

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

JÉSSICA BORGES DE OLIVEIRA

**LIPASES IMOBILIZADAS EM RESÍDUOS TÊXTEIS COM
PARTÍCULAS MAGNÉTICAS E APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

APUCARANA

2017

JÉSSICA BORGES DE OLIVEIRA

**LIPASES IMOBILIZADAS EM RESÍDUOS TÊXTEIS COM PARTÍCULAS
MAGNÉTICAS E APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao curso Superior de Licenciatura em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) Campus Apucarana, como requisito para a obtenção do título de Licenciado(a) em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Milena Martins Andrade.

APUCARANA

2017



TERMO DE APROVAÇÃO

Título do Trabalho de Conclusão de Curso

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES IMOBILIZADAS EM RESÍDUOS TÊXTEIS COM E SEM PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

por

Jéssica Borges de Oliveira

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado ao dia 20 de Novembro do ano de 2017, às 15:00 horas, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado, linha de pesquisa Química Orgânica, do Curso Superior em Licenciatura em Química da UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela banca examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^a. Dra. Milena Martins Andrade – ORIENTADORA

Prof^o Dr. Elton Guntendorfer Bonafé – EXAMINADOR

Prof^a. Dra. Alessandra Machado Baron – EXAMINADORA

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ser um Pai incomparável, que me deu o dom da vida, saúde, sabedoria, que me proporcionou a oportunidade de estar nesta Universidade e que cuidou e tem cuidado de cada detalhe durante esta caminhada, detalhes estes que me deram forças para não desistir no meio do caminho, mesmo que, às vezes, esta parecia ser a única opção a seguir.

Agradeço aos meus pais, que em sua simplicidade me criaram, me deram amor e me ensinaram princípios essenciais para a vida. Por serem pessoas maravilhosas, que possuem uma força e uma garra incomparáveis que me inspiram a ser cada vez melhor.

Agradeço em especial à professora Milena Andrade, por ser esta pessoa tão especial, que acreditou em mim, que aturou meus defeitos, serviu de ombro amigo, me ajudou a me tornar uma pessoa melhor além de me incentivar nunca desistir dos meus sonhos. Meus mais sinceros agradecimentos, por ser a melhor orientadora do mundo que hoje se tornou uma grande amiga.

Aos demais professores da Universidade, que me incentivaram sempre, que dividiram sua sabedoria comigo e que serviram de grande inspiração. Em especial aos professores, Rafael Block, Edimilson Canesin, Elton Bonafé e Alessandra Baron que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho, compartilhando seus saberes.

Às minhas amigas Caroline Carbuloni, Susan Camargo, Larissa Caroline e Katlyn Basoli por serem fieis companheiras nesta jornada universitária e por sempre estarem presentes nos momentos importantes. Às minhas amigas mais que especiais Jhenifer Marques e Luana Oliveira, pois sempre acreditaram em mim e me apoiaram. Em especial aos meus grandes amigos e pais na fé Rubiane e Marcel França, por cada oração, cada conselho e por servirem de grandes exemplos na minha vida.

E por fim, ao meu grande amigo e companheiro, Renan Colauto, obrigada por toda a paciência do mundo, por ser uma peça importante na minha vida, por dedicar seu tempo em me ajudar, me apoiar, me amar e cuidar de mim. Por ficar do meu lado o tempo todo e por ser um dos grandes motivos da minha felicidade.

“Sem sonhos as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais. Mas, se você tiver grandes sonhos, seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades, seus medos produzirão coragem...”

Augusto Cury

RESUMO

OLIVEIRA, J. B. **Lipases imobilizadas em resíduos têxteis com partículas magnéticas e aplicação em biocatálise**. 2017. 70 p. Trabalho de Conclusão de Curso, Licenciatura em Química - Coordenação do Curso de Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2017.

Devido à alta geração de subprodutos, surge a necessidade de meios que visem uma boa destinação a estes resíduos. Resíduos agroindustriais podem ser usados como substratos para a fermentação microbiana e produção de lipases, que podem ser aplicadas como biocatalisadores em reações químicas diversas, como por exemplo, reações de transesterificação para a síntese de biodiesel e reações de hidrólise para tratamento de efluentes gordurosos. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi produzir um biocatalisador estável e de baixo custo para aplicação no tratamento de efluentes gordurosos. O fungo utilizado como produtor de lipases é o *Botryosphaeria ribis* EC-01, a produção foi realizada por fermentação submersa, em um meio contendo torta de soja e glicerol em condição otimizada previamente. Após a produção, as lipases foram imobilizadas em resíduos têxteis gerados em laboratórios da UTFPR, foram realizados experimentos com o resíduo com e sem partículas magnéticas incorporadas. A utilização das partículas magnéticas é um mecanismo utilizado para facilitar a remoção do imobilizado do meio reacional. Planejamentos fatoriais foram utilizados para determinar a melhor condição de imobilização, e definir assim, os parâmetros físico-químicos ideais (estabilidade a temperatura, pH e frente a diferentes solventes). Foi possível fazer a validação de três condições de imobilização para o suporte de tecido (TE) e uma condição para o suporte de tecido com partículas magnéticas (TEPM). O biocatalisador produzido nos dois suportes apresentou boa estabilidade térmica, mantendo uma adequada atividade residual até 24h de incubação, pH ótimo numa faixa mais alcalina, em torno de 7,0 e 8,0, e temperatura ótima de 60°C. Este biocatalisador foi eficiente na reação de hidrólise com óleo de soja e posterior esterificação química, sendo possível assim a produção de um biodiesel por processo catalisado metade por lipases e metade quimicamente. Sendo assim, este trabalho apresentou uma melhor destinação de diferentes resíduos industriais e agroindustriais, além de proporcionar um biocatalisador estável, eficiente e econômico para o tratamento de efluentes gordurosos.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais, torta de soja, *Botryosphaeria ribis* EC-01, fermentação submersa, biocatalisador, hidrólise.

ABSTRACT

OLIVEIRA, J. B. **Lipases immobilized on textile residues with magnetic particles and application in biocatalysis.** 2017. 70 p. Graduation Course, Degree in Chemistry - Coordination of the Degree in Chemistry, Federal Technological University of Paraná. Apucarana, 2017.

Due to the high generation of by-products, the need arises for means that aim at a good destination for these wastes. Agroindustrial residues can be used as substrates for microbial fermentation and lipase production, which can be applied as biocatalysts in diverse chemical reactions, for example, transesterification reactions for the synthesis of biodiesel and hydrolysis reactions for the treatment of greasy effluents. Thereby the objective of this work was to produce a stable and low cost biocatalyst for application in the treatment of greasy effluents. The fungus used as lipase producer was *Botryosphaeria ribis* EC-01, the production was carried out by submerged fermentation, in a medium containing soybean cake and glycerol in a previously optimized condition. After production, the lipases were immobilized in textile residues generated in UTFPR laboratories, experiments were performed with the residue with and without incorporated magnetic particles. The application of particles is a mechanism used to facilitate the removal of immobilized from the reaction medium. Factorial schedules were used to determine the best immobilization condition, thus defining the ideal physico-chemical parameters (temperature stability, pH and different solvents). It was possible to validate three immobilization conditions for tissue support (TE) and one condition for the support of tissue with magnetic particles (TEPM). The biocatalyst produced in the two substrates presented good thermal stability, maintaining an adequate residual activity up to 24h incubation, optimum pH in a more alkaline range, around 7.0 and 8.0, and optimum temperature of 60 ° C. This biocatalyst was efficient in the reaction of hydrolysis with soybean oil and subsequent chemical esterification, therefore being possible to produce one biodiesel per process catalyzed half by lipases and half chemically. Besides that, this work presented a better allocation of different industrial and agroindustrial residue providing a stable, efficient and economical biocatalyst for the treatment of greasy effluents.

Key words: Agroindustrial waste, soybean cake, *Botryosphaeria ribis* EC-01, submerged fermentation, biocatalyst, hydrolysis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Suportes e métodos utilizados na imobilização de lipases de diferentes micro-organismos.....	16
Tabela 2 - Meio BDA (Batata Dextrose Agar)	20
Tabela 3 - Meio VGA (Vogel, Glucose e Ágar)	21
Tabela 4 - Atividade enzimática antes e após a purificação parcial.....	32
Tabela 6 - Atividade enzimática das soluções utilizadas para imobilização em resíduo têxtil nos tratamentos I e II	33
Tabela 7 - Imobilização de lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em resíduo têxtil .	34
Tabela 8 - Estimativa dos efeitos para a imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em resíduo têxtil com partículas magnéticas.....	35
Tabela 9 - Imobilização de lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em resíduo têxtil	36
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial 2 ² para a imobilização de lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em resíduo têxtil -Tratamento II	37
Tabela 11 - Imobilização de lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em resíduo têxtil com partículas magnéticas.....	38
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial 2 ² para a imobilização de lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em resíduo têxtil com partículas magnéticas - Tratamento II.....	39
Tabela 13 - Comparação dos resultados experimentais com os preditivos calculados pelo modelo matemático na imobilização de lipases em resíduo têxtil	40
Tabela 14 - Estabilidade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em tecido (TE) e em tecido com partículas magnéticas (TEPM) em metanol, etanol e glicerol em diversas concentrações	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Algumas reações catalisadas por lipases	9
Figura 2 - Hidrólise de triglicerídeo por lipase	10
Figura 3 - Principais métodos de imobilização de enzimas.	15
Figura 4 - <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 crescido em VGA (Vogel-Glucose-Ágar) após 5 dias de cultivo a $28 \pm 2^\circ\text{C}$	22
Figura 5 - Esquema da produção e separação da lipase produzida por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01.....	23
Figura 6 - Suporte com resíduos têxteis.....	23
Figura 7 - Esquema de produção do suporte com partículas magnéticas.	24
Figura 8 - Esquema de imobilização da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> no suporte preparado com partículas magnéticas.	25
Figura 9 - Esquema da titulação utilizada para determinar o índice de acidez dos ácidos graxos	30
Figura 10 - Diagrama de Pareto da atividade de lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC - 01 imobilizada em resíduo têxtil com partículas magnéticas.....	35
Figura 11 - Superfície de resposta para a imobilização de lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em resíduo têxtil – Tratamento II (atividade em $\text{U/g}_{\text{suporte}}$)	37
Figura 12 - Superfície de resposta para a imobilização de lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em resíduo têxtil com partículas magnéticas – Tratamento II (atividade em $\text{U/g}_{\text{suporte}}$).....	39
Figura 13 - Estabilidade térmica da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em resíduo têxtil durante 48 h nas temperaturas de 25, 40, 45 e 55 °C. A atividade foi determinada na condição padrão descrita no item 4.2.4.	41
Figura 14 - Estabilidade térmica da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em TEPM durante 48 h nas temperaturas de 25, 40, 45 e 55 °C. A atividade foi determinada na condição padrão descrita no item 4.2.4.	42
Figura 15 – Estabilidade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em TE e TEPM em glicerina (50 % e 100%, v/v)	43
Figura 16 - Estabilidade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em diversos suportes em metanol a 10, 25, 50 e 100 % (v/v).....	43

Figura 17 - Estabilidade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em tecido com e sem partículas magnéticas em etanol a 10, 25, 50 e 100 % (v/v)	44
Figura 18 - Efeito da temperatura na atividade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em tecido (TE) e em tecido com partículas magnéticas (TEPM). A atividade foi determinada na condição padrão descrita no item 4.2.4.....	47
Figura 19 - Efeito do pH na atividade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em TE. A atividade foi determinada em pH 8 na condição padrão descrita no item 4.2.4	48
Figura 20 - Efeito do pH na atividade da lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizada em TEPM. A atividade foi determinada em pH 8 na condição padrão descrita no item 4.2.4	48
Figura 21 - Resultado da primeira reação de hidrólise catalisada por lipase imobilizada em TE e em TEPM	49
Figura 22 - Produtos de uma das amostras da reação de hidrólise de óleo de soja, utilizando como catalisador a lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> imobilizada em resíduos têxteis com e sem partículas magnéticas.....	51
Figura 23 - Índice de acidez do Óleo de Soja (OS), do produto da Hidrólise utilizando lipases imobilizadas em TE (HTE) como catalisador e produto da Hidrólise utilizando lipases imobilizadas em TEPM (HTEPM).....	52
Figura 24 - Índice de Acidez das amostras pós Transesterificação utilizando lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> imobilizada nos dois suportes.....	53
Figura 25 - Cromatograma obtido pós esterificação dos ácidos graxos produtos da hidrólise enzimática.....	53
Figura 26 - Cromatograma obtido pós transesterificação do óleo de soja.	54

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVOS	7
2.1 OBJETIVO GERAL	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
3 REFERENCIAL TEÓRICO	8
3.1 ENZIMAS	8
3.2 LIPASES	8
3.3 PRODUÇÃO DE LIPASES.....	11
3.3.1 <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 Como Produtor de Lipases	12
3.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	13
3.5 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO	17
3.5.1 Partículas Magnéticas.....	18
3.6 APLICAÇÃO DE LIPASES NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 MATERIAIS.....	20
4.1.1 Meios de Cultivo.....	20
4.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	21
4.2.1 Micro-organismo, Cultivo e Produção de Lipases	21
4.2.2 Imobilização de Lipases	25
4.2.3 Determinação da Atividade de Lipase Livre e Imobilizada	26
4.2.4 Determinação da Concentração de Proteínas.....	27
4.3 EFEITO DA TEMPERATURA E PH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA APÓS A IMOBILIZAÇÃO	28
4.4 ESTABILIDADE DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS	28
4.4.1 Estabilidade Térmica	28
4.4.2 Estabilidade Frente a Solventes.....	28
4.4 APLICAÇÃO DA LIPASE DE <i>BOTRYOSPHAERIA RIBIS</i> EC-01 EM REAÇÕES DE BIOCATALISE.....	28
4.4.1 Reação de Hidrólise do Óleo de Soja pela Lipase do <i>Botryosphaeria ribis</i>	28
4.4.2 Reação de Esterificação Química dos Ácidos Graxos Produto da Hidrólise Catalisada pela Lipase do <i>Botryosphaeria ribis</i>	29
4.4.3 Reação de Transesterificação Catalisada pela Lipase do <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01	29
4.4.4 Determinação do Índice de Acidez	30
4.4.5 Reação de transesterificação química para comparação de resultados	30
4.4.6 Análise Cromatográfica dos Ésteres	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32

5.1 PRODUÇÃO DE LIPASE POR <i>BOTRYOSPHAERIA RIBIS</i> EC-01	32
5.2 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE NO SUPORTE DE TE E TEPM	32
5.2.1 Tratamento I.....	33
5.2.2 Tratamento II.....	35
5.3 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA LIPASE DE <i>BOTRIOSPHAERIA RIBIS</i> EC-01 IMOBILIZADA	40
5.3.1 Estabilidade Térmica	40
5.3.2 Estabilidade em Solventes.....	42
5.4 EFEITO DO PH E TEMPERATURA	46
5.4.1 Temperatura e pH Ótimos.....	46
5.5 APLICAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	49
5.5.1 Produção de Biodiesel utilizando a Lipase Imobilizada de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01	49
5.5.2 Produção de Biodiesel por catálise química	54
6 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento mundial acarretou em um aumento expressivo do consumo, surgindo assim, a necessidade de se produzir cada vez mais e com maior velocidade. Como consequência, o grande consumo gerou um aumento significativo de subprodutos industriais e agroindustriais mundialmente. Segundo a Associação Brasileira das Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais - ABRELPE (2016), só no Brasil a geração de resíduos sólidos cresceu mais de 26% na última década (2005-2015).

Neste sentido, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando encontrar melhores destinações aos resíduos, com o intuito de minimizar o impacto causado ao meio ambiente. Nas reações químicas, indústrias utilizam catalisadores para acelerar a produção e diminuir o consumo de energia. A maior parte dos catalisadores utilizados são os catalisadores químicos. Nos últimos anos, encontram-se na literatura vários trabalhos que propõem a substituição desses catalisadores químicos por enzimas, devido a sua alta eficiência e especificidade.

Enzimas apresentam muitas vantagens quando comparadas a catalisadores químicos. Além da fácil biodegradação, catalisadores enzimáticos apresentam maior especificidade dentro da reação o que proporciona a menor geração de subprodutos indesejáveis. Entretanto, mesmo com muitas vantagens, catalisadores biológicos apresentam elevados custos de produção, fato este que acaba limitando a sua utilização.

Dentre as enzimas utilizadas como biocatalisadores, as lipases (EC 3.1.1.3; triacilglicerol acilhidrolases) têm se destacado, pois podem catalisar reações diversas, como hidrólise, interesterificação, transesterificação, aminólises, entre outras. As lipases podem ser facilmente encontradas, pois são produzidas por plantas, animais e micro-organismos. Estas enzimas são muito utilizadas por indústrias, sendo sua principal aplicação comercial, em detergentes para roupa. No entanto, estas enzimas têm sido aplicadas também na produção de biodiesel, de cosméticos, de ingredientes alimentares, de fármacos enantioméricos, entre outros (JEAGER; EGGERT, 2004; SHARMA et al., 2001).

Os micro-organismos são os maiores produtores de lipases, por este motivo, as lipases de origem microbiana representam a classe de enzimas mais amplamente utilizada em aplicações biotecnológicas e industriais. Os micro-

organismos produtores de lipase podem ser bactérias, fungos, leveduras e actinomicetos (MUKHOPADHYAY, 2012; SINGH; MALA; TAKEUCHI, 2008; DALLA-VECCHIA, et al.; 2004; SHARMA et al., 2001).

Resíduos agroindustriais são excelentes fontes de nutrientes para o cultivo de micro-organismos. Sendo assim, visando menor custo de produção e maior sustentabilidade, alguns trabalhos encontrados na literatura propõem a utilização de resíduos agroindustriais na produção de lipases, como a torta de soja (RAMACHANDRAN et al., 2007), torta de babaçu (PALMA et al., 2000), bagaço de mamona (CORADI et al., 2013), bagaço de cana-de-açúcar (FLEURI et al., 2014), entre outros.

A produção de lipase pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi recentemente avaliada de acordo com planejamentos fatoriais e análise por Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Altos índices de lipase foram obtidos na condição otimizada ($76,57 \pm 7,97$ U/mL) utilizando-se torta de soja como substrato e glicerol, com adição somente de água. O custo de produção baseado nos nutrientes utilizados foi de US \$ 0,42 por litro de meio (ANDRADE et al., 2013).

Outro meio de obter maior economia nos processos industriais com a utilização de enzimas como catalizadores, é imobilizá-las em suportes. A literatura apresenta os mais diversos suportes, como quitosana, celite, nanopartículas magnéticas, entre outros. Esta técnica possibilita a fácil separação dos produtos, pode aumentar a atividade e a estabilidade, além de proporcionar a reutilização da enzima (WANG et al., 2008; JEGANNATHAN et al., 2008; CHANG et al., 2007). Dentre as vantagens já apresentadas, o principal objetivo é obter uma enzima imobilizada é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo e que possa ser recuperada facilmente (SCHERER et al., 2011; DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Portanto, este trabalho teve como objetivo produzir lipases pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 por fermentação submersa, imobilizar esta enzima em resíduos têxteis com e sem partículas magnéticas, validar as melhores condições de imobilização, caracterizar essas condições validadas e aplicar o biocatalisador produzido na produção de biodiesel. Além disso, pretende-se utilizar o glicerol gerado na hidrólise dos efluentes gordurosos na produção desta mesma enzima.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir lipases pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01, imobilizar essas enzimas em resíduos têxteis com partículas magnéticas e aplicar em reações de biocatálise.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir lipase a partir do fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 em torta de soja por fermentação submersa segundo condição otimizada previamente por Andrade et al. (2013);
- Pré purificar a enzima lipase com solução saturada de sulfato de amônio;
- Produzir partículas magnéticas;
- Preparar um suporte com resíduos têxteis provenientes de laboratórios da UTFPR juntamente com as partículas magnéticas;
- Otimizar a Imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 no suporte preparado de através de planejamentos fatoriais;
- Realizar testes de estabilidade nas enzimas imobilizadas;
- Utilizar a lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em reações de hidro-esterificação e transesterificação.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ENZIMAS

O conhecimento e utilização das enzimas por seres humanas tem se intensificado nos últimos anos. Entretanto, já nos tempos históricos, onde não era conhecido nenhum conceito sobre enzimas, a mesma já era utilizada no preparo de cerveja e vinhos por meio de fermentação enzimática (HOMAEI et al., 2013).

O termo enzima vem do grego *énzymos* e significa “em leveduras” – foi utilizada pela primeira vez com o consentimento da sua existência, por Kühne (1837-1900), em 1878, nesta época acreditava-se que as enzimas só eram ativas em células vivas, conceito este, que foi derrubado em 1897 quando Buchner (1860-1917) observou que o extrato obtido por prensagem de células de leveduras ainda possuía a propriedade de fermentar a sacarose (COELHO et al., 2008).

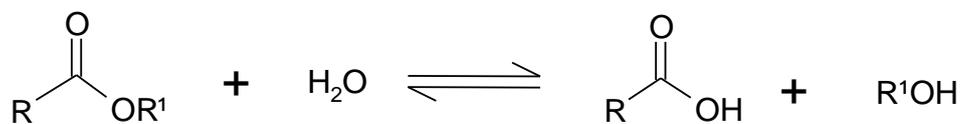
Hoje em dia, já são conhecidas cerca de 4000 enzimas, onde mais ou menos 200 já estão sendo utilizadas em escala comercial. Entretanto, com o aperfeiçoamento da bioquímica de produção, dos processos de fermentação e dos métodos de recuperação, este número tende-se a multiplicar-se cada vez mais. Da mesma forma, as enzimas são excelentes biocatalizadores e quando utilizados exibem uma série de vantagens, como o alto nível de eficiência catalítica e alta seletividade, ajuda ainda mais a aumentar-se o interesse em pesquisar sobre as enzimas (ZHAO et al., 2017; SHARMA et al., 2001).

3.2 LIPASES

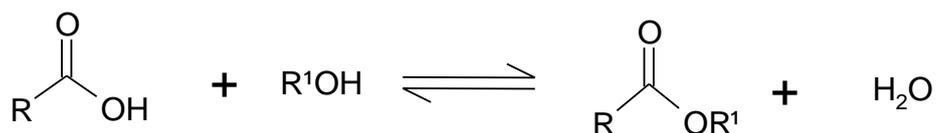
As lipases (triacilglicerol acilhidrolases EC 3.1.1.3) são enzimas que podem ser produzidas por plantas, mamíferos e micro-organismos e a sua principal função natural é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (TAG). No entanto, as lipases são capazes de catalisar, além da hidrólise, uma ampla gama de reações, tais como esterificações, transesterificações e amoniólises (Figura 1), entre outras. Por este motivo, são consideradas importantes biocatalisadores (SHARMA et al., 2001; JEGANNATHAN et al., 2008; AKOZ et al., 2014; MALA; TAKEUCHI, 2008).

Figura 1 - Algumas reações catalisadas por lipases

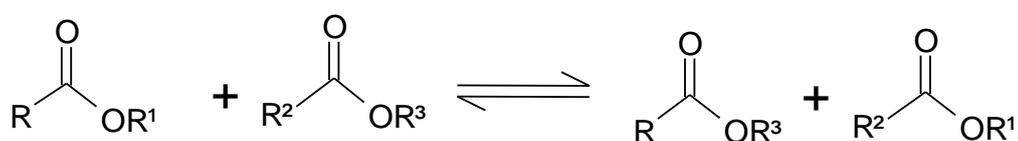
Hidrólise



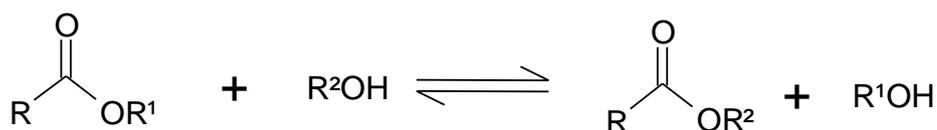
Esterificação



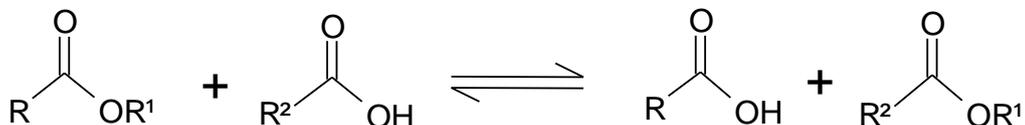
Interesterificação



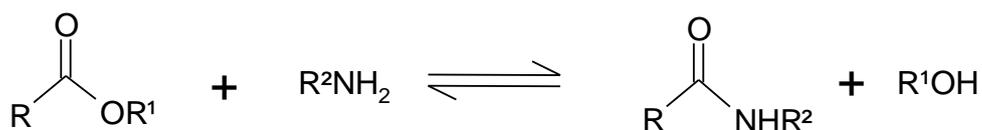
Alcóólise



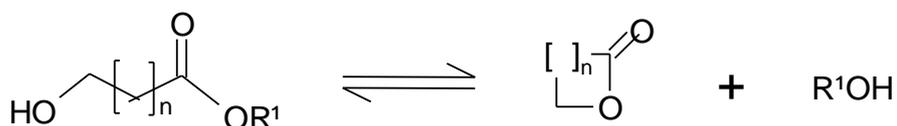
Acidólise



Aminólise



Lactonização



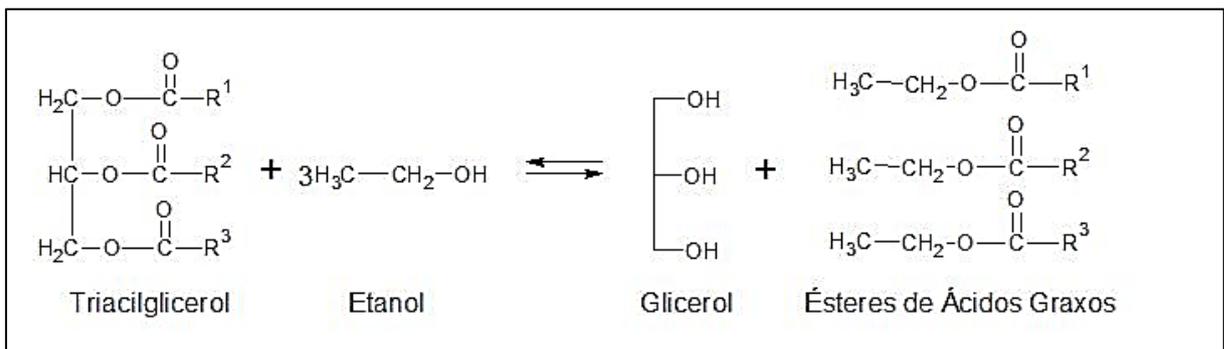
Fonte: PAQUES; MACEDO (2006)

Por possuírem esta característica de importantes catalisadores, estas enzimas são utilizadas em grande escala por indústrias, sendo sua principal aplicação comercial, em detergentes para roupa. As enzimas detergentes representam quase 32% das vendas totais de lipases. Entretanto, estas enzimas

têm sido utilizadas também na produção de biodiesel, de cosméticos, de ingredientes alimentares, de fármacos enantioméricos, entre outros (SHARMA et al., 2001; JEAGER; EGGERT, 2004).

Essas enzimas pertencem à classe das hidrolases (E.C.3.1), pois catalisam a hidrólise e a síntese de ésteres formados a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (Figura 2). Um fato interessante destas hidrolases é sua capacidade de apresentarem grandes níveis de atividade e estabilidade em ambientes não aquosos, o que facilita a catalise de várias reações naturais. Entretanto, as lipases apresentam pouca atividade enzimática em soluções aquosas que contém substratos solúveis (JAEGER et al., 1999; SHARMA et al., 2001; JEAGER; EGGERT, 2004; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Figura 2 - Hidrólise de triglicerídeo por lipase



Fonte: próprio autor.

Pensando em sustentabilidade, a transesterificação realizada utilizando a lipase apresenta muitas vantagens quando comparada a de um catalisador químico, pois a mesma promove uma fácil separação do produto, necessitando de um tratamento mínimo de águas residuais. Além de fácil recuperação de glicerol e ausência de reações colaterais. Dentre as enzimas produzidas por diversos meios, as enzimas de origem microbiana são as mais sustentáveis, pois geram uma quantidade mínima de resíduos além de poderem ser produzidas utilizando uma enorme gama de substratos (JEGANNATHAN et al., 2008).

Apesar das vantagens, a utilização das lipases como biocatalisadores apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, o custo elevado da enzima e também a necessidade de controlar parâmetros como pH e temperatura (AL-ZUHAIR, 2007; FLEURI et al., 2014). Entretanto, o problema do alto custo pode ser

minimizado utilizando resíduos em sua produção, como por exemplo, torta de soja, um resíduo agroindustrial. Ainda, imobilizar esta enzima em um suporte de baixo custo, pois deste modo, a lipase pode ser reutilizada várias vezes, e o mais interessante é que este processo além de reduzir os custos também pode melhorar a qualidade do produto (JEGANNATHAN et al., 2008; RANGANATHAN et al., 2008; ANDRADE et al., 2013).

3.3 PRODUÇÃO DE LIPASES

Como já mencionado, as lipases podem ser produzidas por plantas, mamíferos e micro-organismos, sendo os micro-organismos os maiores produtores, por este motivo, as lipases de origem microbiana representam a classe de enzimas mais amplamente utilizada em aplicações biotecnológicas e química orgânica. Os micro-organismos produtores de lipase podem ser bactérias, fungos, leveduras e actinomicetos (SHARMA et al., 2001; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; MALA; TAKEUCHI, 2008; DALLA-VECCHIA, et al.; 2004).

Os fungos produtores de lipases podem ser encontrados em diversos habitats, incluindo solos contaminados com óleos, resíduos agroindustriais, resíduos de óleos vegetais, indústrias de produtos lácteos, sementes e alimentos em decomposição, entre outros. Alguns dos principais fungos produtores de lipases são dos gêneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Humicola*, *Candida* e *Penicillium*, onde os fungos filamentosos se destacam como os mais eficientes produtores (SHARMA et al., 2001; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

A maioria das lipases microbianas é extracelular, e devem, portanto, ser excretadas através da membrana bacteriana para o meio de cultura (JEAGER; EGER, 2004; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; RANGANATHAN et al., 2008). Estas lipases são produzidas principalmente por fermentação submersa (Fsub) (ITO et al., 2001), mas também podem ser produzidas por fermentação em estado sólido (FES). Ainda é difícil realizar uma comparação quantitativa entre a (FES) e a (Fsub), isto pelo fato de que existe uma grande diferença dos métodos usados para determinar a atividade da lipase (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; MALA; TAKEUCHI, 2008; WANG et al., 2008).

A escolha das condições de cultura, principalmente a composição do meio, é crucial quando se visa obter bons resultados de produção, por este fato,

constantemente, tem se realizado estudos com o intuito de definir uma cultura ideal e também quais os requisitos nutricionais para a produção de lipases por fermentação Submersa (Fsub) (GALVÃO et al., 2016; WANG et al., 2008). No entanto, já é conhecido que esta produção é influenciada pela composição do meio de crescimento, como também tipo e concentração de fontes de carbono (C) e nitrogênio (N), além da necessidade de controle dos fatores físico-químicos como pH da cultura e temperatura de crescimento (SHARMA et al., 2001; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; GHOSH et al., 1996).

Dentre as fontes de carbono, as fontes lipídicas têm sido consideradas essenciais, quando se visa obter um elevado rendimento de lipase (WANG et al., 2008; DALMAU et al., 2000; LIU et al., 2012a). Entretanto, alguns autores apresentaram bons rendimentos na produção com ausência de gorduras e óleos (LIN; KO, 2005; SHARMA et al., 2001).

Ainda pensando em sustentabilidade, o uso de resíduos agroindustriais como substrato para produção de lipase favorece e muito na redução de custo de produção (ANDRADE et al., 2013), além de proporcionar um melhor reaproveitamento desses resíduos, contribuindo assim com o meio ambiente (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

3.3.1 *Botryosphaeria ribis* EC-01 Como Produtor de Lipases

Desde 1995, os fungos provenientes da família *Botryosphaeriaceae* vêm sendo estudados; estes estudos tiveram seu início quando Barbosa e colaboradores isolaram pela primeira vez, o ascomiceto *Botryosphaeria* sp. (MAMB-05) de cancro de eucalipto (BARBOSA et al., 1995; BARBOSA et al., 1996).

Cultivou-se então, separadamente, nove isolados do gênero *Botryosphaeria*, o cultivo foi realizado por fermentação submersa, em oito óleos vegetais diferentes (soja, oliva, girassol, milho, canola, babaçu, gergelim e algodão), na presença de glicerol, afim de selecionar o melhor produtor de lacase e lipase. O melhor produtor de lacase, em todos os óleos avaliados foi o *B. rhodina* MAMB-05, enquanto que *B. ribis* EC-01 destacou-se como o melhor produtor de lipase nos cultivos contendo óleo de milho ou óleo de soja. Contudo, a lipase apresentou maior atividade específica nos cultivos contendo óleo de soja ou glicerol (MESSIAS, 2008; MESSIAS et al., 2009)

Visando aumentar a atividade específica da lipase, Messias (2008) estudou a bioquímica e parte da fisiologia de *Botryosphaeria ribis* EC-01, e obteve resultados onde a atividade subiu de 20 U/mg para 413 U/mg. O cultivo foi realizado em escala de frascos de Erlenmeyer, utilizando como substrato óleo de soja e glicerol, em condição otimizada por planejamento fatorial sob fermentação submersa. Também foram determinadas as propriedades da lipase de *B. ribis* EC-01 quanto à estabilidade em diferentes valores de pH, temperatura e em solventes orgânicos (MESSIAS et al., 2009).

Em estudos relacionados, três tortas oleaginosas (mamona, milho e soja) foram avaliadas como substratos para a produção de lipases sob condição de fermentação submersa por *B. ribis* EC-01, quando suplementado com meio mínimo de sais de Vogel. A adição do meio mínimo às tortas diminuiu fortemente a produção de lipase com a torta de mamona e soja como substratos (BARBOSA et al., 2011; ANDRADE, 2013).

Resíduos agroindustriais são excelentes fontes de nutrientes para o cultivo de micro-organismos, e quando utilizados como matérias-primas para a produção de lipases, além de auxiliar na reciclagem desses resíduos, gera também uma diminuição no custo final de produção destas enzimas (ANDRADE et al., 2014; ANDRADE, 2013).

O *B. ribis* EC-01 produziu altos níveis de lipase em Fsub, quando cultivado somente em farelo de soja em presença de água destilada. Entretanto, Andrade et al. (2013 e 2014) comprovou que a adição de KH_2PO_4 , ácido glutâmico e glicerol a este meio de cultivo, aumenta significativamente a atividade da lipase por este isolado fúngico. Estudos da produção desta enzima por planejamentos fatoriais revelaram que apenas a adição de glicerol ao meio fermentativo influenciava positivamente a produção de lipase. Esta enzima produzida apresentou boa estabilidade térmica e alta afinidade para ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, propriedades estas que tornam a lipase de *B. ribis* EC-01 atrativa para utilização na produção de biodiesel (ANDRADE, 2013).

3.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

O alto custo da enzima é um dos fatores que mais limitam a utilização de lipases como biocatalisadores e conseqüentemente diversas técnicas têm sido

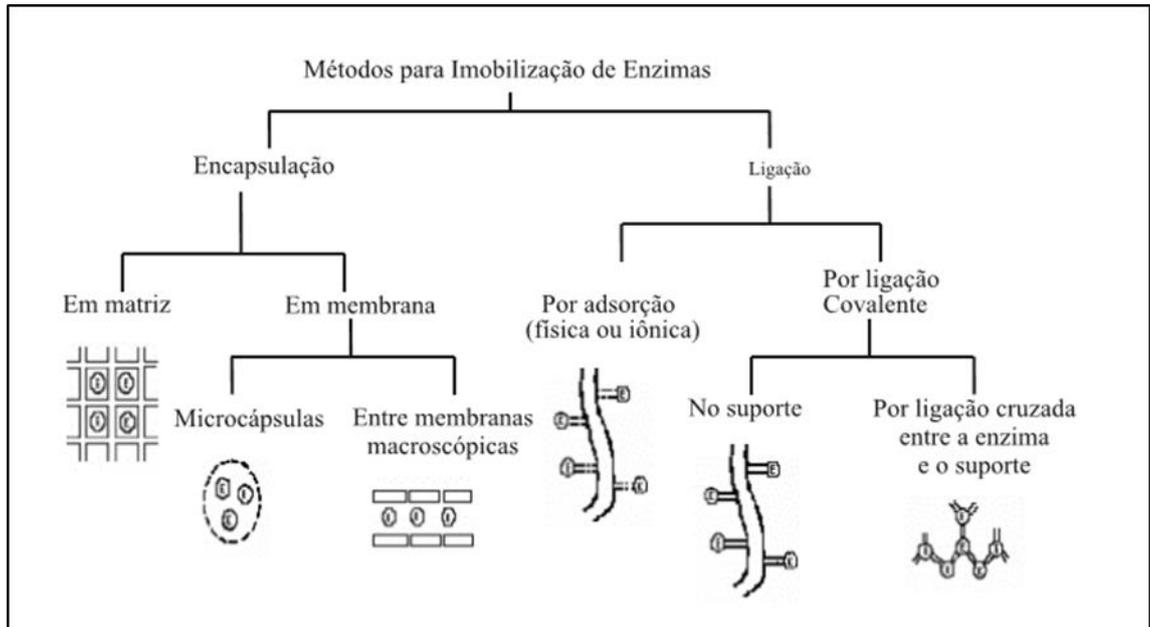
desenvolvidas com o intuito de minimizar este problema. Dentre estas técnicas, pode-se destacar a imobilização enzimática. Imobilização é um processo onde as enzimas são fixadas ou acomodadas dentro de um suporte, a fim de criar assim, um sistema enzimático imobilizado que seja heterogêneo (DALLA-VECCHIA et al., 2004; ZHAO et al., 2017; CHISTHOPHER et al., 2014). Nilson e Griffin foram responsáveis pela primeira enzima imobilizada há mais de um século atrás (NELSON, GRIFFLIN, 1916).

Esta técnica possibilita a fácil separação dos produtos, causa o aperfeiçoamento da atividade e da estabilidade, além de proporcionar a reutilização da enzima por várias vezes, o que resulta em uma maior economia nos processos industriais (CHANG et al., 2007; WANG et al., 2008; JEGANNATHAN et al., 2008; TAN et al., 2012). Dentre as vantagens já apresentadas, o principal interesse de produzir uma enzima imobilizada é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, pois assim garante-se um processo efetivo, além de proporcionar a reutilização deste biocatalisador. (DALLA-VECCHIA et al., 2004; BARON, 2008; SCHERER et al., 2011).

Quando imobilizadas adequadamente em um suporte, este imobilizado pode imitar a forma com que as enzimas são encontradas em seu modo natural, nas células vivas. Entretanto, para que isso ocorra, a enzima deve estar disposta no suporte da melhor maneira possível de uma forma que seu sítio ativo fique disponível para reações, por este motivo, o sistema de suporte na maioria das vezes, estabiliza a enzima além de manter sua atividade. Sendo assim, as enzimas imobilizadas apresentam uma melhor resistência a mudanças, quando comparadas as enzimas na sua forma livre. (HOMAEI et al., 2013; FERNANDEZ-LAFUENTES et al., 1998)

A imobilização pode ocorrer por diversas técnicas que são definidas baseando-se em mecanismos físicos e químicos, a maioria destas técnicas, são provenientes de dois diferentes métodos, o método de ligação (PIZARRO et al., 1997; GIRELLI E MATTEI, 2006) e o método de encapsulação (BOSLEY e PIELOW, 1997; WALT e AGAYN, 1994). A Figura 3 apresenta esquematicamente alguns dos métodos e técnicas utilizados para imobilização enzimática (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Figura 3 - Principais métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Dalla-Vecchia et al (2004).

A técnica de imobilização por encapsulação, consiste em aprisionar a enzima em um suporte que pode ser uma proteína, um polímero insolúvel ou uma microcápsula. Este sistema de imobilização, funciona como uma micro-peneira que retêm moléculas maiores, neste caso as lipases, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos, se difundem. A vantagem apresentada por esta técnica, é o fato de que a enzima não interage quimicamente com o suporte, o que evita assim, a desnaturação, além desta vantagem apresentada, a lipase imobilizada por aprisionamento é muito mais estável do que a lipase fisicamente adsorvida (JEGANNATHAN et al., 2008 (PIZARRO et al., 1997; DALLA- VECCHIA).

A imobilização por ligação, pode ser efetivada a partir de ligações covalentes e por adsorção. A técnica imobilização por ligação covalente, utiliza de um procedimento relativamente simples que proporciona o aumento da atividade e estabilidade enzimática (KENNEDY e MELO, 1990). Entretanto em alguns casos este processo de imobilização, apresenta a desvantagem de desnaturar a enzima nativa durante o processo de ligação (WALT; AGAYN, 1994).

Já o *cross-linking* utiliza um método particular de fixação de enzimas, pois neste método a enzima não é fixada diretamente no suporte e sim a partir de uma rede de ligação covalente com a molécula ligante. O glutaraldeído é o

composto mais utilizado na como molécula ligante (DALLA-VECCHIA, et al., 2004; MATEO et al., 2007).

Dentre as técnicas apresentadas, a adsorção é a mais utilizada, isso se deve a sua facilidade de procedimento além do fato da mesma gerar custos relativamente baixos. Nesta técnica as forças entre o suporte e a enzima podem ser forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (CHANG et al, 2007). Este método, além de não ser utilizado nenhum produto tóxico, possui uma vantagem sobre os outros métodos de imobilização, pois as enzimas imobilizadas não apresentam limitações internas de transferência de massas, além de apresentar uma elevada recuperação na atividade da lipase (JEGANNATHAN et al., 2008; HOMAEI et al., 2013; BOSLEY; PIELOW, 1997).

Muito importante quando se almeja uma imobilização bem-sucedida é a seleção de técnicas adequadas, pois assim pode se assegurar o uso efetivo da enzima sem vazamento ou desprendimento do suporte (JEGANNATHAN et al., 2008). A Tabela 1 apresenta alguns trabalhos que utilizaram diferentes técnicas de imobilização.

Tabela 1 - Suportes e métodos utilizados na imobilização de lipases de diferentes micro-organismos

Micro-organismo utilizado	Suporte	Método de imobilização	Referencias
<i>Pichia guilliermondii</i>	Partículas magnéticas hidrofóbicas	Adsorção	Li e Dong (2016)
<i>Candida rugosa</i>	Nano partículas magnéticas por película de poli dopamina	Ligação covalente	Rem et al. (2011)
<i>Cândida rugosa</i>	Nano partículas de Fe3O4 (sol-gel)	Encapsulamento	Akoz et al. (2014)
<i>Penicillium camemberti</i>	Oxido de grafeno (GO)	Ligação covalente	Zhang et al. (2014)
<i>Cândida sp.</i>	Diatomite	Adsorção/aprisionamento	Zhao et al. (2017)
<i>Burkholderia sp.</i>	Partículas magnéticas silicatadas hidrofóbicas	Adsorção	Liu et al. (2012b)
<i>Cândida rugosa</i>	Carvão ativado	Adsorção	Moreno-piraján; giraldo (2011)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Tecido	Adsorção	Meng et al. (2011)

<i>Enterobacter aerogenes</i>	Sílica	Cross-linking	Kumari et al. (2009)
<i>Cândida rugosa</i>	Amino de quitosana	Cross-linking	Shao et al. 2007

Fonte: O próprio autor.

3.5 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

A escolha do suporte adequado é crucial quando se almeja um sucesso na imobilização, pois assim pode se assegurar que haverá uma melhora na estabilidade e atividade da enzima, além de garantir que a mesma seja reutilizada em diversas aplicações, reduzindo assim o problema do alto custo da enzima o que facilita sua aplicação industrial (REN et al., 2011; SCHERER et al., 2011).

Muitos materiais orgânicos, inorgânicos e naturais, com diferentes características, têm sido utilizados para imobilizar lipases (SCHERER et al., 2011), como por exemplo, celite (SHAH; GUPTA, 2007), sílica (KUMARI et al., 2009), diatomite (ZHAO et al., 2017), carvão ativado (MORENO-PIRAJÀN; GIRALDO, 2011), nano tubos de carbono (TAN et al., 2012), óxido de grafeno (ZHANG et al., 2014), partículas magnéticas com resinas poliméricas (REM et al., 2011; LIU et al., 2012b), partículas magnéticas (LI; DONG, 2016), nano partículas magnéticas (AKOZ et al., 2014), tecido (MENG et al., 2011), fibras de quitosana (YI et al., 2008; SHAO et al., 2008) nano fibras de poliuretano (LIU et al., 2012c), entre outros.

Dentre estes materiais, os de baixo custo são os mais atraentes para aplicações industriais (ZHAO et al., 2015). Deste modo, tem se estudado o uso de materiais baratos como suporte, como por exemplo, quitosana, tecido, caroço de azeitona como também resíduos agroindustriais (YÜCEL et al., 2012).

É preferível a utilização de suportes hidrofóbicos, uma vez que tendem a uma baixa competição entre a lipase e a água pelo suporte, proporcionando assim bons resultados de imobilização (SCHERER et al., 2011). A tabela 1 apresenta alguns estudos dos diferentes materiais utilizados como suportes para imobilizar lipases, bem como a metodologias utilizadas e os rendimentos obtidos.

3.5.1 Partículas Magnéticas

Nos últimos anos, a aplicação de partículas e nano partículas magnéticas no processo de imobilização tem sido objeto de estudo de pesquisadores no mundo todo, pois além de possuírem propriedades multifuncionais, como biocompatibilidade, super magnetismo e baixa toxicidade, essas partículas possuem uma área superficial específica e proporcionam uma fácil separação do meio reacional com o uso de íman (REN et al., 2011).

Neste sentido, partículas magnéticas hidrofóbicas foram desenvolvidas para imobilizar lipases (LIU et al., 2012b; LI; DONG, 2016). Entretanto com o avanço nas pesquisas, tem se estudado e aplicado, tanto o revestimento de partículas e nano partículas magnéticas para serem utilizadas como suporte, como também a incorporação das mesmas em outros suportes já utilizados. (REN et al., 2011; TAN et al., 2012; AKOZ et al., 2014)

A aplicação de partículas e nano partículas magnéticas no processo de imobilização, demonstrou eficiência de imobilização, além de conservar características da enzima após muitos ciclos. Entretanto, em alguns estudos a atividade das lipases após a imobilização diminuiu, isto ocorreu possivelmente devido a alterações na estrutura da enzima, ou devido ao acesso restrito do substrato ao local ativo da enzima ligado a superfície. Portanto, apesar de muitos resultados positivos relatados para imobilização de lipases em nano e em partículas magnéticas, ainda existe a necessidade de métodos simples, rentáveis e que apresentem alta atividade enzimática após a imobilização. (REN et al., 2011; TAN et al., 2012; AKOZ et al., 2014; LI; DONG, 2016)

3.6 APLICAÇÃO DE LIPASES NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Atualmente o biodiesel é comercializado e usado em muitos países, pois é um substituto promissor para o petróleo diesel. O Biodiesel pode ser produzido por diferentes métodos, onde utilizam uma vasta gama de catalisadores, estes catalisadores podem ser químicos ou biológicos (enzimas) (NIE et al., 2015). Entretanto, os biocatalisadores exibem muitas vantagens quando comparados à catalisadores químicos, por exemplo, são seletivos, consomem menos energia nos

processos e também na emissão de partículas, CO₂ e hidrocarbonetos não queimados da combustão de biodiesel em um diesel motor são todos menor do que os de diesel de petróleo (LI e DONG, 2016; GERPEN, 2005; SANTORI, et al., 2012).

Devido as vantagens apresentadas nos últimos anos é possível encontrar na literatura muitas pesquisas voltadas a utilização destes biocatalisadores em processos de hidrólise, esterificação e transesterificação para produção de biodiesel, pois assim as reações são é limpa e eficaz (LIU et al., 2012). A transesterificação catalisada por lipase não apresenta os problemas provenientes do uso de catalisadores químicos (TING et al., 2008).

Quando imobilizado em um suporte adequado as enzimas atuam como biocatalisadores estáveis e podem ser reutilizados por mais de uma vez. Por este motivo lipases imobilizadas têm sido estudadas para serem aplicadas a produção de biodiesel devido à sua taxa de reação mais rápida além de proporcionares custo de preparação muito mais baixo (LI e DONG, 2016; AL-ZUHAIR, 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A torta de soja foi gentilmente doada pela Imcopa Importação, Exportação e Indústria de Óleos S.A. (Cambé, Paraná, Brasil).

O Glicerol PA, foi adquirido de FMaia Indústria e Comércio LTDA (Cotia-SP, Brasil).

O resíduo têxtil utilizado como suporte é proveniente do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento e Laboratório de Produção do Vestuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana.

Os reagentes utilizados para a formulação de partículas magnéticas são o Borohidreto de sódio P.A. (NaBH_4) da marca VETEC e o Cloreto Férrico em Pedras P.A ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) da marca Anidrol.

O substrato utilizado para a atividade hidrolítica de lipase foi o palmitato de *p*-nitrofenila, adquirido de Sigma-Aldrich (EUA).

Para a produção de biodiesel foi utilizado óleo de soja comercial adquirido de Coamo Agroindustrial Cooperativa (Campo Mourão, Paraná, Brasil).

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.1.1 Meios de Cultivo

Os meios de cultivo utilizados no presente trabalho são, o meio BDA (Tabela 2), meio mínimo de sais de Vogel (1956) (Quadro 1) e o meio VGA (Tabela 3), descritos na sequência:

Tabela 2 - Meio BDA (Batata Dextrose Agar)

Material	Quantidade
Batata	20 g
Dextrose	2 g
Ágar	1,5 g
Água destilada qsp	100 mL

Fonte: próprio autor

Quadro 1 - Meio mínimo de sais de Vogel*

		Solução de Elementos-traços:	
Citrato de sódio. 5 ½ H ₂ O	150 g	Ácido cítrico. 1 H ₂ O	5 g
KH ₂ PO ₄ anidro	250 g	ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	5 g
NH ₄ NO ₃ anidro	100 g	Fe(NH ₄) ₂ . 6 H ₂ O	1 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	10 g	CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,25 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	5 g	MnSO ₄ . 1 H ₂ O	0,05 g
Solução de elementos-traços	5 mL	H ₃ BO ₃ anidro	0,05 g
Solução de biotina 0,1 mg/mL	2,5 mL	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,05 g
Água destilada qsp.	1000 mL	Água destilada qsp.	100 mL

* Concentrado 50 vezes

Fonte: próprio autor

Tabela 3 - Meio VGA (Vogel, Glucose e Ágar)

Material	Quantidade
Meio mínimo de sais de Vogel*	2 mL
Glucose	1 g
Ágar	2 g
Água destilada qsp	100 mL

* Concentrado 50 vezes

Fonte: próprio autor

4.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Todos os experimentos foram realizados no mínimo em triplicatas, exceto pelos planejamentos fatoriais que foram desenvolvidos com triplicata somente no ponto central e os resultados expressos por suas médias.

4.2.1 Micro-organismo, Cultivo e Produção de Lipases

O micro-organismo utilizado foi o *Botryosphaeria ribis* EC-01 (GenBank Accession Number DQ852308) mantido em BDA inclinado (meio de manutenção), à temperatura de $4,0 \pm 2$ °C e repicados trimestralmente. *B. ribis* EC-01 foi transferido do meio de manutenção para placas de Petri contendo meio mínimo de Vogel

(1956), glucose 1% (m/v) como fonte de carbono e ágar 2 % (m/v) e incubadas a 28 ± 2 °C por 5 dias (Figura 4).

Figura 4 - *Botryosphaeria ribis* EC-01 crescido em VGA (Vogel-Glucose-Ágar) após 5 dias de cultivo a 28 ± 2 °C.

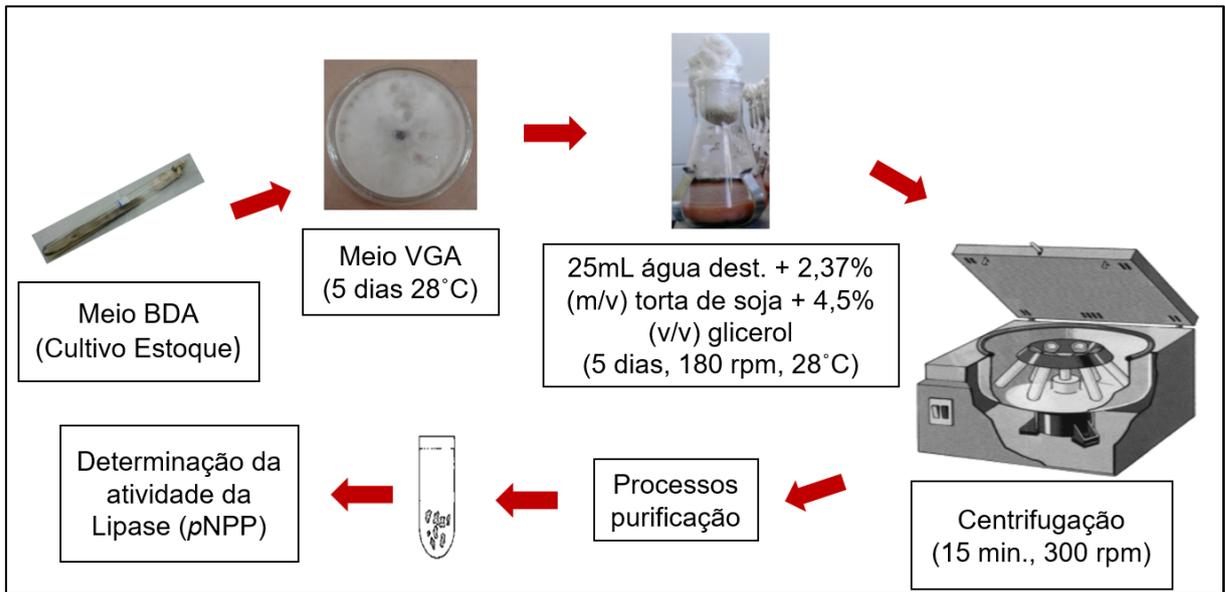


Fonte: Andrade, 2013.

Após o tempo de crescimento, para a produção de lipase, foram cortadas esferas de 0,7 cm de diâmetro e inoculadas em frascos *Erlenmeyer* de 125 mL com 25 mL de meio otimizado por Andrade et al. (2013) composto por 2,37% (m/v) torta de soja e 4,5 % (v/v) de glicerol PA. O inóculo permaneceu durante 5 dias em *shaker* (180 rpm) a 28 °C, e foi interrompido por centrifugação (5000 rpm/15 min).

Os sobrenadantes obtidos após centrifugação foram utilizados como fonte de lipases. O extrato bruto dessas enzimas foi purificado parcialmente por precipitação fracionada com 20% (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com o objetivo de separar as impurezas presentes no sobrenadante. Após esse procedimento o extrato concentrado foi dialisado contra água deionizada e armazenados até utilização à 4 °C.

Figura 5 - Esquema da produção e separação da Lipase produzida por *Botryosphaeria ribis* EC-01



Fonte: Adaptado de Andrade, 2013.

4.2.1.1 Preparo do suporte de resíduo têxtil

O resíduo têxtil foi lavado para retirar a goma e dele foram cortados quadrados de 0,5 x 0,5cm, para atuarem como suporte.

Figura 6 - Suporte com resíduos têxteis.



Fonte: O próprio autor.

4.2.1.2 Preparo do suporte de resíduo têxtil com partículas magnéticas

Para a síntese de Fe_3O_4 neste trabalho, utilizou-se uma adaptação da metodologia empregada por García-Peña et al. (2015) na síntese de NPs de rutênio. A proporção utilizada foi de 1:7 (m/m) de cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e de borohidreto de sódio (NaBH_4). Para produção das partículas, os compostos foram macerados por cerca de 5 minutos em um almofariz de ágata, adaptado, até que se obteve como produto, um pó cinza escuro, que em seguida, foi lavado três vezes, com água deionizada para a remoção do hidrogênio remanescente do borohidreto de sódio.

Após a lavagem, o pó resultante foi liofilizado, para evitar a oxidação das partículas o que acarreta na perda da propriedade magnética. Posteriormente a liofilização, as partículas foram incorporadas ao resíduo têxtil por método de fixação por maceração.

Figura 7 - Esquema de produção do suporte com partículas magnéticas.



Fonte: O próprio autor.

4.2.1.3 Equações utilizadas na imobilização de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01

$$\textit{Atividade de lipase (U/g - suporte)} = \frac{\textit{Atividade da enzima imobilizada}}{\textit{quantidade enzima imobilizada}} \quad (1)$$

$$\text{Atividade específica (U/mg - proteína)} = \frac{\text{Atividade da enzima imobilizada}}{\text{quantidade de proteína ligada}} \quad (2)$$

Atividade específica relativa

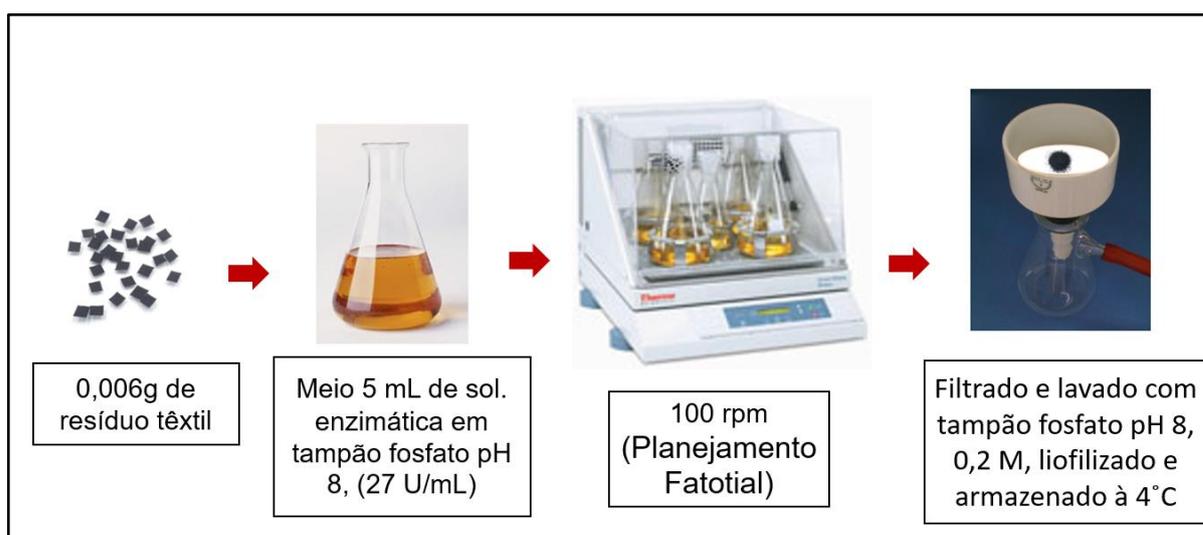
$$= \left(\frac{\text{Atividade específica da enzima imobilizada}}{\text{Atividade específica enzima livre}} \right) \times 100 \quad (3)$$

4.2.2 Imobilização de Lipases

A imobilização das enzimas produzidas foi realizada em resíduos têxteis (TE) e em resíduos têxteis com partículas magnéticas (TEPM).

O suporte (0,006 g) foi deixado em contato com 5 mL de solução enzimática em tampão fosfato 0,05 M (pH 8) a 150 rpm de acordo com planejamentos fatoriais 2^2 avaliando-se temperatura e tempo de contato com os níveis inferiores (-1), centrais (0), superiores (+1), além dos axiais ($\pm 1,41$) em alguns tratamentos. A enzima imobilizada foi lavada duas vezes com tampão fosfato pH 8 (0,2 M), seguido de lavagem com água destilada e liofilizada.

Figura 8 - Esquema de imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* no suporte preparado com partículas magnéticas.



Fonte: O próprio autor.

Análises de variância (ANOVA) e de regressão múltipla foram

realizadas ao nível de 5 ou 10 % de significância, utilizando o programa STATISTICA Version 8.0®.

A atividade enzimática foi determinada no derivado, no sobrenadante e na solução inicial de enzima. E o teor de proteínas foi determinado na solução inicial e no sobrenadante.

4.2.3 Determinação da Atividade de Lipase Livre e Imobilizada

A atividade da lipase livre e imobilizada foi determinada utilizando palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) como substrato (WINKLER; STUKMANN, 1979), baseado na hidrólise do *p*NPP, em meio aquoso, contendo Triton X-100 como surfactante. A liberação *p*-nitrofenol pela ação da lipase é quantificada por meio da absorvância da coloração amarela no comprimento de onda de 410 nm.

A reação será conduzida em tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8) a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 minutos. A absorvância, medida em 410 nm, o coeficiente de extinção molar para o *p*NP: $1,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ será utilizado para correlacionar a concentração do produto com a absorvância obtida na leitura (MESSIAS et al., 2009). Uma unidade de atividade de lipase foi definida como 1 μmol de *p*NP (*p*-nitrofenol), liberado por minuto por mL da solução da enzima.

O procedimento e o cálculo utilizado para a determinação da atividade estão descritos abaixo:

- Solução A: palmitato de *p*-nitrofenila (ou outros ésteres de *p*-nitrofenila) em isopropanol, em uma concentração de 3,0 mg/mL;
- Solução B: 2 g de Triton X-100 dissolvidos em 450 mL de tampão fosfato $0,05 \text{ mol/L}$, pH 8,0.

1 mL da solução A foi adicionada em 10 mL da solução B. A mistura reativa foi produzida, imediatamente à determinação da atividade, considerando que o substrato é instável. Em banho termostático na temperatura ótima de $55 \text{ }^\circ\text{C}$ para a atividade da lipase, 0,9 mL da mistura será adicionado em tubo de ensaio e em seguida, 0,1 mL do extrato enzimático também será adicionado. Para o controle da reação será utilizado 0,1 mL de água destilada, no lugar do extrato enzimático. Decorrido dois minutos de reação, a leitura da atividade será efetuada a 410 nm.

Para a enzima imobilizada será utilizado aproximadamente 0,0030 g da enzima imobilizada, incubação com agitação, também a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ e interrupção por

recuperação do imobilizado com um ímã ou com uma pinça (para imobilizado em suporte sem partículas magnéticas).

O cálculo da atividade enzimática livre e imobilizada será realizado a partir da fórmula geral:

$$U/mL \text{ ou } U/g = \left[\frac{Abs}{\varepsilon} \times \frac{1}{V_e \text{ ou } m_e / V_{sol}} \times \frac{1}{t_r} \times DF \times 10^3 \right] \quad (7)$$

Em que:

U/mL: unidade de atividade enzimática da solução da enzima, definida de acordo com o método utilizado, nas condições padrão de ensaio;

U/g: unidade de atividade enzimática da enzima imobilizada por grama de suporte, definida de acordo com o método utilizado, nas condições padrão de ensaio;

Abs: absorvância a λ (nm);

ε : coeficiente de extinção molar ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$);

V_e : volume de enzima utilizado no ensaio (mL);

V_{sol} : volume utilizado para a reação com a enzima imobilizada (mL);

m_e : massa da enzima utilizada no ensaio (g)

t_r : tempo de reação (minutos);

DF: fator de diluição

10^3 : fator de conversão de mol/L para $\mu\text{mol/mL}$.

O procedimento de quantificação da atividade de lipase descrito acima foi adotado como a condição padrão de análise de atividade enzimática.

4.2.4 Determinação da Concentração de Proteínas

A concentração de proteínas extracelulares foi determinada pelo método de Bradford (1976), que utiliza como reagente o corante "Coomassie brilliant blue" BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação a interação entre a proteína de alto peso molecular

e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve fortemente em 595 nm. A albumina de soro bovino foi utilizada como padrão para construção de uma curva analítica (0 – 250 mg/mL).

4.3 EFEITO DA TEMPERATURA E PH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA APÓS A IMOBILIZAÇÃO

Os efeitos da temperatura e pH na atividade das lipases imobilizadas foram avaliados utilizando-se pNPP como substrato. A enzima imobilizada (0,0017 g) foi incubada em tampões (3-10) à 55 °C e nas temperaturas (30 a 65°C), durante 2 minutos.

4.4 ESTABILIDADE DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS

4.4.1 Estabilidade Térmica

A enzima imobilizada (0,0017 g) foi incubada nas seguintes temperaturas: 25, 40, 45 e 55 °C em um intervalo de tempo de 48 h. A atividade residual de lipase foi ensaiada na condição padrão (item 4.2.3).

4.4.2 Estabilidade Frente a Solventes

A estabilidade das enzimas imobilizadas foi avaliada frente a metanol, etanol, glicerol e água. A lipase imobilizada foi incubada em glicerol (50 e 100%), em metanol (10-100%) e em etanol (10-100%) à 25 °C e 200 rpm por 1 h. A atividade residual de lipase foi ensaiada na condição padrão (item 4.2.3).

4.4 APLICAÇÃO DA LIPASE DE *BOTRYOSPHERIA RIBIS* EC-01 EM REAÇÕES DE BIOCATALISE

4.4.1 Reação de Hidrólise do Óleo de Soja pela Lipase do *Botryosphaeria ribis*.

Em frascos de 125 mL, 15 g do óleo de soja foi misturado com 15 g de água com triton X-100 (0,44%) e 0,03 g da enzima imobilizada e mantidos à 25°C e 150 rpm por 48h.

A capacidade de hidrólise do óleo pela lipase foi avaliada por meio de determinação de acidez por titulação com KOH e também por análises de Cromatografia Gasosa pela formação de ácidos graxos, glicerol e dos intermediários diacil e monoacilglicerídeos. O índice de acidez da amostra de óleo de soja inicial também foi determinado.

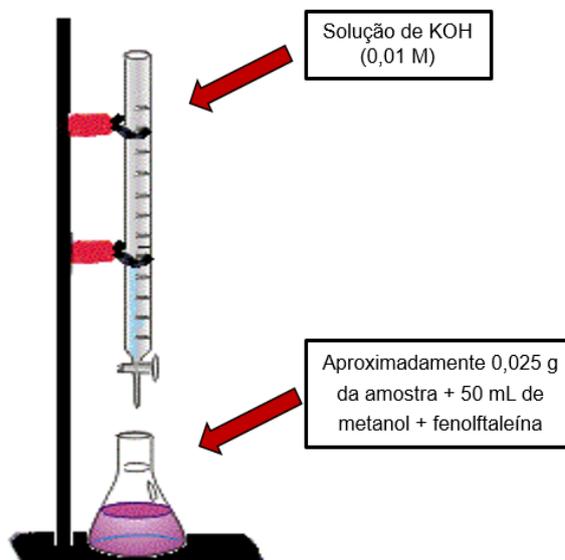
4.4.2 Reação de Esterificação Química dos Ácidos Graxos Produto da Hidrólise Catalisada pela Lipase do *Botryosphaeria ribis* .

Aproximadamente, 25 mg ($\pm 0,1$ mg) dos ácidos graxos resultantes da reação de hidrólise (item 4.4.1), foram pesados, adicionados 1,5 mL de solução de NaOH 0,50 mol/L em metanol. A mistura foi aquecida em banho de água à 100°C por cerca de 5 minutos e em seguida resfriada a temperatura ambiente. Foram adicionados 2,0 mL de uma solução de BF₃ (12%) em metanol, aquecido novamente em banho à 100°C por 30 minutos. Após, resfriou-se o tubo em fluxo de água corrente à temperatura ambiente e foram adicionados 1,0 mL de iso-octano. Agitou-se vigorosamente por 30 segundos, em seguida foram adicionados 5,0 mL de solução de cloreto de sódio saturada. A amostra esterificada foi levada à geladeira e deixada em repouso separação das fases. Após 12 horas em repouso o sobrenadante foi coletado para posterior injeção no CG.

4.4.3 Reação de Transesterificação Catalisada pela Lipase do *Botryosphaeria ribis* EC-01

Para a enzima imobilizada foi utilizado somente a agitação orbital (150 rpm) a 40°C e tempo de 24 h. As misturas de reação incluíram 15 g de óleo de soja e a mesma quantidade de água, lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em tecido com e sem partículas magnéticas. O metanol foi adicionado à reação em intervalos de 1h para reduzir o acúmulo de ação deletéria para a atividade da enzima. A quantidade que foi adicionada a cada vez correspondeu a $\frac{1}{4}$ do total. Após o tempo de reação, as amostras foram transferidas para um funil de separação para obtenção da camada superior (biodiesel) e análise por CG (Cromatografia Gasosa). O Índice de Acidez (IA) também foi determinado utilizando uma solução de KOH (0,01 M) como titulante. O esquema de titulação é representado na Figura 9.

Figura 9 - Esquema da titulação utilizada para determinar o índice de acidez dos ácidos graxos



Fonte: O próprio autor

4.4.4 Determinação do Índice de Acidez

Titulou-se em triplicatas contendo cerca de 2g das amostras de óleo e 50 mL de metanol, com solução de hidróxido de potássio 0,01mol/L e 5 gotas de fenolftaleína a 1% como indicador. Os valores de acidez foram calculados pela Equação 4 (ANP, 2017).

$$IA (mgKOH/g) = V \times f \times M \times 56,1 \div P \quad (4)$$

Onde:

V = volume da solução de KOH gasto na titulação (mL)

f = fator de correção da solução padrão de KOH

P = massa de amostra (g)

4.4.5 Reação de transesterificação química para comparação de resultados

Foram pesados, aproximadamente, 25 mg (\pm 0,1 mg) de óleo,

adicionados 1,5 mL de solução de NaOH 0,50 mol/L em metanol. A mistura foi aquecida em banho de água à 100°C por cerca de 5 minutos e em seguida resfriada a temperatura ambiente. Foram adicionados 2,0 mL de uma solução de BF₃ (12%) em metanol, aquecido novamente em banho à 100°C por 30 minutos. Após, resfriou-se o tubo em fluxo de água corrente à temperatura ambiente e foram adicionados 1,0 mL de iso-octano. Agitou-se vigorosamente por 30 segundos, em seguida foram adicionados 5,0 mL de solução de cloreto de sódio saturada. A amostra transesterificada foi levada à geladeira e deixada em repouso separação das fases. Após 12 horas em repouso o sobrenadante foi coletado para posterior injeção no CG.

4.4.6 Análise Cromatográfica dos Ésteres

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados em um cromatógrafo a gás CG-Shimadzu-GC2010-plus acoplado a um MS-QP2010-Ultra também Shimadzu, equipado com uma coluna Restek RT-2560 de 100 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 micra de espessura de filme. As vazões dos gases foram de 1,4 mL min⁻¹ para o gás de arraste (He).

A razão de divisão da amostra foi de 1/50 com fluxo de purga de 3.0 mL/min e as temperaturas do injetor e detector foram 200 e 230°C respectivamente. A rampa de temperatura da coluna foi de 190 °C durante 1 min, elevando a temperatura para 200 °C a taxa de 1.5 °C/min e mantendo a 200 °C por 2 min, em seguida eleva a temperatura para 230 °C na taxa de 1.5 °C/min e mantém a 230 °C durante 12 min. As áreas dos picos foram determinadas pelo software Star (Varian).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE LIPASE POR *BOTRYOSPHAERIA RIBIS* EC-01

A produção de lipases foi avaliada em condição previamente otimizada por Andrade et al. (2013) que utiliza 2,4 % (m/v) de torta de soja e 4,5 % (v/v) de glicerol PA. O extrato bruto resultante foi tratado com 20 % (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a fim de concentrar a enzima de interesse. Os resultados da atividade de lipase antes e após o tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e após a diálise contra água deionizada estão expressos na Tabela 4

Tabela 4 - Atividade enzimática antes e após a purificação parcial

Amostra	U/mL	U/mg
Extrato bruto	47,6 ± 1,63	154 ± 5,29
Lipase após concentração (20%, m/v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	85,0 ± 4,66	231 ± 12,7
Lipase após concentração e diálise	133 ± 0,05	383 ± 4,31

Fonte: O próprio autor.

A produção de lipase por *B. ribis* EC-01 em torta de soja por fermentação submersa em condição otimizada foi satisfatória (47,6 U/mL) sendo o valor predito para esta condição de 72,0 U/mL. Após a adição de 20 % (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a atividade enzimática passou de 47,6 para 85,0 U/mL, revelando que a lipase foi precipitada. A precipitação de proteínas pela alta concentração de sais é um processo utilizado para separar misturas complexas de proteínas, este procedimento é nomeado “salting-out” e se baseia no aumento da insolubidade da proteína em decorrência do aumento da força iônica do meio (GREEN e HUGHES, 1955).

Após a diálise, a atividade enzimática quase dobrou (133 U/mL). A eficiência do processo foi confirmada com a dosagem das proteínas extracelulares: a atividade específica passou de 154 U/mg no extrato bruto inicial para 383 U/mg ao final do processo, ou seja, seu valor quase triplicou. Soluções enzimáticas a partir desta concentrada foram utilizadas para imobilização nos suportes produzidos.

5.2 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE NO SUPORTE DE TE E TEPM

O método de imobilização de lipases é fortemente influenciado pela temperatura e tempo de contato, por este motivo se torna crucial investigar estes fatores afim de encontrar as condições ótimas. Entretanto métodos tradicionais, como “um fator de cada vez” acaba sendo extremamente demorado e muitas vezes ineficaz, além de não garantir a determinação das condições ótimas (Liu et al., 2007).

Portanto, a utilização de planejamentos fatoriais e a metodologia de superfície e resposta (RSM) podem superar tais desvantagens facilitando e garantindo melhores resultados para validações. (KAUSHIK et al., 2011; ZHOU et al., 2009). Assim sendo, a imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 em TE e TEPM foi estudada utilizando-se planejamentos estatísticos, nomeados de Tratamento I e II. Cada tratamento possuiu uma solução enzimática de concentração diferentes, as atividades dessas soluções utilizadas estão na Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade enzimática das soluções utilizadas para imobilização em resíduo têxtil nos tratamentos I e II

Amostra	U/mL	U/mg
Solução tratamento I	37,7 ± 0,01	618 ± 81,7
Solução tratamento II	10,1 ± 0,04	261 ± 17,2

Fonte: O próprio autor.

5.2.1 Tratamento I

A Tabela 6 apresenta os níveis e os ensaios experimentais do delineamento fatorial (2^2) e a variável dependente avaliada foi a atividade da enzima imobilizada (U/g_{suporte}). Em relação à enzima imobilizada em TE houve variação de 31,8 a 46,8 U/g_{TE} dependendo do tempo e da temperatura empregados e a atividade máxima (46,8 U/g_{TE}) foi alcançada quando os fatores tempo (X_1) e temperatura (X_2) foram de 90 minutos e 18 °C, respectivamente.

De acordo com o modelo linear ou de 1ª ordem, menores tempos de reação melhoram a atividade de lipase imobilizada em TE ($p \leq 0,1$). O valor de $R^2 = 0,82$ e $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ (22,44 > 4,06) obtidos mostraram que o modelo é confiável e

estatisticamente significativo ($p \leq 0,1$). A equação preditiva (5) é mostrada abaixo, onde os termos significativos estão em negrito:

$$U/g_{TE} = \mathbf{38,36} - \mathbf{4,26}x_1 + 0,01x_2 + 3,24x_1 \cdot x_2 \quad (5)$$

Tabela 6- Imobilização de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em resíduo têxtil

Experimento	Variáveis codificadas		Respostas	
	X ₁	X ₂	U/g _{TE} ¹	U/g _{TEPM} ²
1	-1	-1	46,8	10,7
2	-1	1	40,3	17,8
3	1	-1	31,8	11,0
4	1	1	38,3	6,33
5	0	0	38,5	7,35
6	0	0	33,7	8,52
7	0	0	39,1	8,52
Fatores	Níveis reais			
	-1	0	1	
X ₁ (tempo, min)	90	195	300	
X ₂ (temperatura, °C)	18	25	32	

¹ Imobilização em resíduo têxtil sem partículas magnéticas

² Imobilização em resíduo têxtil com partículas magnéticas

Fonte: próprio autor.

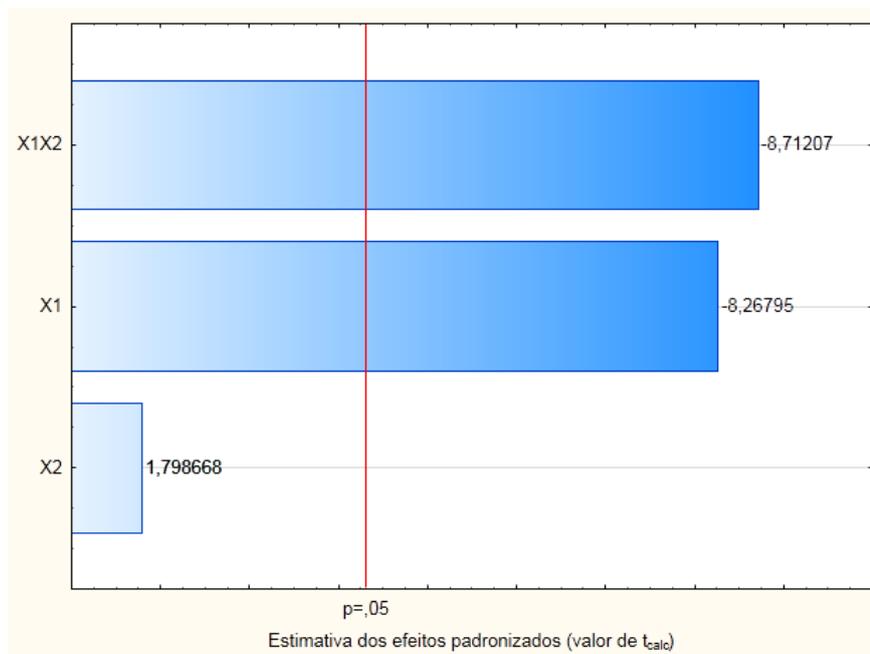
Como pode ser verificado também na Tabela 6, a imobilização da enzima em TEPM proporcionou atividades menores, variando de 6,33 a 17,8 U/g_{TEPM}, sendo este maior valor alcançado quando tempo (X₁) e temperatura (X₂) foram de 90 minutos e 32 °C, respectivamente. Para este modelo, também de 1^a ordem, a variável tempo (X₁) e a interação Tempo x Temperatura (X₁X₂) influenciaram negativa e significativamente na melhora da atividade da lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em TEPM ($p \leq 0,05$), ou seja, quando a variável X₁ passou para um nível inferior (valor negativo) ocorreu melhora na atividade da lipase imobilizada (Tabela 6). O Diagrama de Pareto (Figura 1) também exibe as condições significativas.

Tabela 7 - Estimativa dos efeitos para a imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em resíduo têxtil com partículas magnéticas

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t_{calc}^a (2 gl ^b)	p – valor	Estimativa por intervalo (95%)	
					Limite inferior	Limite superior
Média	10,03	0,26	39,29	0,00065	8,93	11,13
X₁	-5,59	0,68	-8,27	0,01432	-8,49	-2,68
X₂	1,22	0,67	1,80	0,21389	1,69	4,12
X₁X₂	-5,89	0,68	-8,71	0,01292	-8,79	-2,98

^ateste t (Student) calculado; ^bgl=graus de liberdade; $t_{\text{tab}}(t_{(2;5\%/2)}) = \pm 4,3$
Fonte: próprio autor.

Figura 10 - Diagrama de Pareto da atividade de lipase de *Botryosphaeria ribis* EC - 01 imobilizada em resíduo têxtil com partículas magnéticas



Fonte: O próprio autor

Dado a falta de ajuste do modelo (R^2 0,77) ter sido significativa, a geração de uma nova matriz visando otimizar a atividade da lipase imobilizada em TEPM, certamente apresentará menores tempos de reação.

5.2.2 Tratamento II

Baseado nos resultados obtidos no Tratamento I, planejamentos fatoriais 2^2 foram desenvolvidos utilizando-se novos níveis de variação a fim de

melhorar a curva da superfície de resposta em direção à máxima imobilização de lipases nos dois suportes em termos de U/g_{suporte}.

Os resultados experimentais obtidos com a imobilização de lipase em TE estão apresentados na Tabela 8 (experimentos 1–11). A melhor resposta obtida foi 34,3 U/gTE quando os fatores tempo (X₁) e temperatura (X₂) foram de 90 minutos e 11 °C, respectivamente.

Tabela 8 - Imobilização de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em resíduo têxtil

Experimentos	Variáveis codificadas		Respostas		
	X ₁	X ₂	U/g _{TE}		
1	-1	-1	22,6		
2	-1	1	29,5		
3	1	-1	28,4		
4	1	1	29,8		
5	-1,41	0	23,1		
6	1,41	0	30,2		
7	0	-1,41	34,3		
8	0	1,41	32,5		
9	0	0	31,1		
10	0	0	30,8		
11	0	0	29,2		
Fatores	Níveis reais				
	-1,41	-1	0	1	1,41
X ₁ (tempo, min)	69	75	90	105	111
X ₂ (temperatura, °C)	11	13	18	23	25

Fonte: próprio autor.

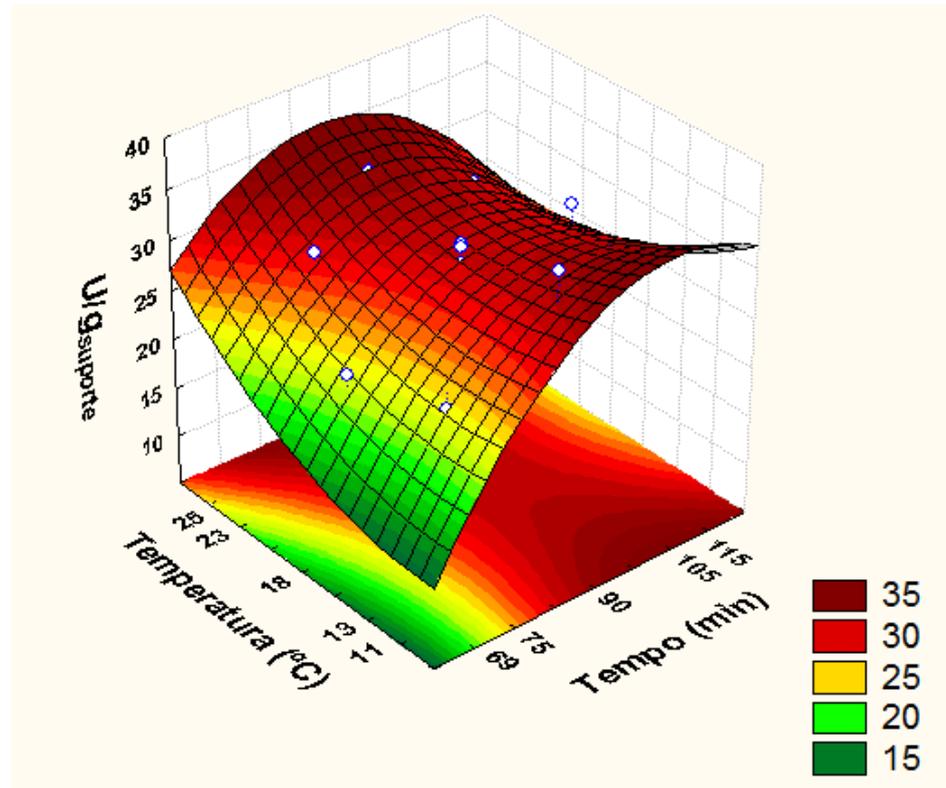
A equação polinomial quadrática relacionando os fatores e a resposta está mostrada abaixo. A variável tempo foi significativa para a imobilização de lipases ($p \leq 0,1$). Os fatores significativos assim como os efeitos de interação estão em negrito nesta equação.

$$U/g_{TE} = \mathbf{30,4} + \mathbf{2,03 X_1} - \mathbf{2,47 X_1^2} + 0,724 X_2 + 0,913 X_2^2 - 1,37 X_1 X_2 \quad (6)$$

De acordo com a superfície resposta gerada pelo modelo proposto a curva tridimensional, a imobilização máxima de lipase estimada pelo modelo foi

alcançada no ponto de sela (30,8 U/g_{TE}), quando tempo e temperatura foram de 97 minutos e 18 °C, respectivamente.

Figura 11 - Superfície de resposta para a imobilização de lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em resíduo têxtil – Tratamento II (atividade em U/g_{suporte})



Fonte: próprio autor

O modelo quadrático está apresentado na Tabela 9 e mostra que $F_{\text{calc}} > F_{\text{list}}$ nos graus de liberdade correspondentes à imobilização de lipase em TE. O valor F e o valor do coeficiente de regressão (R^2) mostram que o modelo ajustado teve boa capacidade preditiva e é estatisticamente válido.

Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial 2^2 para a imobilização de lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em resíduo têxtil -Tratamento II

Resposta	Fonte de variação	Soma Quadrados (SS)	Graus de Liberdade (DF)	Média Quadrados (MS)	F teste	
					F_{calc}^a	F_{list}
U/g _{suporte}	Modelo	95,226	2	47,613	12,5	3,11
	Resíduo	30,554	8	3,8193		
	Total	125,78	10			

$R^2 = 0,76$ ^a $F_{90\%} = 2,8$

Os resultados experimentais obtidos com a imobilização de lipase em TEPM estão apresentados na Tabela 10 (experimentos 1–7). O máximo de atividade enzimática foi obtido no experimento 3 (49,3 U/g_{TEPM}). Os fatores tempo (X_1) e temperatura (X_2) neste experimento foram de 105 minutos e 13 °C, respectivamente.

Tabela 10 - Imobilização de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em resíduo têxtil com partículas magnéticas

Experimentos	Variáveis codificadas		Respostas
	X_1	X_2	U/g _{TEPM}
1	-1	-1	23,296
2	-1	1	22,407
3	1	-1	49,281
4	1	1	27,097
5	0	0	27,808
6	0	0	23,717
7	0	0	27,808
Fatores	Níveis reais		
	-1	0	1
X_1 (tempo, min)	75	90	105
X_2 (temperatura, °C)	13	18	23

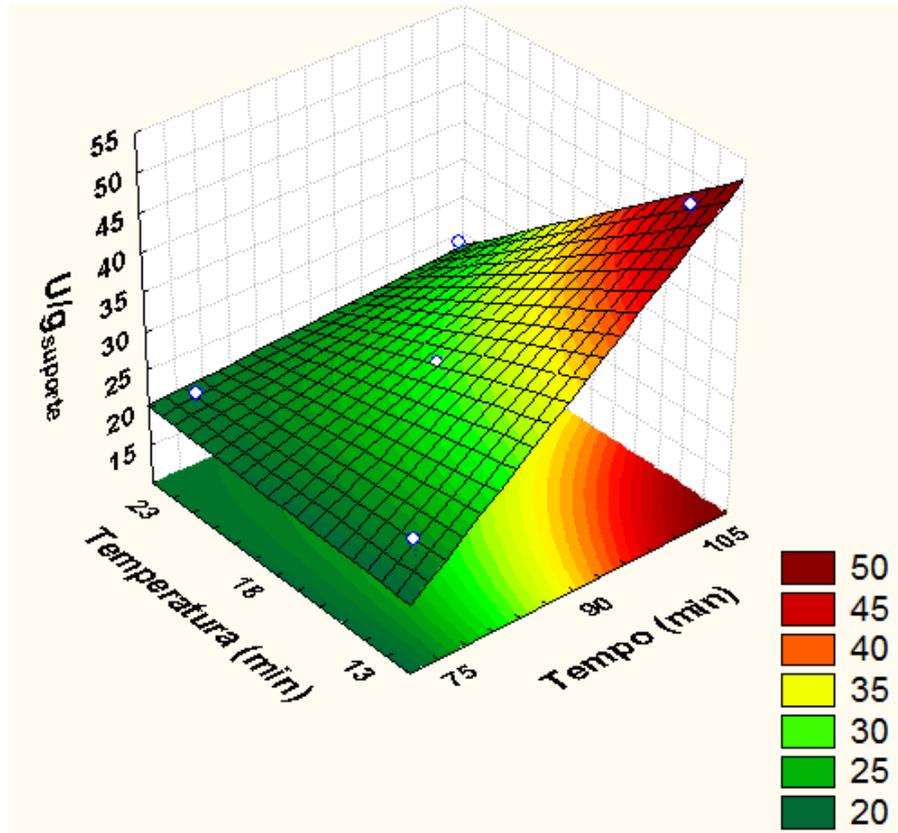
Fonte: próprio autor

De acordo com o modelo linear, tempo e temperatura, bem como a interação entre essas variáveis foram significativos na imobilização de lipases em TEPM ($p \leq 0,1$). A equação preditiva é mostrada abaixo e os termos significativos estão em negrito:

$$U/g_{TEPM} = \mathbf{28,8} + \mathbf{7,67 X_1} - \mathbf{5,77 X_2} - \mathbf{5,32 X_1 X_2} \quad (7)$$

O gráfico de superfície de resposta gerado a partir do ajuste do modelo (Figura 12) indica a influência das variáveis na imobilização de lipases em TEPM (U/g_{TEPM}) e a resposta obtida do modelo linear preditivo foi maior que 50 U/g_{TEPM}.

Figura 12 - Superfície de resposta para a imobilização de lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em resíduo têxtil com partículas magnéticas – Tratamento II (atividade em U/g_{suporte})



Fonte: próprio autor.

O valor de $R^2 = 0,92$ e $F_{cal} > F_{tab}$ ($12,2 > 5,39$) obtidos (Tabela 11) mostraram que o modelo é confiável e estatisticamente significativo ($p \leq 0,1$).

Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial 2^2 para a imobilização de lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em resíduo têxtil com partículas magnéticas - Tratamento II

Resposta	Fonte de variação	Soma Quadrados (SS)	Graus de Liberdade (DF)	Média Quadrados (MS)	F teste	
					F_{calc}^a	F_{list}
U/g _{suporte}	Modelo	481,68	3	160,56	12,2	5,39
	Resíduo	39,639	3	13,213		
	Total	521,32	6			

$R^2 = 0,92$ ^a $F_{90\%} 3,3$

Fonte: próprio autor.

5.2.3 Validação dos Modelos

A validação experimental dos modelos foi realizada em três condições estabelecidas para a lipase imobilizada em TE, sendo estas o ponto de sela e as duas condições máximas previstas pelo modelo. Já para a validação do modelo para a imobilização de lipases em TEPM foi considerado o experimento 3 que obteve o máximo de resposta.

A Tabela 12 apresenta os resultados experimentais obtidos e os preditivos (intervalo de confiança de 95 %) pelo modelo destas condições experimentais de imobilização de lipases em resíduo têxtil.

Tabela 12 - Comparação dos resultados experimentais com os preditivos calculados pelo modelo matemático na imobilização de lipases em resíduo têxtil

Suporte	Experimento	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Observado ^a (U/g _{suporte})	Predito (U/g _{suporte})
TE	A	90	25	37,7 ± 1,69	33,2
	B	97	18	54,2 ± 5,82	30,8
	C	105	11	40,7 ± 9,00	32,7
TEPM	A	105	13	61,7 ± 2,50	47,5

^a os experimentos foram conduzidos em quintuplicata a 150 rpm e solução enzimática (10,1 U/mL).

Os resultados obtidos experimentalmente para a imobilização de lipases em TE nas três condições definidas pelo modelo estão acima dos valores preditos calculados pelo modelo. Observando estes valores, pode-se concluir que a melhor condição de imobilização de lipases em TE foi 97 minutos e 18 °C, valores próximos do ponto central avaliado no planejamento.

O resultado obtido na validação da imobilização de lipases em TEPM também extrapolou o predito, sendo este o maior valor alcançado, evidenciando que este suporte é promissor na imobilização de lipases.

5.3 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA LIPASE DE *BOTRIOSPHAERIA RIBIS* EC-01 IMOBILIZADA

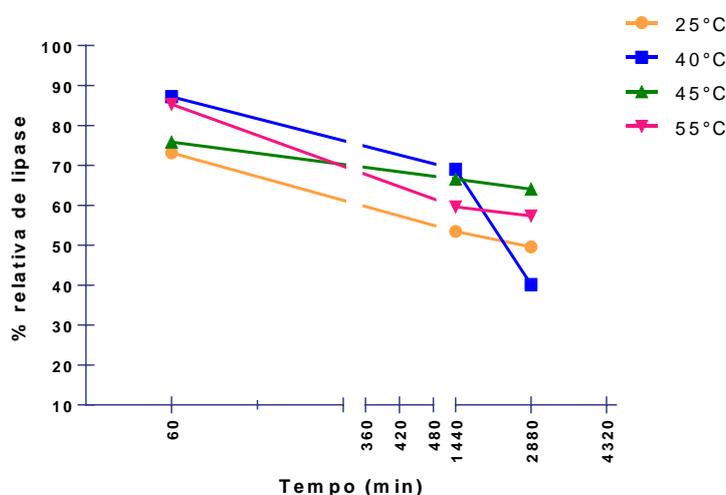
5.3.1 Estabilidade Térmica

A temperatura é um importante fator a ser investigado quando se almeja a produção de um biocatalisador efetivo, já que altas temperaturas podem causar uma desativação da enzima (JEGANNATHAN et al., 2008; GHALY et al., 2010). Por este motivo é necessário investigar fatores que interferem diretamente na estabilidade da enzima, tendo em vista que o ambiente de um reator onde o biocatalisador irá atuar é bem diferente para a enzima do que seu ambiente celular natural (BAJAJ et al., 2010; GHALY et al., 2010).

A estabilidade da lipase de *Mucor javanicus* foi avaliada à 60°C foi avaliada tanto na lipase livre quanto imobilizada em nanoparículas de sílica e o resultado foi que quando livre a lipase manteve a sua atividade em cerca de 19%, enquanto que imobilizada manteve até 68% da atividade sua atividade inicial. (KIM et al., 2006)

Portanto, para garantir uma melhor efetividade do biocatalisador produzido, a estabilidade da enzima imobilizada foi testada, tanto frente a temperatura quanto à diferentes compostos geralmente presentes no meio reacional de produção de biodiesel. Os resultados da estabilidade térmica da lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em TE e TEPM durante 48 h nas temperaturas de 25 a 55 °C, estão apresentadas nas Figura 13 e 14 respectivamente.

Figura 13 - Estabilidade térmica da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em resíduo têxtil durante 48 h nas temperaturas de 25, 40, 45 e 55 °C. A atividade foi determinada na condição padrão descrita no item 4.2.4.

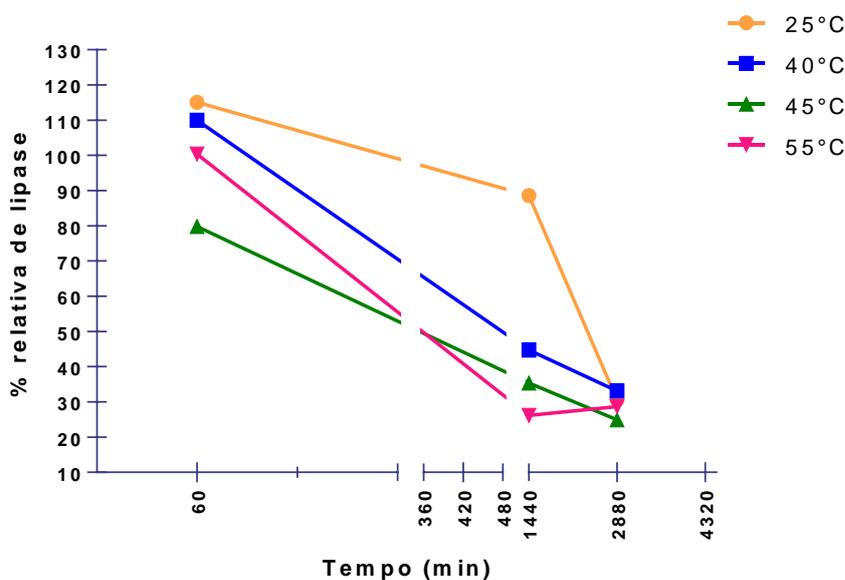


Fonte: próprio autor

Na figura 13 é possível perceber que a lipase de *B. ribis* EC-01

imobilizada em TE se manteve estável até 24h em todas as temperaturas, mantendo no mínimo 69% de sua atividade residual. Na temperatura de 45 °C ficou ativa (73 %) durante as 48 h.

Figura 14 - Estabilidade térmica da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em TEPM durante 48 h nas temperaturas de 25, 40, 45 e 55 °C. A atividade foi determinada na condição padrão descrita no item 4.2.4.



Fonte: próprio autor.

Por meio da figura 14, é possível observar que a lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em TEPM foi estável durante 1h em todas as temperaturas testadas. Na temperatura de 25°C manteve sua atividade total durante 48 h.

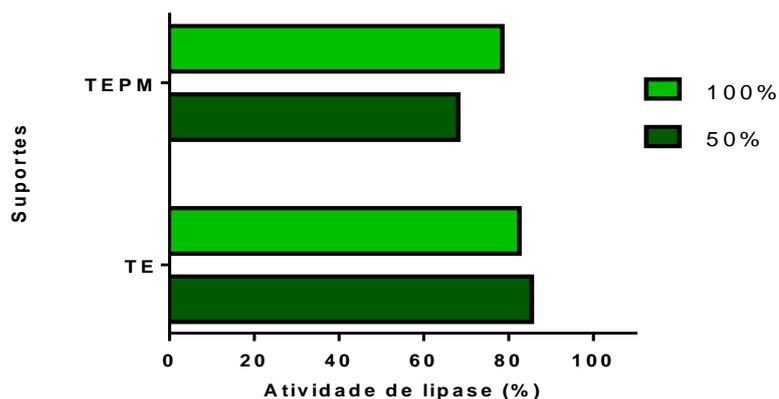
5.3.2 Estabilidade em Solventes

Visando a aplicação deste biocatalisador na síntese de biodiesel, alguns compostos como metanol, etanol e glicerol foram testados para avaliar a estabilidade da lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em TE e TEPM em concentrações de 10, 25, 50 e 100 % (v/v).

A Figura 15 apresenta a estabilidade da lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em TE e TPM incubada em glicerina (50% e 100%, v/v). Como pode ser

observado, neste ensaio a lipase apresentou valores consideráveis de estabilidade nos dois suportes, apresentando atividade residual mínima de 82,5% e 78,5% em TE e TEPM, respectivamente, frente a porcentagem máxima de glicerol (100%, v/v).

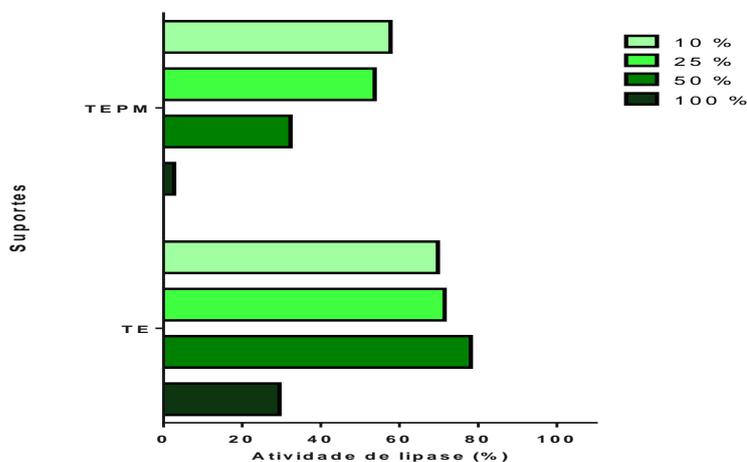
Figura 15 – Estabilidade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em TE e TEPM em glicerina (50 % e 100%, v/v)



Fonte: próprio autor

A Figura 16 apresenta a estabilidade das enzimas imobilizadas em metanol. A lipase imobilizada em TE se manteve estável até 50%(v/v) de metanol, apresentando atividade residual igual a 78,1 %. Já a lipase imobilizada em TEPM apresentou metade do valor de sua atividade (53,7 %) já em 25% (v/v). Sendo assim, o suporte TE apresentou-se mais estável.

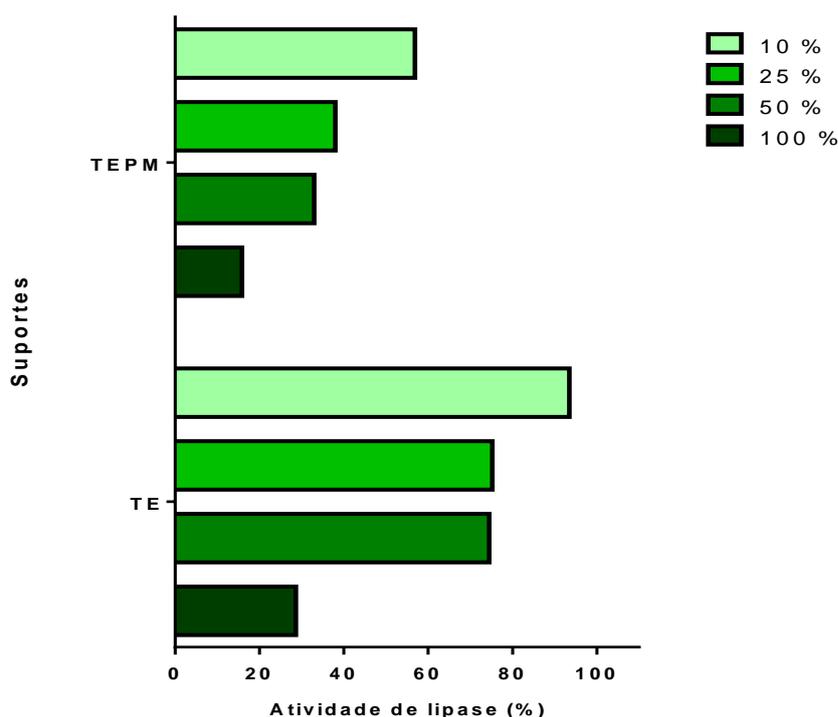
Figura 16 - Estabilidade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em diversos suportes em metanol a 10, 25, 50 e 100 % (v/v)



Fonte: próprio autor

A Figura 17 apresenta a estabilidade dos imobilizados em etanol. Pode-se observar que a enzima imobilizada em TE foi mais estável que em TEPM. Porém, a lipase imobilizada em TEPM apresentou estabilidade moderada até 50 % (v/v) de etanol, apesar de ser uma estabilidade menor quando comparada a TEPM, ainda se considera uma boa estabilidade.

Figura 17 - Estabilidade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em tecido com e sem partículas magnéticas em etanol a 10, 25, 50 e 100 % (v/v)



Fonte: próprio autor

Brocca et al. (2003) constatou que em altas concentrações de solventes orgânicos, as lipases podem ser desnaturadas e, por conseguinte, sua atividade pode ser limitada em sistemas contendo esses solventes.

Contudo apesar de apresentar menor atividade residual em maiores concentrações dos solventes metanol e etanol, a lipase de *B. ribis* imobilizada tanto em TE como em TEPM apresentou uma boa estabilidade nos solventes testados em consideráveis concentrações, fato este interessante, pois esta estabilidade permite, por exemplo, a utilização desta enzima na produção de biodiesel, porque o metanol e etanol podem ser utilizados no meio reacional em pequenas porcentagens e o glicerol é o coproduto da reação. Os dados referentes a estabilidade a diferentes

compostos foram reorganizados na tabela 14 para melhor aferição dos dados obtidos.

Tabela 13 - Estabilidade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em tecido (TE) e em tecido com partículas magnéticas (TEPM) em metanol, etanol e glicerol em diversas concentrações

Solventes (% v/v)	Atividade residual relativa (%) ^a	
	TE	TEPM
Controle	100 ± 0,00	100 ± 0,00
Glicerol		
(50,0)	85,5 ± 4,60	68,1 ± 1,67
(99,5)	82,5 ± 1,93	78,5 ± 1,37
Metanol		
(10,0)	69,8 ± 4,90	57,7 ± 2,23
(25,0)	71,5 ± 5,25	53,7 ± 0,20
(50,0)	78,1 ± 5,06	32,3 ± 2,71
(99,8)	29,5 ± 1,86	2,72 ± 2,08
Etanol		
(10,0)	93,5 ± 5,02	56,9 ± 1,59
(25,0)	75,2 ± 1,56	37,9 ± 1,46
(50,0)	74,4 ± 1,48	32,9 ± 3,83
(99,5)	28,6 ± 2,67	15,9 ± 0,34

^a 1h a 30°C. pNPP usado para determinar a atividade de lipase (item 4.2.4).
Fonte: O próprio autor.

Lipases provenientes de outros fungos, apresentaram bons resultados de estabilidade frente a estes solventes, por exemplo a lipase de *Fusarium heterosporum* apresentou uma atividade de 73% e 54% quando incubada durante 20 h na presença de 50% de metanol e etanol, respectivamente (SHIMADA et al., 1999). Já a lipase de *Pseudomonas aeruginosa*, apresentou uma atividade residual de 97,4% e 102% com 25% de metanol, e etanol, respectivamente (GAUR et al., 2008). A elevada atividade em solventes hidrofílicos foi também referida por ZHANG et al. (2009) para a lipase de *Pseudomonas fluorescens* JCM5963. No entanto, estes três autores também observaram alta atividade em solventes hidrofóbicos.

5.4 EFEITO DO PH E TEMPERATURA

Afim de proporcionar o desenvolvimento de um biocatalisador efetivo e estável se torna necessário estudar o efeito de variáveis que influenciam diretamente na atividade da enzima imobilidade. Sendo assim, no presente trabalho foram realizados ensaios afim de definir o melhor pH e temperatura, nos quais a lipase em estudo apresentasse atividade máxima. Variáveis como pH, tempo de imobilização e temperatura têm sido descritos por vários pesquisadores (LIU et al., 2012; CHANG et al., 2007; CHANG et al., 2008; HUANG et al., 2011).

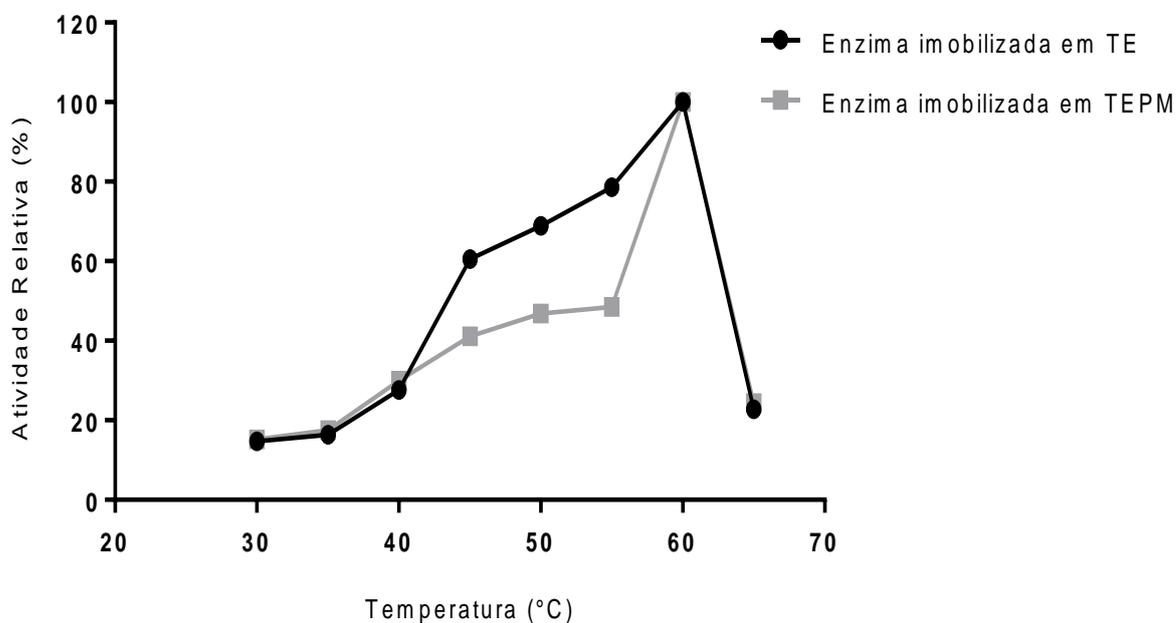
5.4.1 Temperatura e pH Ótimos

A temperatura é um parâmetro chave, pois pode afetar tanto a conformação da lipase quanto a taxa de reação. Uma reação catalisada por lipase é lenta a uma temperatura baixa. Entretanto, em uma temperatura mais elevada pode induzir a um aumento na taxa de reação, podendo também diminuir a estabilidade da enzima (GADERINEZHAD et al., 2014). Neste sentido, a temperatura ótima depende da interação entre a estabilidade operacional das enzimas e a taxa de reação (KUMARI et al., 2009; LI; DONG, 2016).

A lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em resíduo têxtil foi testada em temperaturas de 30 a 65 °C, pois se levou em consideração a temperatura de produção de biodiesel utilizando lipase como catalisador, que se apresenta normalmente entre 30 e 55 °C, levando em consideração também que esta lipase teve seu máximo de atividade a 55 °C em trabalhos anteriores (ANDRADE, 2013).

A Figura 16 apresenta o resultado deste teste realizado com a enzima imobilizada em TE e TEPM.

Figura 18 - Efeito da temperatura na atividade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em tecido (TE) e em tecido com partículas magnéticas (TEPM). A atividade foi determinada na condição padrão descrita no item 4.2.4.



Fonte: próprio autor

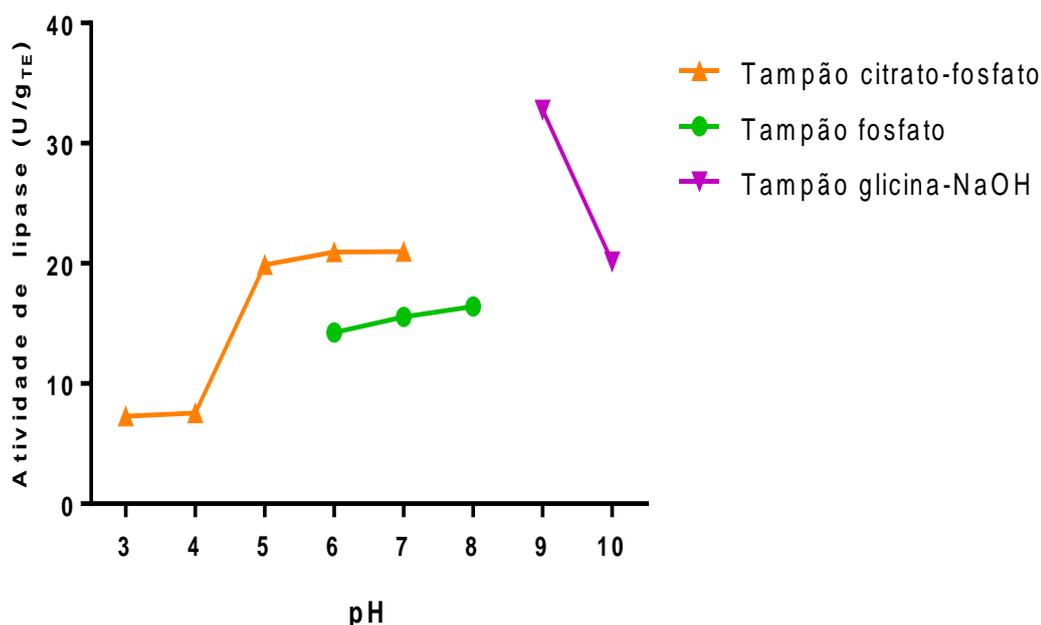
Como citado anteriormente, em trabalhos anteriores a lipase livre de *B. ribis* EC-01 demonstrou atividade ótima em temperatura de 55 °C quando livre e lipase imobilizada em celite mostrou uma atividade superior a 55 °C. As atividades relativas para a lipase imobilizada a 60 e 65 °C foram 88 e 75%, respectivamente, enquanto que para a lipase livre foram 64 e 53%(ANDRADE et al 2013), respectivamente para estas temperaturas. Resultados semelhantes foram descritos por Liu et al. (2004) com uma lipase de *Burkholderia* imobilizada covalentemente em Celite. Como pode ser observado na Figura 16, neste trabalho, a lipase de *B. ribis* EC-01 apresentou uma temperatura ótima de 60°C nos dois suportes de imobilização, um valor compatível com o relatado anteriormente.

Christopher et al. (2014) afirma que a maioria das lipases apresentam temperatura ótimo entre 30 e 60 °C, sendo que apresentam esta estabilidade térmica tanto livres quanto imobilizadas, contudo quando imobilizada adequadamente, esta lipase pode apresentar uma maior termo estabilidade, apresentando assim um maior valor de temperatura ótima, o que explica este

aumento de temperatura ótima observado (MARCHETTI et al., 2011; BALCÃO et al., 1996).

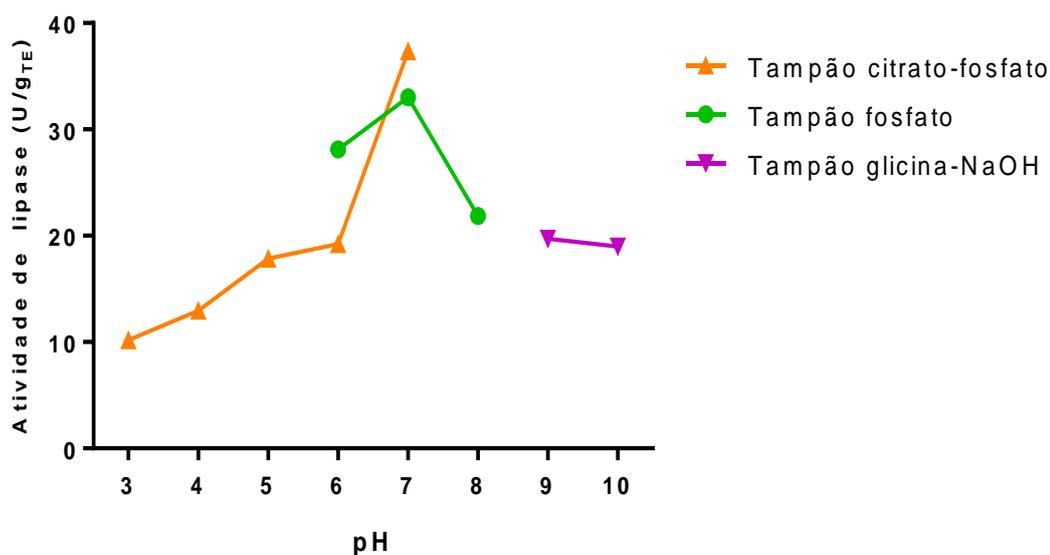
As lipases são geralmente estáveis em pH neutro e muito estáveis em pH alcalino (LIMA et al., 2004). Em trabalhos anteriores a lipase de *B. ribis* EC-01 mostrou ser ativa na gama do pH avaliado (3-10), e a maior actividade foi detectada a pH 8 em tampão fosfato (ANDRADE et al., 2014). Como pode ser observado nas Figuras 18 e 19, a lipase imobilizada tanto em TE quanto em TEPM manteve resultados parecidos, pois apresentou o pH ótimo em torno de 8,0 e 7,0, que está de acordo com outros fungos produtores Lipases que têm sido geralmente descritos para variar entre 6 a 9 (LIMA et al., 2004; LIU et al., 2009)

Figura 19 - Efeito do pH na atividade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em TE. A atividade foi determinada em pH 8 na condição padrão descrita no item 4.2.4



Fonte: próprio autor

Figura 20 - Efeito do pH na atividade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizada em TEPM. A atividade foi determinada em pH 8 na condição padrão descrita no item 4.2.4



Fonte: próprio autor

5.5 APLICAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

5.5.1 Produção de Biodiesel utilizando a Lipase Imobilizada de *Botryosphaeria ribis* EC-01

5.5.1.1 Reação de hidrólise de óleo de soja catalisada pela lipase de *Botryosphaeria ribis*.

Tratamento I

Neste primeiro tratamento foi adicionado uma quantidade de tampão fosfato 0,05 M pH 8 com triton X-100 (0,44%) ao meio reacional a fim de garantir o pH do meio com intuito de evitar a desnaturação enzimática. O produto final desta reação é apresentado na Figura 21.

Figura 21 - Resultado da primeira reação de hidrólise catalisada por lipase imobilizada em TE e em TEPM



Fonte: O próprio autor.

Como pode ser observado neste tratamento não ocorreu a separação de fases dos produtos, apenas é possível observar uma emulsão branca. Uma possível explicação para este fenômeno é que o cátion Na^+ proveniente do tampão fosfato de sódio pode ter reagido com as hidroxilas (OH) presentes no suporte de resíduo têxtil formando NaOH, o que favorece reações de saponificação, muito indesejadas na produção do biodiesel, essas reações inativam o catalisador rapidamente e diminuindo assim o rendimento da reação (KOUZU et al., 2008). Devido a este insucesso do primeiro tratamento, um novo tratamento foi realizado, desta vez sem o tampão fosfato, adicionando assim somente água com Triton X-100 (0,44%).

Tratamento II

Ao término no período reacional, a enzima imobilizada em TE pode ser facilmente retirada do meio reacional com o auxílio de uma pinça, e o imobilizado TEPM foi recuperado do meio reacional com o auxílio de um ímã.

A imagem 22 representa a separação de fases dos produtos resultantes de uma das amostras da reação de hidrólise, pois todos os resultados foram semelhantes. Como pode ser observado na figura, na parte superior se encontram os ácidos graxos e na parte inferior o glicerol e água residuais

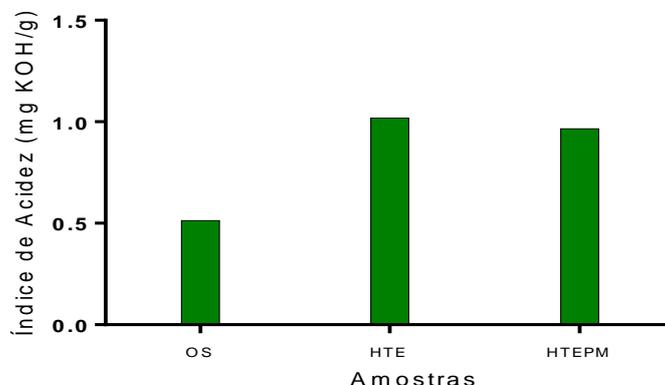
Figura 22 - Produtos de uma das amostras da reação de hidrólise de óleo de soja, utilizando como catalisador a lipase de *Botryosphaeria ribis* imobilizada em resíduos têxteis com e sem partículas magnéticas



Fonte: próprio autor.

Wang et al. (2012) afirmaram que a variação do índice de acidez é um indicador da ocorrência da reação de esterificação, logo, os ácidos graxos livres presentes no óleo residual foram medidos utilizando o índice de acidez (IA), que consiste em quantificar a massa de hidróxido de potássio (KOH) em miligramas, consumida na neutralização dos ácidos graxos livres presentes em um grama de amostra de óleo. O cálculo é feito em função do volume de solução básica de KOH gasta na titulação. A acidez de um óleo não pode ser entendida como uma constante, uma vez que provém da hidrólise parcial dos triglicerídeos e, por isso, é associada ao grau de degradação do óleo (SANTOS et al., 2017). Os resultados obtidos neste teste estão expressos na Figura 23.

Figura 23 - índice de acidez do Óleo de Soja (OS), do produto da Hidrólise utilizando lipases imobilizadas em TE (HTE) como catalisador e produto da Hidrólise utilizando lipases imobilizadas em TEPM (HTEPM)



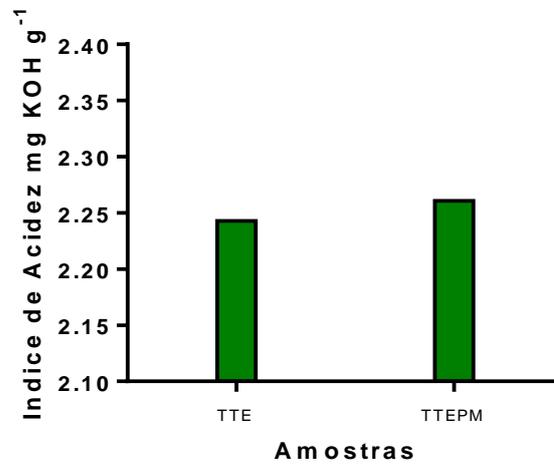
Fonte: o próprio autor.

Por meio dos dados apresentados na Figura 23 é possível perceber que o nível de acidez do óleo de soja está dentro do permitido apresentando um valor de $0,5137 \text{ mg KOH g}^{-1}$, a partir deste dado é possível concluir a eficiência da reação tendo em vista que o índice de acidez nos produtos da hidrólise foi maior do que do óleo inicial. O produto da hidrólise catalisada pela lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em TE apresentou um índice de acidez igual a $1,017 \text{ mg KOH g}^{-1}$, enquanto o produto da hidrólise catalisada pela lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em TEPM apresentou um índice de acidez igual a $0,9654 \text{ mg KOH g}^{-1}$, confirmando assim o aumento de ácidos graxos decorrente da reação de hidrólise.

5.5.1.2 Reação de transesterificação de óleo de soja catalisada pela lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01

A reação de transesterificação foi realizada conforme descrita no item 4.4.2, entretanto quando avaliado o produto da reação por CG não foi possível identificar nenhum éster na amostra, comprovando assim que não ocorreu a reação de transesterificação. Entretanto, quando realizado o teste de índice de acidez na mesma amostra foi possível perceber um índice maior que o obtido na reação de hidrólise, concluindo assim que não ocorreu apenas a reação de hidrólise, devido ao alto índice de acidez da amostra. Os resultados deste teste estão expressos na Figura 25.

Figura 24 - Índice de Acidez das amostras pós Transesterificação utilizando lipase de *Botryosphaeria ribis* imobilizada nos dois suportes.

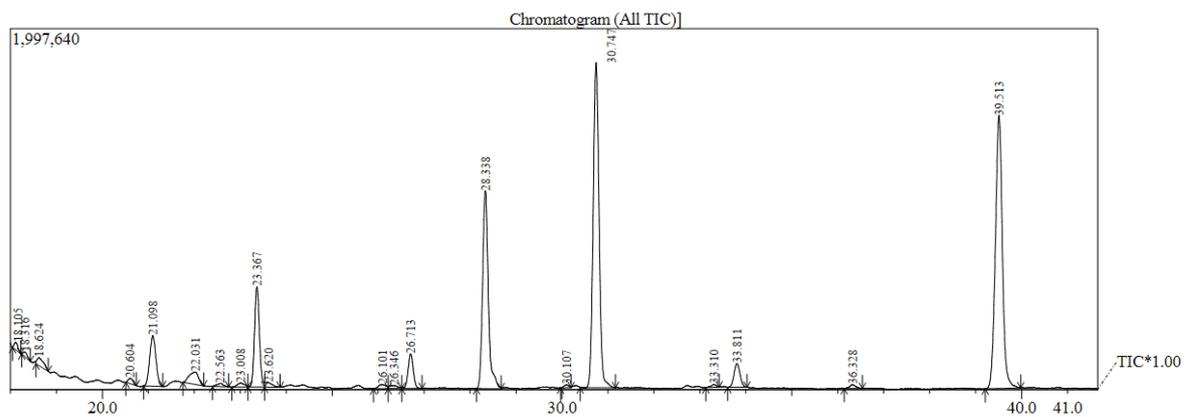


Fonte: O próprio autor.

5.5.1.3 Reação de Hidroesterificação dos ácidos graxos provenientes da hidrólise do óleo de soja catalisada pela lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01

Os ácidos graxos provenientes das duas reações catalisadas por *B. ribis* EC-01 foram submetidos a uma reação de esterificação química a fim de se obter o biodiesel. O produto desta reação foi avaliado por CG. A Figura 24 exemplifica os cromatogramas obtidos nesta análise.

Figura 25 - Cromatograma obtido pós esterificação dos ácidos graxos produtos da hidrólise enzimática.

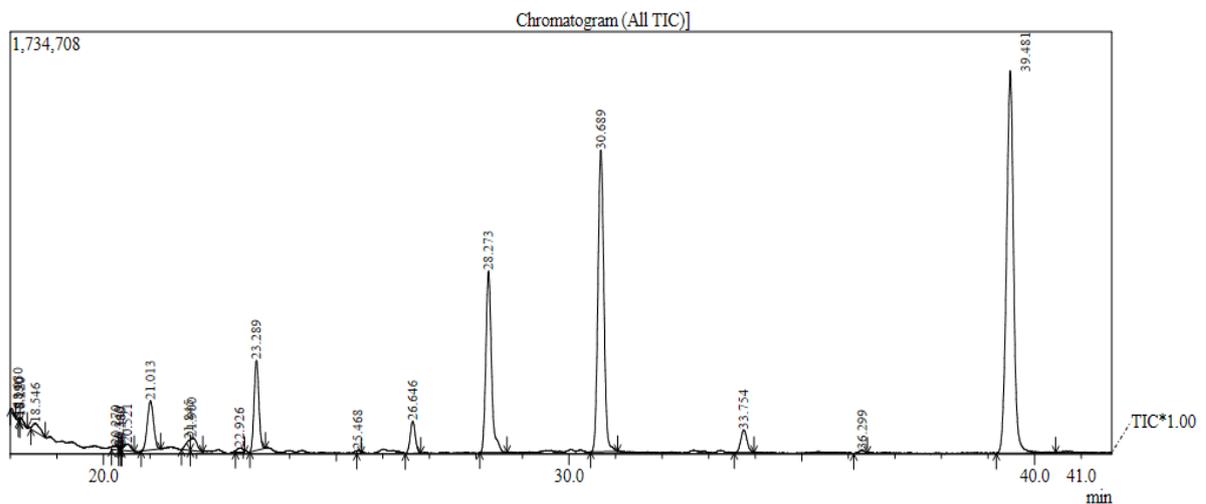


Fonte: próprio autor

O Cromatograma de biodiesel a partir de óleo de soja (Figura 25) mostrou que existiam cinco ésteres metílicos de ácidos graxos, o éster metílico do ácido hexadecáico ($C_{17}H_{34}O_2$), éster metílico do ácido octadecadienóico ($C_{19}H_{38}O_2$), éster metílico do ácido 9-octadecadienóico ($C_{19}H_{36}O_2$), éster metílico do ácido 9, 12-octadecadienóico ($C_{19}H_{34}O_2$) e o éster metílico do ácido eicosatrienóico ($C_{21}H_{36}O_2$), confirmando que houve a eficiência na produção de biodiesel.

5.5.2 Produção de Biodiesel por catálise química

Figura 26 - Cromatograma obtido pós transesterificação do óleo de soja.



Fonte: próprio autor

Como pode ser observado, o cromatograma resultante dos ésteres provenientes da transesterificação química se assemelha com o obtido anteriormente com a hidroesterificação híbrida, com hidrólise enzimática e esterificação química, comprovando assim a efetividade dos dois métodos para a produção de ésteres de biodiesel.

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento deste projeto se deu a partir da necessidade de agregar valor aos coprodutos da agroindústria, a partir da reutilização dos mesmos, como por exemplo, a torta de soja que foi utilizada como fonte de carbono e nitrogênio na produção de enzimas. A utilização de resíduos têxteis na fabricação de suportes para imobilização das enzimas também contribuiu para uma destinação destes resíduos.

Sendo assim, no desenvolver deste Trabalho de Conclusão de Curso foi possível produzir enzimas de forma eficaz, utilizando substratos de resíduos agroindustriais, visto que após a concentração desta enzima com sulfato de amônio aumentou-se a atividade específica.

Foi possível também produzir um suporte de imobilização efetivo e aplicável, reutilizando os resíduos têxteis provenientes dos laboratórios do Campus. Os suportes foram avaliados termicamente e frente a diversos compostos utilizados na síntese de ésteres de biodiesel e mostraram-se estáveis e promissores para esta aplicação.

A aplicação destes na produção de ésteres de biodiesel via transesterificação não foi efetiva, necessitando de ajustes nas condições operacionais. Já a hidroesterificação mostrou-se promissora visto que após a reação de hidrólise o índice de acidez aumentou nas soluções contendo tanto a enzima imobilizada em TE, como TEPM. A reação posterior de hidroesterificação foi satisfatória comprovada pelos produtos analisados por CG.

A partir deste trabalho será possível o estudo de melhores condições para as reações de hidroesterificação e transesterificação utilizando principalmente a enzima imobilizada em TEPM que facilita a recuperação da mesma.

REFERÊNCIAS

- ABRELPE, 2011, PANORAMA DOS RESÍDUOS SÓLIDOS NO BRASIL, **Associação Brasileira das Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais**. Disponível em: <http://www.abrelpe.org.br/>. Acesso em 18 de Maio, 2017.
- AKOZ, E.; SAYIN, S.; KAPLAN, S.; YILMAZ, M. Improvement of catalytic activity of lipase in the presence of calix [4] arene valeric acid or hydrazine derivative. **Bioprocess Biosyst Eng.** v.38, p. 595–604, 2015.
- AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels Bioproducts Biorefining**, v. 1, p. 57-66, 2007.
- ANDRADE, M. M.; BARBOSA A. M.; BOFINGER, M. R.; DEKKER R. F. H.; MESSIAS, J. M.; GUEDES, C. L. B. et al.; Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on soybean and castorbean meals: optimization. Immobilization and application for biodiesel production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, p. 1792-1806, 2013.
- ANDRADE, M. M.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; REZENDE, M. I. MESSIAS, J. M.; DALL'ANTONIA, L. H. Lipase Production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on Soybean Meal Supplemented with Amino Acids, and Some Physicochemical Properties of the Enzyme. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**. v.16, n.3, p. 169-177, 2014.
- ANDRADE, Milena Martins. **Produção e imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 e aplicações**. 2013. 208p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.
- ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. <http://www.anp.gov.br/?id=268>, Acesso em novembro de 2017.
- BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 9-14, 2010.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**. v.8, p. 392-416, 1996.
- BARBOSA, A.M., DEKKER, R.F.H., KURTBÖKE, I.; HARDY, G.E. *In-vivo* decolonization of Poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation. **4th Pacific Rim Biotechnol. Conf.**, Melbourne, Australia, p. 88-90, 1995.
- BARBOSA, A.M., DEKKER, R.F.H.; HARDY, G.E. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 93-96, 1996.
- BARBOSA, A.M.; MESSIAS, J.M.; ANDRADE, M. M.; DEKKER, R.F.H.; VENKATESAGOWDA, B. Soybean oil and meal as substrates for lipase production

by *Botryosphaeria ribis*, and soybean oil to enhance the production of Botryosphaeran by *Botryosphaeria rhodina*. In: **Soybean, Biochemistry, Chemistry and Physiology**. p. 101-118, 2011.

BOSLEY, A., PIELOW, A. Immobilization of lipases on porous polypropylene: reduction in esterification efficiency at low loading. **Journal of American Oil Chemists Society** 74 (1), 107–111, 1997.

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 54-248, 1976.

BROCCA, S.; SECUNDO, F.; OSSOLA, M.; ALBERGHINA, L.; CARREA, G.; LOTTI, M. 2003. Sequence of the lid affects activity and specificity of Candidarugosalipase isoenzymes. **Protein Science**. v. 12 (10), p.2312–2319, 2003.

CHANG, S.-F.; CHANG, S.-W.; YEN, Y.-H.; SHIEH, C.-J. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM. **Applied Clay Science**, v. 37, p. 67-73, 2007.

CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**. V. 19, p. 497-520, 2014.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**. Editora EPUB: São Paulo. 2008.

CORADI, G. V.; VISITAÇÃO, V. L.; LIMA, E. A.; SAITO, L. Y.; PALMIERI, D. A.; TAKITA, M. A.; OLIVA NETO, P.; LIMA, V. M. G. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. **Annals of Microbiology**. v. 63, p. 533–540, 2013.

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

DALMAU, E; MONTESINOS, J.L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 657-663, 2000.

EMTIAZI, G.; HABIBI, M. H.; TAHERI, A. R. Production of thermostable extracellular lipase by *Pseudomonas* grown on cotton cake and cod removal of sunflower oil waste. **Fresenius Environ**. 12, p. 704-708, 2003.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; CABRESA, Z.; GODOY, C.; FERNANDEZ_LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUIBAN, J. M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**. v. 43 p.1061–1067, 2008.

FLEURI, L. F.; OLIVEIRA, M. C.; ARCURI, M. L. C.; CAPOVILLE, B. L.; PEREIRA, M. S.; DELGADO, C. H. O.; NOVELLI, P. K. Production of Fungal Lipases Using

Wheat Bran and Soybean Bran and Incorporation of Sugarcane Bagasse as a Co-substrate in Solid-state Fermentation. **Food Sci. Biotechnol**, 2014.

GALVÃO, W.; KAMIMURA, E. S.; RIBEIRO, E. J.; PESSELA, C. B.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification**. v.123, p.26-34, 2016.

GAUR, R.; GUPTA, A.; KHARE, S.K. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Process Biochemistry**, v. 43, p.1040-1046, 2008.

GERPEN, J.V. Biodiesel processing and production, **Fuel Process. Technol.** v.86, p.1097–1107, 2005.

GHADERINEZHAD, F.; KARIMINIA, H. R.; YAGHMAEI, S. Production of biodiesel from waste frying oil using whole cell biocatalysts: optimization of effective factors. **Waste Biomass**. v.5, p.947-954, 2014.

GHALY, A. E.; DAVE, D.; BROOKS, M. S.; BUDGE, S. Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification: Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology** , v. 6, n.2, p. 54-76, 2010.

GREEN, A. A.; HUGHES, W. L. Protein solubility on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. **Methods Enzymol**. v.1, p.67–90, 1955.

HOMAEI, A. A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: an update. **Journal of Chemical Biology**. v.6, p.185–205, 2013.

ITO, T.; KIKUTA, H.; NAGAMORI, E.; HONDA, H; OGINO, H.; ISHIKAWA, H.; KOBAYASHI, T. Lipase Production in Two-Step Fed-Batch Culture of Organic Solvent-Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. **Journal of bioscience and Bioengineering**. v. 91, n. 3, p.245-250, 2001.

JAEGER, K.; EGGERT, T. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p.305–313, 2014.

JAEGER, K-E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M. T. Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase-A Critical Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 253-264, 2008.

KAUSHIK, R.; SARAN, S.; ISAR, J.; SAXENA, R. K. Optimization of Lipase Production from *Aspergillus terreus* by Response Surface Methodology and Its Potential for Synthesis of Partial Glycerides Under Solvent Free Conditions. **Indian Journal of Microbiologv**. v.50 (4), p. 456–462, 2011.

KENNEDY, J. F., MELO, E. H. M. Immobilized enzymes and cells. **Chemical Engineering Progress** 86 (7), 81–89, 1990.

KIM, M. L.; HAM, H. O.; OH, S.; PARK, H. G.; CHANG, H. N.; CHOI, S. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized silica nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 39, p. 62-68, 2006.

KOUZU, M.; KASUNO, T.; TAJIKA, M.; SUGIMOTO, Y.; YAMANAKA, S.; HIDAKA, J. Calcium oxide as a solid base catalyst for transesterification of soybean oil and its application to biodiesel production. **Fuel**. v.87, p. 2798-2806, 2008.

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. Enzymatic transesterification of *Jatropha* oil. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n.1, p. 1-7, 2009.

LI, Y. X.; DONG, B. X. Optimization of Lipase-Catalyzed Transesterification of Cotton Seed Oil for Biodiesel Production Using Response Surface Methodology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.59, p. 1-7, 2016.

LIMA, V. M. G.; KRIGER, N. K.; MITCHELL, D. A.; FONTANA, J. D.F. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**. V.18, p. 65-71, 2004.

LIN, E.-S.; KO, H.-C. Glucose stimulates production of the alkaline-thermostable lipase of the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p. 261-265, 2005.

LIU, C.-H.; CHEN, W.-M.; CHANG, J.-S. Methods for rapid screening and isolation of bacteria producing acidic lipase: feasibility studies and novel activity assay protocols. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 633-640, 2007.

LIU, C.-H.; HUANG, C.-C.; WANG, Y.-W.; CHANG, J.-S. Optimizing lipase production from isolated *Burkholderia* sp. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, p. 511-516, 2012a.

LIU, C.-H.; HUANG, C.-C.; WANG, Y.-W.; LEE, D.-J., Jo-Shu CHANG, J.-S. Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by *Burkholderia* lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. **Applied Energy**, v. 100, p. 41-46, 2012b.

LIU, C.-H.; LIN, Y.-H.; CHEN, C.-Y.; CHANG, J.-S. Characterization of *Burkholderia lipase* immobilized on celite carriers. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, p. 359-363, 2009.

LIU, C.-X.; ZHANG, S.-P.; SU, Z.-G.; WANG, P. LiCl-induced improvement of multilayer nanofibrous lipase for biodiesel synthesis. **Bioresource Technology**, v. 103, p. 266-272, 2012c.

MALA, J. G. S.; TAKEUCHI, S. Understanding Structural Features of Microbial Lipases-An Overview. **Analytical Chemistry Insights**, v. 3, p. 9-19, 2008.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Techno-economic study of different alternatives for biodiesel production. **Fuel Processing Technology**. v. 89, p. 740-748, 2011.

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

MENG, Y.; WANG, G.; YANG, N.; ZHOU, Z.; LI, Y.; LIANG, X.; CHEN, J.; LI, Y.; LI, J. Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 6-15, 2011.

MESSIAS, J. M. **Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em diferentes fontes de carbono**. 2008. 229 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; DEKKER, R. F. H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A. M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 426-431, 2009.

MORENO-PIRAJAN, J.C.; GIRALDO, L. Study of immobilized *Candida rugosa* lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, p. 55-62, 2011.

NELSON, J.M.; GRIFFIN, E.G. Adsorption of interphase. **Journal of the American Chemical Society**. Vol. 38, N° 5, p. 1109-1115, 1916.

NIE, K.; WANG, M.; ZHANG, X.; HU, W. J.; LIU, L.; WANG, F. Additives improve the enzymatic synthesis of biodiesel from waste oil in a solvent free system. **Fuel**. v. 146, p.13-19, 2015.

PALMA, M. B.; PINTO, A. L.; GOMBERT, A. K.; SEITZ, K. H.; KIVATINITZ, S.C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. **Appl Biochem Biotechnol** v.84–86, p.1137–114, 2000.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, vol. 29, n 1, p. 93-99, 2006.

PIZARRO, C., FERNANDEZ-TORROBA, M., BENITO, C., GONZALEZ-SAIZ, J. Optimization by experimental design of polyacrylamide gel composition as support for enzyme immobilization by entrapment. **Biotechnology and Bioengineering** 53 (2), 497–506, 1997.

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

REN, Y.; RIVERA, J. G.; HE, L.; KULKARNI, H.; LEE, D.; MESSERSMIT, P. B. Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. **BioMed Central Biotechnology**. p.1-8, 2011.

SANTORI, G.; NICOLA, G. D.; MOGLIE, M.; POLONARA, F. A review analyzing the industrial biodiesel production practice starting from vegetable oil refining. **Applied energy** 92, 109-132, 2012.

SANTOS, G. M.; BRITO, M. M.; SOUSA, P. V. L.; BARROS, N. V. A. Determinação do índice de acidez em óleos de soja comercializados em supermercados varejistas. **Revista Ciências e Saúde**. v. 2, n. 2, p.11-14, 2017.

SCHERER, R.; OLIVEIRA, J. V.; PERGHER, S.; OLIVEIRA, D. Screening of Supports for Immobilization of Commercial Porcine Pancreatic Lipase. **Materials Research**, v. 14, n. 4, p. 483-492, 2011.

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

SHAO, P.; MENG, X.; HE, J.; SUN, P. Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soapstock. **Food and Bioproducts Processing**, v. 86, p. 283-289, 2008.

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

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

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 486-520, 2012.

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

TING WJ, HUANG CM, GIRIDHAR N, WU WT. An enzymatic/acid-catalyzed hybrid process for biodiesel production from soybean oil. **J Chin Inst Chem Eng**. v. 39, p. 203-210, 2008.

WALT, D.R., AGAYN, V. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. **Trends in Analytical Chemistry** 13 (10), 425–430, 1994.

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

ZHANG, G.; MA, J.; WANG, J.; LI, Y.; ZHANG, G.; ZHANG, F.; FAN, X. Lipase Immobilized on Graphene Oxide As Reusable Biocatalyst. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v.53, p. 19878–19883, 2014.

ZHAO, K.; CAO, X.; DI, Q.; WANG, M.; CAO, C.; DENG, L.; LIU, J.; WANG, F.; TAN, T. Synthesis, characterization and optimization of a two-step immobilized lipase. **Renewable Energy**, v.103, p. 383-387, 2017.

ZHAO, X.; QIB, F.; YUANC, C. DUA, W.; LIUA, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 44, p. 182–197, 2015.

ZHOU, W. W.; QIN, D. H.; QIAN, J.Q. Optimisation of enzymatic pretreatment of soybean oil deodoriser distillate for concentration of tocopherols. **International Journal of Food Science & Technology**. v.44, p.1429–1437, 2009.