres metílicos utilizando gordura de frango como substrato, a enzima imobilizada por adsorção física não foi explorada nos próximos estudos (com exceção do MEV). Apesar de apresentar ótima atividade de hidrólise, seu uso no processo de metanólise resultou na ineficiência da separação da enzima dos substratos e produtos da reação. Isso se deve ao tamanho das micropartículas, que claramente são menores quando comparadas com o outro derivado imobilizado. Este derivado é o já mencionado obtido através de imobilização por retenção física em matriz (concentração de 153,50%). Assim, esta será a enzima estudada nos próximos tópicos, ficando a sugestão de aplicação das micropartículas em outros processos.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA E EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO POR RETENÇÃO FÍSICA EM MATRIZ

A quantidade de proteína encontrada para a lipase livre sem nenhum tratamento prévio foi de 30,17 mg/mL. Como foi adicionado 60 mL (71,15 g) da NS-40116 livre na reação de polimerização da enzima imobilizada, a quantidade total de proteína oferecida fica em torno de 1810,20 mg. Pela Tabela 8 nota-se que desse total de 1810,20 mg de proteína, 57,33% ficou retida no suporte. A determinação da eficiência de imobilização indicou que 86% da proteína retida (imobilizada) manteve sua atividade nativa. Resultados semelhantes foram encontrados por Dizge; Keskinler; Tanriseven (2009) e Bukhari et al. (2014). Eles usaram um copolímero microporoso de estireno-divinilbenzeno, e nanopoliestireno para imobilizar lipase, respectivamente. O rendimento

de imobilização para o copolímero com ligação covalente foi de 85% e para as nanopartículas de poliestireno, 83 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) em pH 10.

Tabela 8 – Parâmetros de imobilização.

<b>Enzima</b>	<b>AE (U/g)</b>	<b>Proteína (mg)</b>	<b>Eficiência de ligação<sup>b</sup></b>
Enzima livre	5,81 $\pm$ 0,01 (100%)	1810,20 (100%) <sup>a</sup>	-
Enzima imobilizada (PS)	2,87 $\pm$ 0,13 (49,40%)	1037,94 (57,33%)	0,86

<sup>a</sup> Quantidade de proteína total oferecida no procedimento de imobilização da PS levando em consideração a quantidade de proteína encontrada para o caldo enzimático (30,17 mg/mL).

<sup>b</sup> Eficiência de ligação foi calculada como a razão da porcentagem de imobilização (49,4%) pela porcentagem de proteína retida (57,33%) (JAFARY et al., 2016).

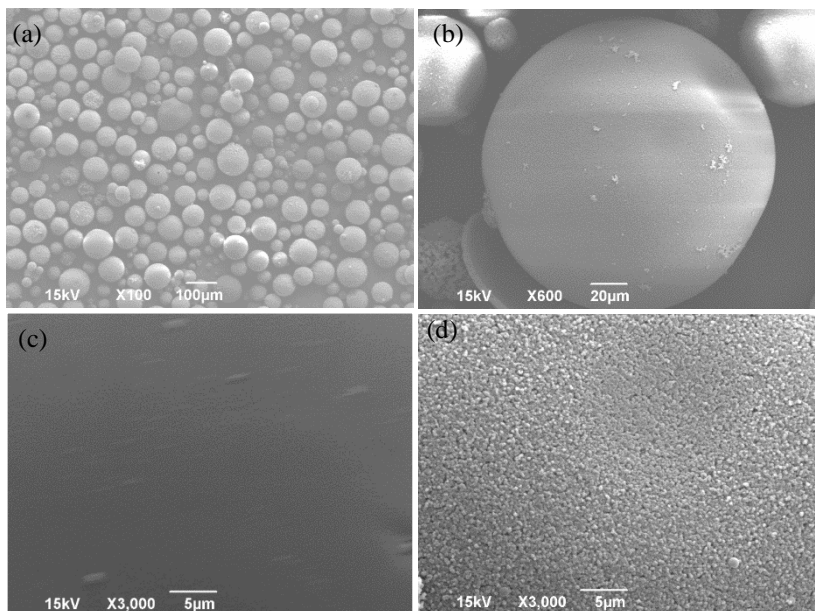
#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE NS-40116 LIVRE E IMOBILIZADA

##### 4.4.1 Morfologia da enzima imobilizada nos diferentes métodos de polimerização

As características superficiais das partículas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figuras 9 e 10). As imagens demonstram a forma esférica de ambas as partículas e superfície lisa.

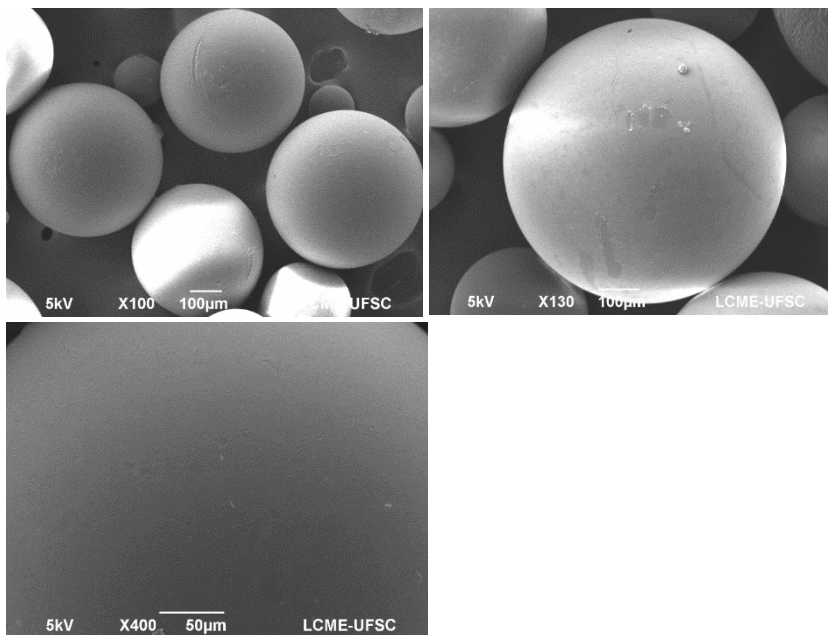
As partículas são classificadas de acordo com o tamanho, são chamadas de nanopartículas quando variam de 0,01 a 0,2  $\mu\text{m}$ , de micropartículas de 1 a 100  $\mu\text{m}$ , e acima de 100  $\mu\text{m}$  são denominadas macropartículas (SUAVE et al., 2006). Através do software LAS AF Lite, foi possível constatar que as partículas obtidas pela polimerização em emulsão tendem a distribuir-se como micropartículas, já que os diâmetros variam de 20 a 100  $\mu\text{m}$  e o diâmetro médio é 46,76  $\mu\text{m}$ . A imobilização enzimática resultou em notável alteração da morfologia superficial dessas microesferas, resultado da aderência da enzima na superfície, como mostrado na Figura 10 (c) e (d). Pelas imagens da Figura 10, fica claro também que as partículas obtidas via polimerização em suspensão em pérola tendem a distribuir-se como macropartículas, visto que seus diâmetros são maiores que 100  $\mu\text{m}$ .

Figura 10 – Imagens MEV das partículas sintetizadas via polimerização em emulsão. Antes da imobilização da lipase (a), (b) e (c); após imobilização da lipase por adsorção física (d).



Fonte: Acervo da autora.

Figura 11 – Imagens MEV da lipase imobilizada em partículas de poliestireno (polimerização em suspensão em pérola) por retenção física em matriz.



Fonte: Acervo da autora.

#### 4.4.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada (EITF)

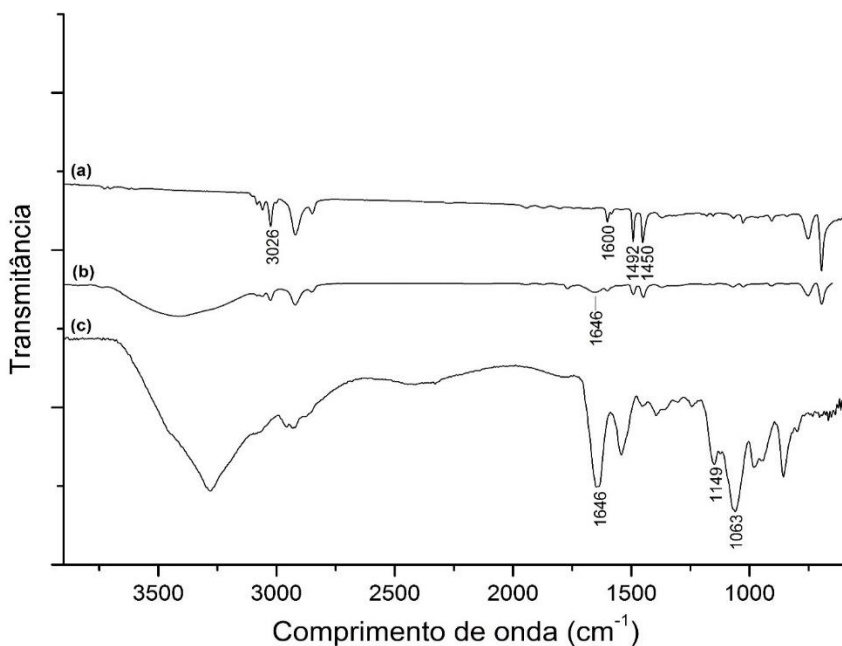
A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (EITF) foi realizada nas partículas de poliestireno obtidas via polimerização em suspensão (tópico 3.2.2.1) e no derivado imobilizado por retenção física em matriz (PS). Um dos objetivos foi avaliar o polímero durante a reação de polimerização, podendo observar se todos os reagentes inseridos no meio reacional foram transformados em produtos da reação.

Os espectros são apresentados na Figura 12. Os picos em 1600, 1492 e 1450  $\text{cm}^{-1}$  confirmam a presença do radical fenil do polímero através das ligações de carbono  $\text{-C=C-}$  (TERRANOVA et al., 2017). O pico em 3026  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à vibrações de estiramento do  $\text{=C-H}$  nos radicais fenil (FAN et al., 2017). Os demais picos observados no espectro



do polímero foram igualmente observados nos espectros dos autores citados. Para a enzima imobilizada, nota-se que os mesmos picos são mais suaves, porém, nenhum outro não condizente foi encontrado, exceto os que dizem respeito à enzima.

Figura 12 – Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (EITF) de partículas de PS sintetizadas por polimerização em suspensão. (a) Partículas de poliestireno, (b) Enzima imobilizada nas partículas de poliestireno (PS), e (c) Enzima livre.



Fonte: Acervo da autora.

Com o objetivo de verificar a imobilização da enzima, o espectro de EITF da enzima livre foi comparado com os espectros de absorção da lipase imobilizada e suporte. A enzima livre apresentou espectro típico, com bandas de absorção associadas com grupo amida (C=O-NH), grupos amina, primário e secundário, entre 1200-1000 cm<sup>-1</sup> (BARTH, 2007). O espectro da lipase imobilizada apresentou duas regiões de absorção que não foram observadas no espectro do suporte (partículas de poliestireno). O leve decaimento observado no comprimento de onda de 1646 cm<sup>-1</sup> corresponde ao estiramento de grupos carbonila (C=O) de amidas, que

são ligações típicas de proteínas (BARTH, 2007). A forte banda de absorção na faixa de 3600-3000  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída às ligações peptídicas entre grupos hidroxila (O-H) e amina ( $-\text{N}-\text{H}_2$ ) da lipase (MISHRA; SARDAR, 2015; SANGHI; VERMA, 2009). Esses resultados comprovam a incorporação da lipase às partículas.

#### 4.4.3 Determinação dos parâmetros cinéticos

As constantes cinéticas foram determinadas usando *p*-NPP como substrato. As atividades da NS-40116 livre e imobilizada em diferentes concentrações de substrato (0,4, 0,8, 1,6, 2,8, 4,9 e 5,7 mM; 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,3 e 1,6 mM, respectivamente) foram plotadas no sistema gráfico Lineweaver-Burk (Apêndice B).

A Tabela 9 mostra que a NS-40116 imobilizada apresentou valores  $K_m$  e  $V_{\max}$  diferentes. A enzima livre atingiu um valor de  $V_{\max}$  de 17,88  $\mu\text{mol}/\text{min g}$ , enquanto que para a enzima imobilizada, o valor foi de 4,48. Esta diferença pode ser correlacionada a possíveis alterações de conformação da enzima após a imobilização, resultando em um  $V_{\max}$  inferior (NICOLETTI et al., 2015). Contudo, quando se compara os valores de  $K_m$ , nota-se que o substrato foi muito mais propenso a interagir com a lipase imobilizada.

Tabela 9 – Parâmetros cinéticos para enzima livre e enzima imobilizada em partículas de poliestireno.

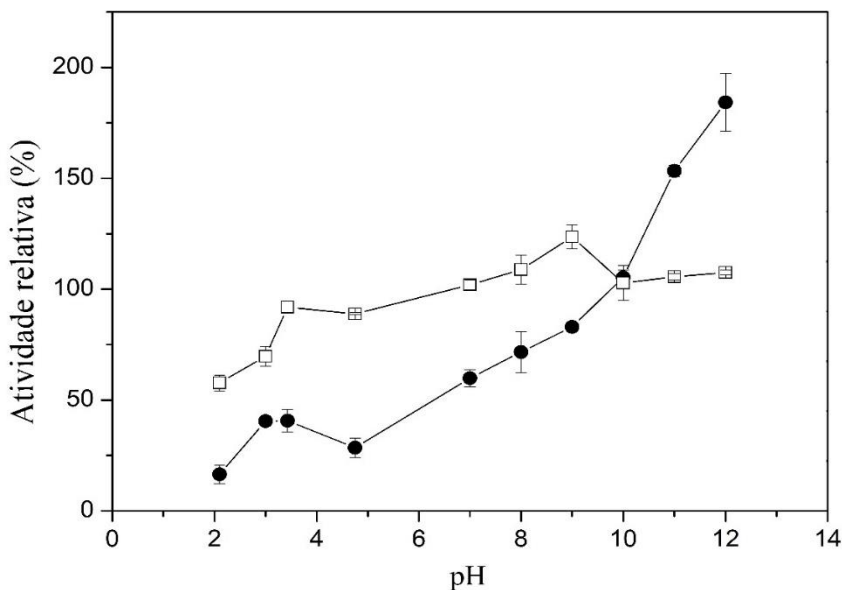
Parâmetro	Lipase livre	Lipase imobilizada (PS)
$K_m$ (mM)	4,79	2,26
$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min g}$ )	17,88	4,48

#### 4.4.4 Determinação da temperatura e pH ótimos

Durante a imobilização, a estrutura terciária da enzima pode sofrer algumas modificações que podem afetar sua estabilidade e especificidade e/ou acessibilidade do sítio ativo. Como resultado, a enzima imobilizada pode apresentar comportamento diferente sob determinadas condições de pH e temperatura em relação à enzima livre. Assim, para cada novo protocolo de imobilização, a enzima imobilizada deve ser cuidadosamente caracterizada e testada (GARCIA; OH; ENGLER,

1989). A Figura 13 apresenta os resultados de atividade hidrolítica quando as enzimas foram submetidas à diferentes valores de pH. A atividade relativa foi calculada com base na diferença de valores obtidos para a atividade enzimática inicial e após 2 h no valor de pH correspondente. Para a enzima livre, o valor máximo de atividade encontrada foi no pH 9, onde se observa uma ativação da enzima, já que neste ponto, foi constatado um aumento de 23% na atividade. A lipase imobilizada apresentou uma faixa ótima de pH que varia de 10-12, chegando a obter 84% de aumento no pH 12. Os trabalhos que Villeneuve et al. (2000) examinaram, mostraram que em relação à faixa de pH das lipases imobilizadas, observa-se que o melhor pH é geralmente ligeiramente deslocado para valores mais alcalinos. Miletic´ et al. (2010) mencionam que a enzima imobilizada pode fornecer valores de atividade relativamente elevados porque a conformação da enzima, vital para a atividade enzimática, pode mudar com o pH.

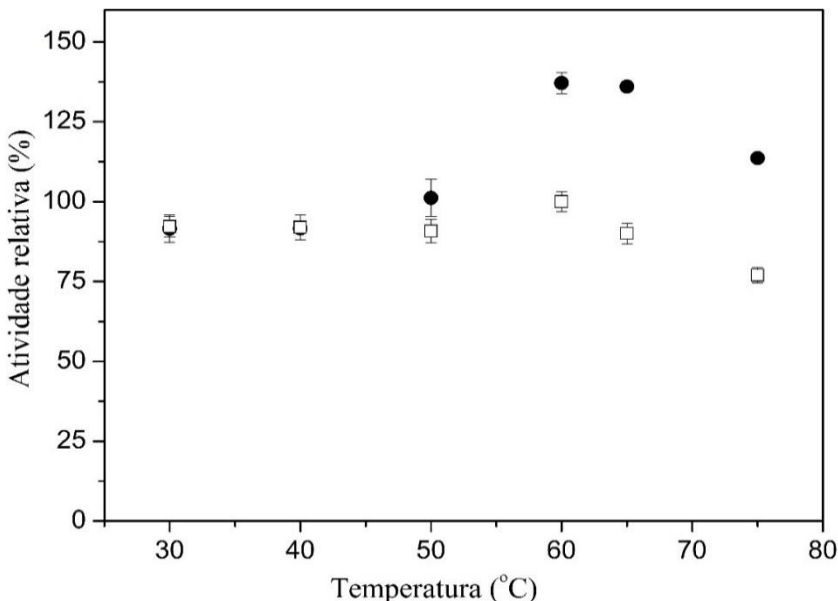
Figura 13 – Atividade relativa para 2 h em diferentes valores de pH, da enzima livre (□) e imobilizada em poliestireno (●).



Fonte: Acervo da autora.

O efeito da imobilização nas características térmicas da enzima livre e imobilizada foi avaliado por meio de ensaios de atividade a diferentes temperaturas e os resultados são apresentados na Figura 14. De acordo com o teste de Tukey em um intervalo de confiança de 95%, a lipase livre mostrou atividade ótima à 60 °C. Para a enzima imobilizada, a média das atividades nos pontos 60 e 65 °C foram iguais. Logo, pode-se afirmar que a enzima imobilizada apresenta uma faixa de temperatura ótima entre 60 e 65 °C. Ainda cabe ressaltar que nestes pontos houve um incremento na atividade de cerca de 37%, e apesar do declínio na temperatura 75 °C, também foi verificado aumento na atividade (13%). Para a enzima livre, a temperatura de 75 °C representou um declínio mais acentuado em sua atividade. Estas observações são atribuídas ao fato das enzimas imobilizadas serem menos sensíveis à inativação térmica, uma vez que a sua estrutura é mais rígida após a imobilização (VILLENEUVE et al., 2000). Assim, os resultados sugerem que a lipase imobilizada apresentou melhor estabilidade em relação às variações de temperatura, o que implica em flexibilidade operacional. Isto torna a lipase imobilizada ainda mais atraente do ponto de vista da aplicação.

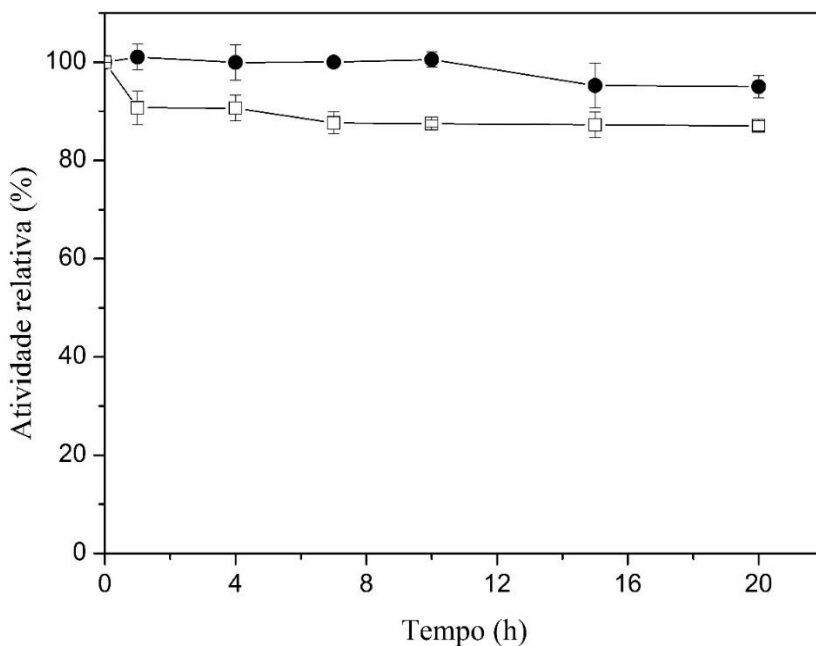
Figura 14 – Efeito da temperatura após 2 h de incubação na atividade da lipase livre (□) e lipase imobilizada (●).



#### 4.4.5 Estabilidade à temperatura

Lipase de *Thermomyces lanuginosus* é uma enzima bastante estável, entretanto, qualquer melhoria na sua estabilidade pode ser interessante para ampliar ainda mais a sua gama de aplicações (CIPOLATTI et al., 2015). Com base nisso, a estabilidade à temperatura em função do tempo de exposição também foi estudada. A Figura 15 mostra a atividade residual da NS-40116 livre e imobilizada (PS) a 50 °C durante 20 h. Para a enzima livre, houve uma queda na atividade de 9,3% após a primeira hora de incubação, mantendo-se relativamente estável após este tempo, chegando a 13% de redução ao final de 20 h. A enzima imobilizada também apresentou boa estabilidade à temperatura de 50 °C, mostrando valores levemente superiores aos obtidos para a enzima livre.

Figura 15 – Estabilidade à temperatura de 50 °C da enzima livre (□) e imobilizada em poliestireno (●) durante 20 h.



Fonte: Acervo da autora.

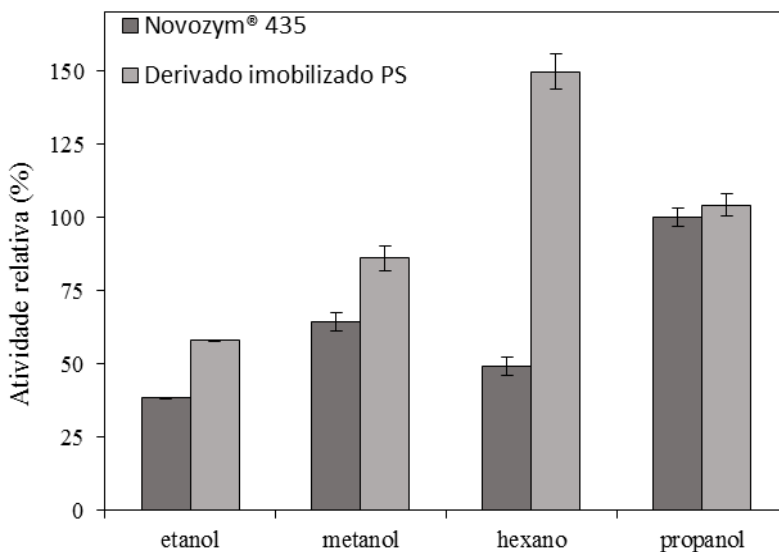
#### 4.4.6 Influência de solventes orgânicos na atividade hidrolítica de lipases

A estabilidade em ambiente orgânico é uma importante propriedade da lipase. O efeito do meio orgânico depende da natureza da enzima e dos solventes (HAZARIKA et al., 2002). As estabilidades da lipase imobilizada PS e lipase comercial Novozym<sup>®</sup> 435 foram investigadas em alguns solventes orgânicos à temperatura ambiente (Figura 16). Para o derivado imobilizado neste estudo, a incubação em etanol resultou numa queda de atividade hidrolítica de 42%, e para o metanol, uma queda de aproximadamente 14%. Os resultados se mostraram mais desfavoráveis para a lipase Novozym<sup>®</sup> 435, em que se obteve queda de 62% para o etanol e 36% para o metanol. Hernández-Martín; Otero (2008) também verificaram um efeito de inativação da Novozym<sup>®</sup> 435 na presença de álcoois de baixo peso molecular. No estudo deles, metanol e etanol foram utilizados em reações de transesterificação.

Na presença de hexano, a lipase PS apresentou uma ativação ao final de 2 h, o que resultou no aumento de sua atividade em cerca de 49%. Já para a Novozym<sup>®</sup> 435, a incubação em hexano não teve o mesmo efeito, contrariamente, o resultado foi uma inativação após contato com o solvente. Quando incubadas em propanol, as duas enzimas se mostraram estáveis quanto à sua atividade de hidrólise. Dependendo da natureza da lipase, alguns solventes podem ter a capacidade de manter a conformação estrutural ativa da enzima, o que resulta na manutenção ou maior atividade da lipase quando exposta ao solvente orgânico (PEREIRA et al., 2015).

O logaritmo do coeficiente de partição de um composto entre n-octanol e água ( $\log P$ ), tem sido largamente empregado para prever o rendimento de uma reação, em presença de um determinado solvente. A atividade da maioria das lipases é baixa em solventes hidrofílicos ( $\log P < 2$ ), já que eles podem inativar ou desnaturar o biocatalisador. Já para  $2 < \log P < 4$ , a atividade é relativamente variável, e para solventes hidrofóbicos com  $\log P > 4$ , a atividade é alta (ADLERCREUTZ, 1996; MONTEIRO; NASCIMENTO; NINOW, 2003). Os valores de  $\log P$  para o etanol, metanol, propanol e hexano, são respectivamente -0,30, -0,74, 0,25 e 3,5 (SANGSTER, 1989). Logo, essas considerações também podem explicar o comportamento dos derivados imobilizados.

Figura 16 – Influência de solventes orgânicos na atividade hidrolítica de lipases.

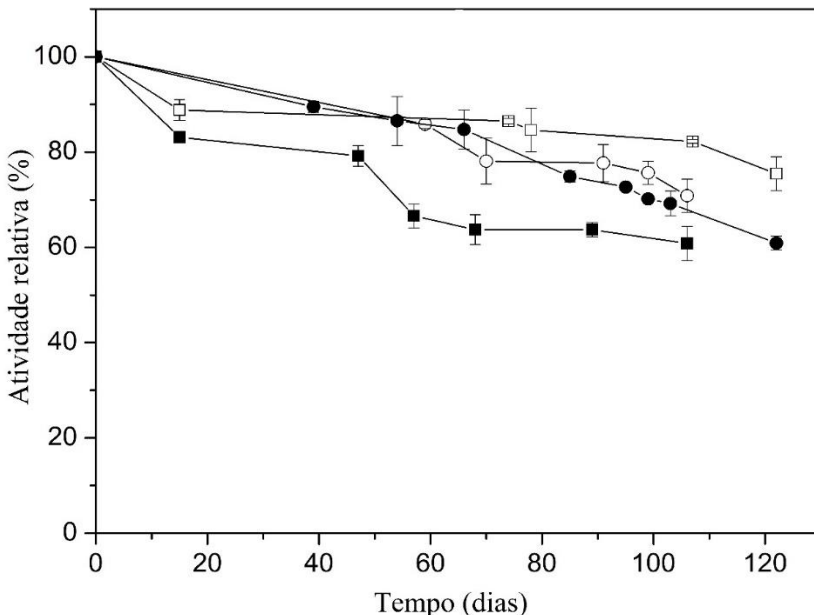


Fonte: Acervo da autora.

#### 4.4.7 Estabilidade ao armazenamento

A Figura 17 apresenta os resultados para as atividades da enzima imobilizada e livre durante o armazenamento a 6 °C e temperatura ambiente. A enzima imobilizada PS manteve sua atividade em 89% durante 39 dias a 6 °C, enquanto que à temperatura ambiente, apresentou uma atividade relativa de 83% após 15 dias de estocagem. Para a enzima livre, o armazenamento em temperatura ambiente também resultou em maior perda de atividade, retendo 70% ao fim de 106 dias, ao passo que, sob refrigeração, a lipase livre manteve 75% em 122 dias de incubação. Assim, os resultados sugerem que para ambas as enzimas, o armazenamento sob refrigeração é mais eficiente na manutenção de suas propriedades catalíticas.

Figura 17 – Estabilidade ao armazenamento das enzimas livre e imobilizada: livre à 6 °C (□), livre à temperatura ambiente (○), derivado imobilizado PS à 6 °C (●) e derivado imobilizado PS à temperatura ambiente (■).



Fonte: Acervo da autora.

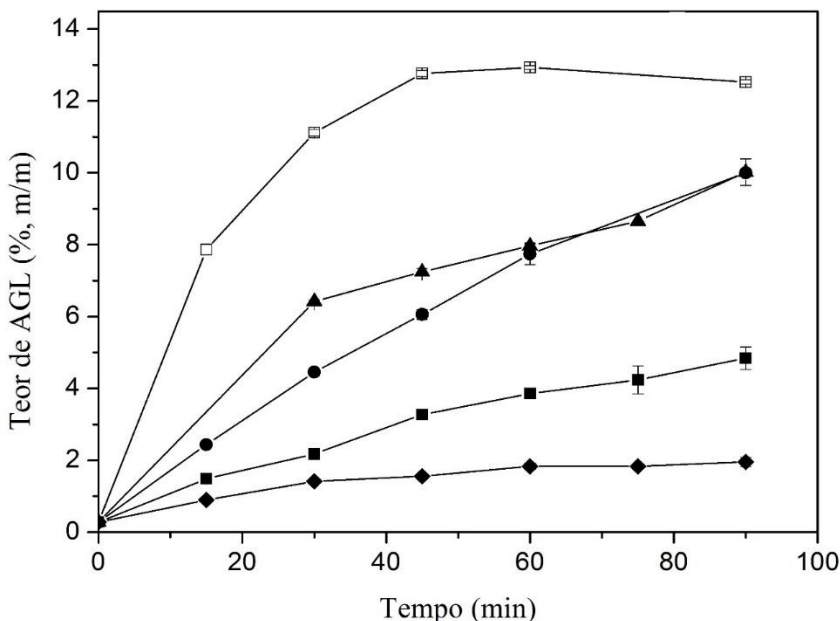
#### 4.5 APLICAÇÃO DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA NA HIDRÓLISE DO ÓLEO DE SOJA

A hidrólise do óleo de soja foi realizada para conhecer o potencial da enzima livre e sua forma imobilizada (Figura 18). Inicialmente, uma reação foi conduzida com 1,41 g da lipase imobilizada. Como a conversão em ácidos graxos (1,95% ao final de 90 min) foi bem menor se comparado com a enzima livre (12,52%), optamos por aumentar a massa do derivado enzimático gradativamente até se obter um valor que se aproximava do resultado da lipase livre. Para as quantidades de 10,0 g e 15,0 g, os valores de acidez foram bem próximos um do outro (9,99 e 10,01%, respectivamente). Assim, por questões de custo-benefício, definiu-se como condição ótima para este estudo a massa de 10,0 g do derivado imobilizado PS, que representa uma quantidade 20x maior do que a massa



utilizada da NS-40116 livre. As reações de transesterificação e esterificação discutidas nos próximos tópicos foram feitas baseadas nestas informações.

Figura 18 – Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja com diferentes concentrações dos biocatalisadores: 1,41 g do derivado imobilizado PS (◆), 5,0 g do derivado imobilizado PS (■), 10,0 g do derivado imobilizado PS (●), 15,0 g do derivado imobilizado PS (▲), e 0,5 g da lipase NS-40116 livre (□).



Fonte: Acervo da autora.

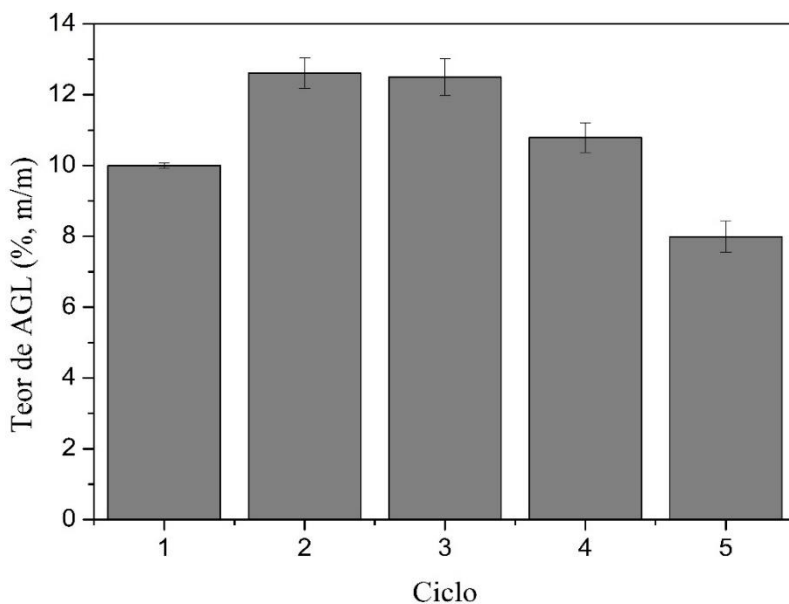
Os resultados foram parecidos com o trabalho de Cesarini; Diaz; Nielsen (2013). Eles estudaram uma reação de transesterificação onde foi utilizado óleo de soja bruto (20 g) como substrato e lipase livre Callera Trans L (1% m/m) como catalisador. Foi constatado que a hidrólise do óleo ocorreu nas três primeiras horas de reação, resultando em uma acidez de aproximadamente 26% quando utilizado 3% de água. Cabe ressaltar que no presente trabalho foi utilizado óleo de soja refinado (100 g), 2% de água e 0,5% da lipase livre, o que pode explicar a diferença nos valores obtidos.

#### **4.5.1 Estudo de sucessivos ciclos de uso do derivado enzimático imobilizado em poliestireno PS na hidrólise do óleo de soja refinado**

A capacidade de reutilização constitui-se em um dos parâmetros mais importantes para avaliar a viabilidade econômica e aplicação industrial de biocatalisadores imobilizados. Melhorias na estabilidade operacional podem tornar a utilização de enzimas imobilizadas mais vantajosa que a sua respectiva forma solúvel. Os resultados para os reusos são apresentados na Figura 19.

A avaliação da reutilização apresentou resultados promissores. No segundo e terceiro ciclos, houve um aumento na conversão em ácidos graxos livres. O que pode estar correlacionado com este fenômeno é o fato de que a enzima foi lavada com hexano seguido de água após cada reação de hidrólise, depois foi seca em temperatura ambiente, e reutilizada em um novo ciclo. Como já visto na seção 4.4.6, o contato da enzima com hexano resultou em melhora na atividade hidrolítica da lipase. No quarto ciclo de reação houve uma queda na porcentagem de ácidos graxos, no entanto, a quantidade ainda foi superior se comparado ao primeiro ciclo, já no quinto uso da enzima imobilizada, a queda no rendimento foi de 20,12%. Os resultados indicam que a lipase imobilizada por retenção física nas partículas de poliestireno pode ser utilizada em vários ciclos com baixa perda de atividade catalítica.

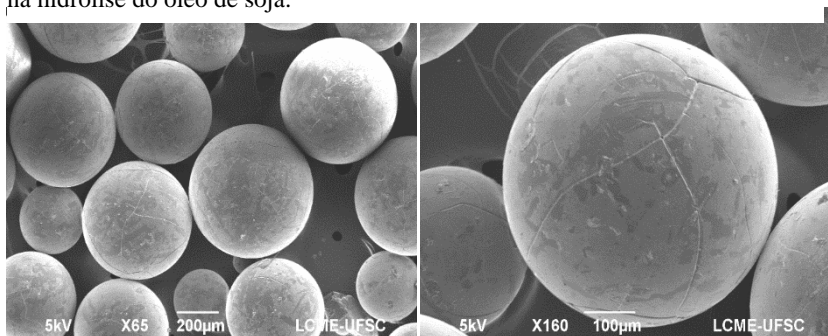
Figura 19 – Estudo de reutilização da lipase imobilizada.



Fonte: Acervo da autora.

A influência do reuso nas características superficiais do suporte foram investigados por microscopia eletrônica de varredura (Figura 20). Como pode ser observado, após 5 ciclos de uso, as partículas apresentaram alterações superficiais como a presença de fissuras.

Figura 20 – Imagens MEV da lipase imobilizada após sucessivos ciclos de uso na hidrólise do óleo de soja.



Fonte: Acervo da autora.

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA GORDURA ABDOMINAL DE FRANGO, GORDURA ABDOMINAL DE FRANGO APÓS HIDRÓLISE, E ÁCIDO GRAXO VEGETAL COMERCIAL

A Tabela 10 apresenta o perfil de ácidos graxos da gordura abdominal de frango, verifica-se que a gordura é composta por 71,34% de ácidos graxos insaturados, e apresenta uma massa molar de 861,05 g mol<sup>-1</sup>.

Tabela 10 – Perfil de ácidos graxos da gordura abdominal de frango.

Ácidos graxos	%
C16:0 – Palmítico	23,68
C16:1 – Palmitoleico	5,50
C18:0 – Esteárico	4,98
C18:1 – Oléico	40,40
C18:2 – Linoléico	25,44
Total	100

As amostras de gordura abdominal de frango apresentaram um índice de acidez de  $0,755 \pm 0,03$  mg KOH.g<sup>-1</sup>. Após hidrólise enzimática com lipase Lipozyme TL IM, este índice subiu para  $112,32 \pm 2,45$  mg KOH.g<sup>-1</sup>, resultado este que implica em considerável aumento no teor de ácidos graxos livres e subsequente eficiência do método. Para o ácido

graxo vegetal comercial SGS foi encontrado um índice de acidez de  $172,35 \pm 0,15$  mg KOH.g<sup>-1</sup>.

#### 4.6.1 Síntese enzimática de ésteres metílicos

Neste estudo, diferentes biocatalisadores foram comparados uns com os outros na reação de metanólise, utilizando como fonte de ácidos graxos o hidrolisado da gordura de frango obtido neste trabalho e ácido graxo comercial SGS. As reações foram conduzidas a 32 °C por 16 e 24 h com agitação orbital de 250 rpm e razão molar ácido graxo metanol de 1:4,5. O excesso de álcool foi empregado para assegurar conversões elevadas e para minimizar as possíveis limitações difusionais na taxa de reação.

A Tabela 11 mostra que para a maioria dos biocatalisadores (derivado imobilizado PS, Novozym<sup>®</sup> 435 e NS 88011), uma conversão mais elevada foi obtida com o ácido graxo comercial SGS. Este fenômeno já era esperado visto que não se soube se o hidrolisado da gordura de frango continha traços de triacilglicerol, diacilglicerol e monoacilglicerol. Pelo índice de acidez, a quantidade de ácidos graxos livres também era maior no ácido graxo comercial SGS do que no hidrolisado da gordura de frango. Contudo, boas conversões também foram obtidas com o hidrolisado, chegando a 80,75 % em ésteres com a lipase NS 88011 e 73,15% com a Novozym<sup>®</sup> 435. A lipase imobilizada por retenção física em poliestireno PS apresentou faixa de conversão de 53,15% e 51,95% em 16 e 24 h de reação, respectivamente. Já para o ácido graxo SGS em conjunto com o derivado imobilizado PS, foi obtido uma conversão de 65,16% em 16 h, um valor notoriamente maior se comparado com a enzima livre nas mesmas condições (43,52%).

Tabela 11– Síntese enzimática de ésteres metílicos por esterificação a partir de duas fontes de ácidos graxos livres.

Biocatalisador	Ácido Graxo SGS		Hidrolisado da Gordura de Frango Teor de ésteres (%)	
	16 h	24 h	16 h	24 h
NS-40116 livre <sup>a</sup>	43,52	-	50,49	-
PS <sup>b</sup>	65,16	-	53,15	51,95
Novozym <sup>®</sup> 435 <sup>c</sup>	78,20	-	73,15	-
NS 88011 <sup>b</sup>	-	86,60	-	80,75

<sup>a</sup> A massa de lipase utilizada no sistema foi de 0,3% (0,03 g) para todas as reações;

<sup>b</sup> Para estas enzimas utilizou-se 6% em massa (0,60g) nas reações.

° A massa de lipase utilizada no sistema foi de 2% (0,20 g) para todas as reações.

Foram encontrados na literatura outros estudos sobre hidrólise seguida de esterificação (duas etapas). Talukder et al. (2010) estudaram o processo de hidroesterificação (enzima/enzima) utilizando como matéria-prima o óleo de palma bruto. O óleo foi hidrolisado e em seguida, esterificado, as lipases utilizadas foram lipase de *Candida rugosa* e Novozym® 435, respectivamente. Após 2 horas de reação foi possível obter 98 % de ésteres metílicos.

Watanabe, et al. (2007) investigaram a hidrólise seguida da esterificação da borra ácida (subproduto do refino de óleos vegetais). Ambos os processos foram enzimáticos, no qual se utilizaram lipases imobilizadas de *Candida rugosa* e *Candida antarctica*, respectivamente. A reação de esterificação foi livre de solvente orgânico, e ao final de 24 h foi possível obter 91 % de ésteres metílicos.

Weng et al. (2011) investigaram a hidroesterificação enzimática do óleo de soja, utilizando na hidrólise e na esterificação a lipase de *Yarrowia lipolytica* em suas diferentes formas, livre e imobilizada, respectivamente. Através da hidrólise foi possível obter 92.5 % de ácidos graxos livres, e pelo processo de esterificação conseguiu-se 85 % de ésteres etílicos.

De modo geral, os resultados apontam que a hidroesterificação pode ser utilizada com sucesso na obtenção de ésteres, e no presente trabalho, a enzima imobilizada PS apresentou potencial de aplicação nesse campo, pois se comparado com a mesma enzima livre, nota-se uma melhora na conversão de ésteres.

#### 4.7 APLICAÇÃO DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA NA SÍNTESE DE ÉSTERES METÍLICOS VIA TRANSESTERIFICAÇÃO

A Tabela 12 apresenta os dados obtidos nas reações de transesterificação que foram conduzidas por 6 e 24 h à 32 °C com agitação orbital de 250 rpm, 2% de água e razão molar gordura de frango metanol de 1:4,5. Em 16 h, foi atingido uma conversão em ésteres de 89% para a lipase livre, chegando a 99% quando se aumentou o tempo para 24 h. A extensão do tempo de reação também foi vantajosa para o derivado imobilizado PS, pois de 16 h para 24 h, a conversão que era de 33% passou para 47%. Este derivado apresentou melhor potencial na transesterificação do que a lipase imobilizada NS 88011, que já é uma enzima comercial, dado que através dela foi obtido 29 % em ésteres

durante 24 h de reação. O cromatograma de um dos ensaios (enzima PS, 24 h) está disponibilizado no Apêndice C.

Tabela 12 – Síntese enzimática de ésteres metílicos por transesterificação a partir de gordura abdominal de frango.

<b>Biocatalisador</b>	<b>Teor de ésteres (%)</b>	
	<b>16 h</b>	<b>24 h</b>
NS-40116 livre <sup>a</sup>	89,25	99,18
PS <sup>b</sup>	33,93	47,56
NS 88011 <sup>b</sup>	-	29,51

<sup>a</sup> A massa de lipase utilizada nas reações foi de 0,3% (0,03 g);

<sup>b</sup> Para estas enzimas utilizou-se 6% em massa (0,60g) nas reações.

Menores rendimentos em termos de éster das enzimas imobilizadas podem estar relacionados aos efeitos difusionais causados pela transferência de massa entre o meio líquido e os biocatalisadores imobilizados. Essas limitações podem ser resumidas em duas fases: transferência de massa externa, que envolve a transferência de reagentes/substratos do meio reacional até a superfície do suporte de imobilização, e a transferência de massa interna, que descreve a transferência de reagentes/substratos no suporte de imobilização até o sítio ativo da enzima. Qualquer etapa da difusão pode limitar a atividade global da enzima imobilizada, levando à redução do rendimento em éster (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

Levando em conta estas observações e os resultados encontrados, a enzima imobilizada PS tem potencial para ser empregada em processos de transesterificação e esterificação, pois os dados podem ser otimizados a partir de um estudo mais detalhado com possíveis alterações na temperatura, razão molar, número de adições do álcool, agitação e concentração do derivado. Por exemplo, a resistência à transferência de massa diminui com o aumento da vazão (sistemas contínuos) e da agitação (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009).





## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

### 5.1 CONCLUSÕES

A lipase NS-40116 foi imobilizada em partículas de poliestireno por diferentes métodos de interação enzima-suporte: por adsorção ao suporte, retenção física em matriz, e ligação covalente utilizando tratamento com glutaraldeído.

O processo de imobilização que possibilitou a maior atividade enzimática foi a adsorção ao suporte em micropartículas (7,96 U/g) seguido da retenção física em matriz (2,87 U/g). Através das fotomicroscopias analisadas pelo MEV e o EITF, foi confirmada a imobilização da enzima nas diferentes metodologias desenvolvidas, respectivamente. O derivado imobilizado por retenção física em matriz foi o escolhido para prosseguir com os estudos, pela facilidade de obtenção e também pelo tamanho das partículas (que facilita seu uso na metanólise utilizando gordura abdominal de frango como substrato).

A lipase imobilizada apresentou maior estabilidade em relação às variações de temperatura do que a sua forma livre, o que reflete na flexibilidade operacional, uma vantagem importante para as aplicações industriais. Ao avaliar os parâmetros cinéticos, a lipase imobilizada mostrou maior afinidade da enzima pelo substrato, e  $V_{\text{máx}}$  de 4,48  $\mu\text{mol}/\text{min g}$ . A enzima imobilizada apresentou melhor estabilidade ao pH do que a sua respectiva forma livre, chegando a alcançar um aumento de 84% em sua atividade hidrolítica após incubação com tampão pH 12. Na hidrólise do óleo de soja, o derivado demonstrou estabilidade operacional após cinco ciclos de uso.

Lipase livre e imobilizada foram utilizadas na síntese de ésteres metílicos via esterificação e transesterificação. Quando utilizado o ácido graxo comercial como substrato na esterificação, foi observado que o biocatalisador imobilizado em PS apresentou uma alta conversão (65%) em ésteres metílicos se comparado com a enzima livre (43%). A utilização do hidrolisado da gordura de frango como fonte de ácidos graxos permitiu conversão de 53% em 16 h de reação para a enzima imobilizada em PS, enquanto que para a enzima livre foi obtido 50% em 16h.

Desse modo, o protocolo utilizado proporciona uma abordagem eficiente e fácil para a síntese da enzima imobilizada, uma vez que a imobilização pode ser feita em uma única etapa (junto à polimerização do estireno). Além disso, este trabalho pode ser facilmente adaptado para a

imobilização de outras enzimas, contribuindo para estudos sobre imobilização e estabilização de enzimas.

## 5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineadas:

- Variar a concentração de glutaraldeído e juntamente, avaliar o efeito da concentração na eficiência de imobilização e na estabilidade da enzima imobilizada;
- Testar a imobilização com o auxílio de outros aditivos (por exemplo, polietilenoimina);
- Comparar a estabilidade térmica da lipase livre e imobilizada em tempos mais longos;
- Variar a razão molar, tempo de reação, temperatura, concentração de enzima, número de adições do álcool, visando otimizar a produção de éster;
- Avaliar a capacidade de reuso da enzima imobilizada na síntese de ésteres;
- Estudar as propriedades mecânicas do suporte.

## REFERÊNCIAS

ADLERCREUTZ, P. Modes of using enzymes in organic media. In: KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M. **Enzymatic reactions in organic media**. London: Chapman & Hall, 1996. p. 9-42.

ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6406-6436, 2013.

ADRIANO, W. S.; FILHO, E. H. C.; SILVA, J. A.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, p. 529-538, 2005.

AkzoNobel, de Trigono<sup>x</sup>® 141, Chicago – Estados Unidos da América, 2008.

ALBERTSSON, A. C.; HUANG, S. J. **Degradable polymers, recycling, and plastics waste management**. New York (USA): Marcel Dekker Inc., 1995.

ALPTEKIN, E.; CANAKCI, M.; SANLI, H. Biodiesel production from vegetable oil and waste animal fats in a pilot plant. **Waste Management**, v. 34, p. 2146–2154, 2014.

ANDRADE, L. H.; REBELO, L. P.; NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 55-62, 2010.

AOCS, American Oil Chemists' Society. Official Method Cd 3d-63. In **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**; Firestone, D., 5th ed.; AOCS: Champaign, USA, 1973.

AOCS, American Oil Chemists' Society. Official Method Ce 2-66. Preparation of methyl esters of fatty acids. In **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**; AOCS Press, 6th ed.; Urbana, IL, USA, 2013.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1767, p.1073–1101, 2007.

BEUVE, R. S.; MORISON, K.R. Enzymatic hydrolysis of canola oil with hydrodynamic cavitation. **Chemical Engineering and Processing**, v.49, p.1101–1106, 2010.

BILLMEYER, F. W. **TextBook of Polymer Science**. 3rd ed., New York, J. Wiley, 1984.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; FERNÁNDEZ-PÉRES, M.; OTERO, C.; DÍAZ-GONZÁLEZ, G. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: characterization of the support and the catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 83-93, 2004.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, 73-81, 2002.

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

CAO, L. **Carrier-bound Immobilized Enzymes. Principles, Applications and Design**. 1°. Wiley-VHC: The Netherlands, 2005. 531.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, p. 175-187, 2009.

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2015.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, v. 23, p. 60-72, 2006.

CASTRO, H. F. D.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. I. Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CENTENARO, G. S.; FURLAN, V. J. M.; SOUZA-SOARES, L. A. Gordura de frango: alternativas tecnológicas e nutricionais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n.3, p. 619-630, 2008.

CÉSAR, A. S.; BATALHA, M. O. Biodiesel production from castor oil in Brazil: A difficult reality. **Energy Policy**, v. 38, v. 8, p. 4031- 4039, 2008.

CESARINI, S.; DIAZ, P.; NIELSEN, P. M. Exploring a new, soluble lipase for FAMES production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 484-487, 2013

CHEN, Y.Z.; YANG, C.T.; CHING, C.B.; XU, R. Immobilization of Lipases on Hydrophobilized Zirconia Nanoparticles: Highly Enantioselective and Reusable Biocatalysts. **Langmuir**, v.24, p. 8877-8884, 2008.

CHIARADIA, V.; SOARES, N. S.; VALERIO, A.; OLIVEIRA, D.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on Magnetic Poly(Urea-Urethane). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, DOI 10.1007/s12010-016-2116-6, 2016.

CHIOU, S.-H.; WU, W.-T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v. 25, n. 2, p. 197–204, 2004.

CHIU, M. C.; GIOIELLI, L. A. Conteúdo de gordura sólida da gordura abdominal de frango, de suas estearinas e de suas misturas binárias com toucinho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 151- 157, 2002.

CIPOLATTI, E. P.; VALÉRIO, A.; NICOLETTI, G.; THEILACKER, E.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on PEGylated poly(urea-urethane) nanoparticles by step miniemulsion polymerization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 109, p. 116-121, 2014.

CIPOLATTI, E. P.; MORENO-PÉREZ, S.; SOUZA, L. T. A.; VALÉRIO, A.; GUISÁN, J. M.; DE ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C.;

NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D.; PESSELA, B. C. 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.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**. Petrópolis: Epub, 2008.

COUTINHO, F. M. B.; COSTA, M. P. M.; GUIMARÃES, M. J. O. C.; SOARES, B. G. Estudo Comparativo de Diferentes Tipos de Polibutadieno na Tenacificação de Poliestireno. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 4, p. 318-324, 2007.

CUI, Y.; CHEN, X.; LI, Y.; LIU, X.; LEI, L.; XUAN, S. Novel magnetic microspheres of P (GMA-b-HEMA): preparation, lipase immobilization and enzymatic activity in two phases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 147–156, 2012.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.

DE CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; DE MOARES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização In: (Ed.). **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 6, p.123-150.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. EN 14103: fat and oil derivatives – fatty acid methyl esters (FAME) – determination of ester and Linolenic acid methyl ester contents. Berlin, 2003. 10 p.

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

EBEWELE, R. O. **Polymer Science and Technology**. New York: CRC Press, 1996.

EL-AASSAR, M. Functionalized electrospun nanofibers from poly (AN-co-MMA) for enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85, p. 140-148, 2013.

EMBRAPA. Embrapa Suínos e Aves. Paulo Giovanni de Abreu; Martha Mayumi Higarashi; Anildo Cunha Junior. **Transesterificação com catálise ácida de resíduos de gordura de frango para produção de biodiesel: resultados preliminares**. 27 jun. 2012. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/79755/1/transesterificacao-residuos-gordura-frango-Engormix.com.pdf> >. Acesso em: 14 nov. 2016.

ENCARNAÇÃO, A. P. G. **Geração de biodiesel pelos processos de transesterificação e hidroesterificação, uma avaliação econômica**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FAN, D.; REN, X.; WANG, H.; WU, D.; ZHAO, D.; CHEN, Y.; WEI, Q.; DU, B. Ultrasensitive sandwich-type photoelectrochemical immunosensor based on CdSe sensitized La-TiO<sub>2</sub> matrix and signal amplification of polystyrene@Ab<sub>2</sub> composites **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 593-599, 2017.

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

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

FESSNER, W. D.; ANTHONSEN, T. **Modern biocatalysis: stereoselective and environmentally friendly reactions**. New York: Wiley, 2008.

FISCHER, J. **Hidrólise de lactose por beta-galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em reator leito fixo**. 2010. 136 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Uberlândia.

FRAMPTON, M. B.; ZELISKO, P. M. Chain length selectivity during the polycondensation of siloxane-containing esters and alcohols by immobilized *Candida antarctica* lipase B. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 58-59, p. 87-92, 2014.

FURIGO JR, A.; PEREIRA, E. B. **Enzimas e suas aplicações** – Cinética enzimática. 2001. 39f. (Apostila) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

GAIS, H. J.; THEIL, F. Hydrolysis and formation of carboxylic acid esters. In: DRAUZ, K. e WALDMANN, H. (Ed.). **Enzyme catalysis in organic synthesis**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. v. 2, p. 335-578.

GAO, J.; SHI, L.; JIANG, Y.; ZHOU, L.; HE, Y. Formation of lipase *Candida* sp. 99–125 CLEAs in mesoporous silica: characterization and catalytic properties. **Catalysis Science & Technology**, v. 3, p. 3353–3359, 2013.

GARCIA, A.; OH, S.; ENGLER, C. R. Cellulase immobilization on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and characterization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, n. 3, p. 321-326, 1989.

GARCIA-GALAN, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, 2011.

GERIS, R.; Dos SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja – reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**, v. 30, n. 5, 1369-1373, 2007.

GIOIELLI, L. A.; PITOMBO, R. N. M.; VITOLO, M.; BARUFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N.; MORENO, P. C. Enzymatic hydrolysis of oil and fats. **Rivista Italiana Sostanze Grasse**, v. 72, p. 115-117, 1995.

GROSOVA, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and applications of immobilised beta-galactosidase in food industry - a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2008.



GUAN, G.; KUSAKABLE, K.; SAKURAI, N. Transesterification of vegetable oil to biodiesel fuel using acid catalysts in the presence of dimethyl ether. **Fuel**, v. 88, n. 1, p. 81-86, 2009.

GUPTA, M. N. Methods in non-aqueous enzymology. In: BLOT, M. (Ed.). **Methods and Tools in Biosciences and Medicine**. Basel: Birkhäuser-Verlag, 2000.

HALMA, M. **Síntese e caracterização de metaloporfirinas aniônicas imobilizadas em suportes inorgânicos: estudo de diferentes estratégias de imobilização e investigação da atividade catalítica**. 2008. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

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

HAZARIKA, S.; GOSWAMI, P.; DUTTA, N. N.; HAZARIKA, A. K. Ethyl oleate synthesis by porcine pancreatic lipase in organic solvents. **Chemical Engineering Journal**, v. 8, p. 61-85, 2002.

HELWANI, Z.; OTHMAN, M. R.; AZIZ, N.; FERNANDO, W. J. N.; KIM, J. Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: a review. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 12, p. 1502-1514, 2009.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym<sup>®</sup> 435 and Lipozyme<sup>®</sup> TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 277–286, 2008.

HUDSON, E. P.; EPPLER, R. K.; CLARK, D. S. Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 637–643.

JAFARY, F.; PANJEHPUR, M.; VARSHOSAZ, J.; YAGHMAEI, P. Stability improvement of immobilized alkaline phosphatase using chitosan nanoparticles. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 02, p. 243-250, 2016.

KAMORI, M.; HORI, T.; YAMASHITA, Y.; HIROSE, Y.; NAOSHIMA, Y. Immobilization of lipase on a new inorganic ceramics

support, toyonite, and the reactivity and enantioselectivity of the immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 269–274, 2000.

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

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, v.31, n.1, p.134-143, 2008.

KLEIN, M. P.; NUNES, M. R.; RODRIGUES, R. C.; BENVENUTTI, E. V.; COSTA, T. M. H.; HERTZ, P. F.; NINOW, J. L. Effect of the Support Size on the Properties of  $\beta$ -Galactosidase Immobilized on Chitosan: Advantages and Disadvantages of Macro and Nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 2456–2464, 2012.

KOVALENKO, G.A.; BEKLEMISHEV, A.B.; PERMINOVA, L.V.; MAMAEV, A.L.; RUDINA, N.A.; MOSEENKOV, S.; KUZNETSOV, V.L. Immobilization of recombinant *E. coli* thermostable lipase by entrapment inside silica xerogel and nanocarbon-in-silica composites. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.98, p.78–86, 2013.

KUMAR, M.; MUKHERJEE, J.; SINHA, M.; KAUR, P.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N.; SINGH, T. P. Enhancement of stability of a lipase by subjecting to three phase partitioning (TPP): structures of native and TPP-treated lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **Sustainable Chemical Processes**, v. 3, n. 4, p. 1-10, 2015.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083-1095, 2010.

LIMA, J. S.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C.; SOUZA, A. A. U.; VIEGAS, A. C.; OLIVEIRA, D. Cellulase immobilization on magnetic nanoparticles encapsulated in polymer nanospheres. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, DOI 10.1007/s00449-016-1716-4, 2016.

LIMA, J. S. **Imobilização de celulase em nanopartículas magnéticas encapsuladas em poli(metacrilato de metila)**. 2016. 89 f. Dissertação

(Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

LIMA, L. N.; OLIVEIRA, G. C.; ROJAS, J.; CASTRO, H. F.; Da RÓS, P. C. M.; MENDES, A. A.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOL, P. W. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 523–535, 2015.

LI, Y.; GÃO, F.; WEI, W.; QU, J.; MA, G.; ZHOU, W. Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 182-189, 2010.

LI, Z. Y.; WARD, O. P. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate in organic solvent. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, p. 745-748, 1993.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S. HILL, C. G. Amundson CH. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 426-446, 1992.

MARULANDA, V. F.; ANITESCU, G.; TAVLARIDES, L. L. Investigations on supercritical transesterification of chicken fat for biodiesel production from low-cost lipid feedstocks. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 53-60, 2010.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MATOS, L. M. C. **Hidrólise parcial do óleo de palma catalisada por lipases sob irradiação de micro-ondas. Síntese de diacilglicerol**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MENG, X.; XU, G.; ZHOU, Q.L.; WU, J.P.; YANG, L.R. Highly efficient solvent-free synthesis of 1,3-diacylglycerols by lipase immobilized on nano-sized magnetite particles. **Food Chemistry**, v.143, p.319–324, 2014.

MENDES, A. A.; De CASTRO, H. F.; De S. RODRIGUES, D.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P. W.; MAMMARELLA, E. J.; De C. GIORDANO, R.; De L. C. GIORDANO, R. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: Influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 1055-1066, 2011a.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011b.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P.C.; VÉLEZ, A.M.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C.; CASTRO, H.F. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 503-511, 2012.

MILETIĆ, N.; ABETZ, V.; EBERT, K.; LOOS, K. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on Polystyrene Nanoparticles. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 31, p. 71-74, 2010.

MISHIMA, D.; TATEDA, M.; IKE, M.; FUJITA, M. Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2166-2172, 2006.

MISHRA, A.; SARDAR, M. Cellulase assisted synthesis of nano-silver and gold: Application as immobilization matrix for biocatalysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 105-113, 2015.

MONTEIRO, J. B.; NASCIMENTO, M. G.; NINOW, J. L. Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous system. **Biotechnology letters**, v. 25, n. 8, p. 641-644, 2003.

MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, p. 57-66, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger: princípios da bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

NYARI, N. L. D.; FERNANDES, I. A.; BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; STEFFENS, C.; OLIVEIRA, D.; ZENI, J.; RIGOC, E.; DALLAGO, R. M. In situ immobilization of *Candida antarctica* B lipase in polyurethane foam support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 124, p. 52–61, 2016.

NICOLETTI, G.; CIPOLATTI, E. P.; VALÉRIO, A.; CARBONERA, N. G.; SOARES, N. S.; THEILACKER, E.; NINOW, J. L; DE OLIVEIRA, D.. Evaluation of different methods for immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CalB lipase) in polyurethane foam and its application in the production of geranyl propionate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, p. 1739–1748, 2015.

NISHA, S.; KARTHICK, A.; GOBI, N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. **Chemical Science Review and Letters**, v. 1, p. 148, 2012.

OGURI, R. T. **Estudo de condições operacionais na produção de penicilina G acilase por diferentes microrganismos**. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP.

ORDÓÑEZ J. A. **Tecnologia de Alimentos – componentes dos alimentos e processos**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005.

PATEL R. N.; Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p. 804-826, 2002.

PDB ID: 4ZGB. KUMAR, M.; SINHA, M.; MUKHERJEE, J.; GUPTA, M. N.; KAUR, P.; SHARMA, S.; SINGH, T. P. (2015). Structure of untreated lipase from *Thermomyces lanuginosa* at 2.3 Å resolution.

PEREIRA, M. G.; FACCHINI, F. D. A.; FILÓ, L. E. C.; POLIZELI, A. M.; VICI, A. C.; JORGE, J. A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PASSELA, B. C.; GUISAN, J. M.; POLIZELI, M. L. T. M. Immobilized

lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 561–570, 2015.

PILISSÃO, C. **Aminólise enantiosseletiva do (R,S)-mandelato de metila e síntese do acetato de geranoíla mediada por lipase**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PIZARRO A. V. L., PARK E. Y.; Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1077-1082, 2003.

POLSHETTIWART, V.; LUQUE, R.; FIHRI, A.; ZHU, H.; BOUHRARA, M.; BASSET, J. M. Magnetically Recoverable Nanocatalysts. **Chemical Review**, v. 11, p. 3036-3075, 2011.

POURZOLFAGHAR, H.; ABNISA, F.; DAUD, W. M. A. W.; AROUA, M. K. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 61, p. 245–257, 2016.

PRICE, J.; NORDBLAD, M.; MAR TEL, H. H.; CHRABAS, B.; WANG, H.; NIELSEN, P. M.; WOODLEY, J. M. Scale-up of industrial biodiesel production to 40m<sup>3</sup> using a liquid lipase formulation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 9999, n. xxx, p. 1-10, 2016.

PURI, M.; BARROW, C. J.; VERMA, M. L. Enzyme immobilization on nanomaterials for biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 215–216, 2013.

RAMOS, L. P.; KOTHE, V.; CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F.; MUNIZ-WYPYCH, A. S.; NAKAGAKI, S.; KRIEGER, N.; WYPYCH, F.; CORDEIRO, C. S. Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 317-369, 2017.

REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 527-534, 1996.

REMONATTO, D.; SANTIN, C. M. T.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. FAME Production from Waste Oils Through Commercial Soluble Lipase Eversa Catalysis. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 254-262, 2016.

ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. **Process Biochemistry**, v.36, p.947-953, 2001.

ROSSET, I. G.; TAVARES, M. C. H.; ASSAF, E. M.; PORTO, A. L. M. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and <sup>1</sup>H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General**, v. 392, n. 1-2, p. 136-142, 2011.

ROUSSEAU, D.; MARANGONI, A. G. The effects of interesterification on the physical properties of fats. In: MARANGONI, A. G.; NARINE, S. S. **Physical properties of lipids**. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 479-527.

ROY, J. J.; ABRAHAM, T. E. Strategies in making cross-linked enzyme crystals. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 9, p. 3705-3721, 2004.

SANGSTER, J. Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 18, n. 3, p. 1111-1229, 1989.

SARKIS, C. E. **Reciclagem de poliestireno expandido (EPS) para uso na fabricação de perfilados de poliestireno (PS)**. 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SCHRODEN, R. C.; STEIN, A. 3D ordered macroporous materials. In: CARUSO, F. **Colloids and Colloid Assemblies**. New York: Wiley-VCH, 2004. p. 465.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 3, p. 199-210, 1998.

SANGHI, R.; VERMA, P. Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 501-504, 2009.

SHARMA, S.; GANGAL, S; RAUF, A. Lipase mediated hydrolysis of *Mimusops elengi Parkinsonia aculeata* and seed oils for determining the positional distribution of fatty acids. **Industrial Crops and Products**. v. 30, p. 325–328, 2009.

SHELDON, R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 467-477, 2011.

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

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013.

SHIN, H-Y.; LEE, S-H.; RYU, J-H.; BAE, S-Y. Biodiesel production from waste lard using supercritical methanol. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 134-138, 2012.

SHI, W.; LI, J.; HE, B.; YAN, F.; CUI, Z.; WU, K.; LIN, L.; QIAN, X.; CHENG, Y. Biodiesel production from waste chicken fat with low free fatty acids by an integrated catalytic process of composite membrane and sodium methoxide. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 316–322, 2013.

SILVA, J. R. P. **Produção de ésteres etílicos a partir de gordura suína**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SILVA, M. G. S.; FERREIRA, J. N.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA, F. C.; MACIEL, A. P. Estudo de viabilidade técnica da produção de biodiesel de babaçu: uma revisão crítica. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 12, n. 2, p. 434-443, 2014.



SKJOLD-JØRGENSEN, J.; VIND, J.; MOROZ, O. V.; BLAGOVA, E.; BHATIA, V. K.; SVENDSEN, A.; WILSON, K. S.; BJERRUM, M. J. Controlled lid-opening in *Thermomyces lanuginosus* lipase– an engineered switch for studying lipase function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, 2016, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.09.016.

STAMENKOVIC, O. S.; VELICKOVIC, A. V.; VELJKOVIC, V. B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, n. 11, p. 3141-3155, 2011.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

TALUKDER, M. R.; WU, J. C.; FEN, N. M.; MELISSA, Y. L. S. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 207-212, 2010.

TANG, Z. X.; QIAN, J. Q.; SHI, L. E. Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles. **Materials Letters**, v. 61, n. 1, p. 37–40, 2007.

TAN, H.; FENG, W.; JI, P. Lipase immobilized on magnetic multi-walled carbon nanotubes. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 172–176, 2012.

TERRANOVA, L.; DRAGUSIND, D. M.; MALLET, R.; VASILE, E.; STANCUD, I-C.; BEHETS, C.; CHAPPARDA, D. Repair of calvarial bone defects in mice using electrospun polystyrene scaffolds combined with  $\beta$ -TCP or gold nanoparticles. **Micron**, v. 93, p. 29-37, 2017.

TRAN, D. N.; BALKUS, K. J. A perspective of recent progress in immobilization of enzymes. **ACS Catalysis**, v. 1, p. 956-968, 2011.

VALERIO, A.; NICOLETTI, G.; CIPOLATTI, E. P.; NINOW, J. L.; ARAÚJO, P. H. H. SAYER, C.; OLIVEIRA, D. Kinetic Study of *Candida antarctica* Lipase B Immobilization Using Poly(Methyl Methacrylate) Nanoparticles Obtained by Miniemulsion Polymerization as Support. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, p. 2961–2971, 2015.

VERONESE, V. B. **Desenvolvimento e avaliação de propriedades de misturas de poliestireno (PS) e copolímeros em bloco de estireno-butadieno-estireno (SBS)**. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Escola de Engenharia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

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

WANG, T.; TURHAN, M.; GUNASEKARAN, S. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, v. 53, n. 7, p. 911-918, 2004.

WANG, W.; ZHOU, W.; LI, J.; HAO, D.; SU, Z.; MA, G. Comparison of covalent and physical immobilization of lipase in gigaporous polymeric microspheres. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, p. 2107-2115, 2015.

WANG, Y.; HSIEH, Y.-L. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 309, p. 73-81, 2008.

WATANABE, Y.; NAGAO, T.; NISHIDA, Y.; TAKAGI, Y.; SHIMADA, Y. Enzymatic Production of Fatty Acid Methyl Esters by Hydrolysis of Acid Oil Followed by Esterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 1015-1021, 2007.

WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. **Biotechnology Bioengineering**, v. 55, p. 798-806, 1997.

WIDYAN, M. I.; SHYOUKH, A. O. Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 85, n.3, p. 253-256, 2002.

WU, C.; LEE, J.; LEE, W. Protein and enzyme immobilization on non-porous microspheres of polystyrene. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 27, p. 225-230, 1998.

XU, X. Biocatalysis for lipid modifications. In: DUNFORD, N. T.; DUNFORD, H. B. **Nutritionally enhanced edible oil and oilseed processing**. Champaign: AOCS Press, 2004. p. 239-263.

YILMAZ, E.; CAN, K.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 499–506, 2011.

YILMAZ, E.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic sol-gel composite supports for enzymatic resolution of (R,S)-Naproxen methyl ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1-2, p. 35–41, 2011.

ZENEVICZ, M. C. P. **Hidroesterificação enzimática de óleos de soja e de fritura em sistema de ultrassom**. 2015. 174p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ZENEVICZ, M. C. P.; JACQUES, A.; FURIGO JR, A. F.; OLIVEIRA, V.; De OLIVEIRA, D. Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 235–241, 2016.

ZHAO, X.; FAN, M.; ZENG, J.; DU, W.; LIU, C.; LIU, D. Kinetics of lipase recovery from the aqueous phase of biodiesel production by macroporous resin adsorption and reuse of the adsorbed lipase for biodiesel preparation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p. 226–233, 2013.

ZHOU, W-O.; GU, T-Y.; SU, Z-G.; MA, G-H. Synthesis of macroporous poly(styrene-divinyl benzene) microspheres by surfactant reverse micelles swelling method. **Polymer**, v. 48, p. 1981-1988, 2007.



## APÊNDICE A – Determinação do perfil de ácidos graxos

Foi pesado entre 40 a 90 mg da amostra de gordura em um tubo de ensaio com tampa. Adicionou-se 1,5 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 N no tubo, este foi fechado e colocado num banho de água à temperatura de 100 °C por 10 minutos. Após esse tempo, o tubo foi retirado do banho e deixou-se esfriar. Então, foram adicionados 2 mL de solução metanólica de BF<sub>3</sub> 14 % e o tubo foi novamente colocado no banho durante 5 minutos. Em seguida, o tubo com a amostra esfriou por 1 minuto, adicionou-se 2 mL de heptano e agitou-se por 30 segundos. Então, adicionou-se 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio e agitou-se novamente por 30 segundos. Assim, houve a decantação das fases, a fase superior contém o solvente orgânico com os ésteres metílicos e a inferior representa a fase aquosa. Com uma pipeta de Pasteur, retirou-se a fase superior e a mesma foi colocada em um tubo de centrífuga. Em seguida, adicionou-se sulfato de sódio anidro para secar a amostra e realizou-se sua centrifugação. A amostra foi transferida para um vial para prosseguir à análise em cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC-14B) equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar SGE BPX70. O programa de temperatura utilizado no cromatógrafo foi: início a 160 °C seguido de um aquecimento (4 °C.min<sup>-1</sup>) até 230 °C, permanecendo nessa temperatura por 10 minutos. O resultado para perfil de ácidos graxos é expresso em relação à porcentagem das áreas dos picos. Essas determinações foram realizadas no Laboratório de Grasas y Aceites da Faculdade de Química da Universidad de La Republica (UDELAR) no Uruguai.



## APÊNDICE B – Determinação dos parâmetros cinéticos

Figura B.1 – Cálculo dos parâmetros cinéticos para a enzima livre descrito na seção 4.4.3.

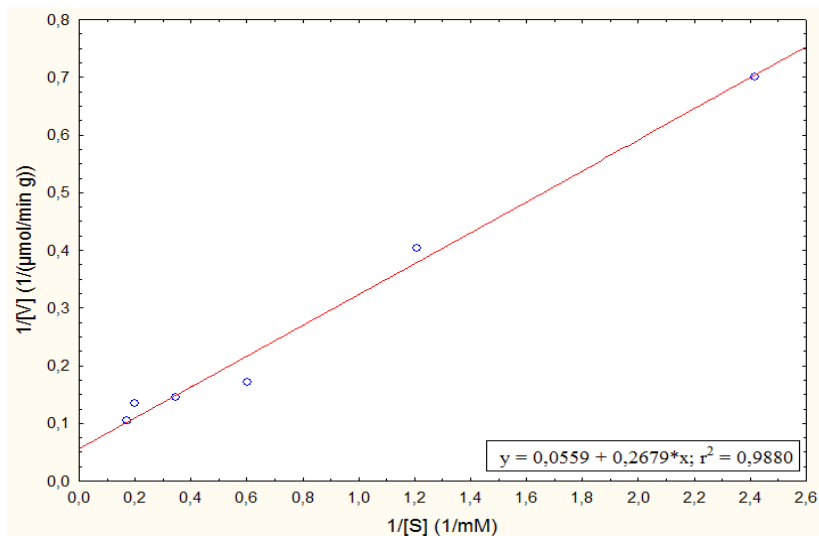
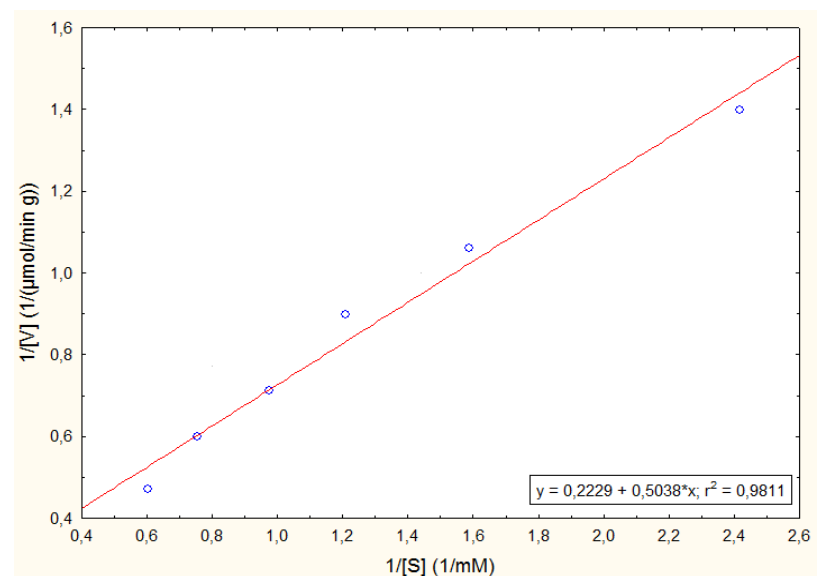


Figura B.2 – Cálculo dos parâmetros cinéticos para a enzima imobilizada (PS) descrito na seção 4.4.3.







## APÊNDICE C – Cromatograma

Figura C.1 – Cromatograma da transesterificação da gordura abdominal de frango com metanol e com o derivado enzimático imobilizado PS no tempo de 24 horas, nas condições de 32 °C, 6 % m/m de concentração do derivado enzimático, 2% m/m concentração de água, razão molar de 1:4.5 de gordura de frango:metanol, em agitação de 250 rpm.



