



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO**



**CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**QUÍMICA COM ATRIBUIÇÕES TECNOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA**

**SÍNTESE DE ÉSTERES EM REAÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO A PARTIR DO
REJEITO DE ÁCIDOS GRAXOS DA PRODUÇÃO DE ÓLEO DE PALMA
CATALISADO POR LIPASE IMOBILIZADA**

MARCUS VINCIUS DE MATTOS SILVA

RIO DE JANEIRO

JULHO/2013

MARCUS VINICIUS DE MATTOS SILVA

**SÍNTESE DE ÉSTERES EM REAÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO A PARTIR DO
REJEITO DE ÁCIDOS GRAXOS DA PRODUÇÃO DE ÓLEO DE PALMA
CATALISADO POR LIPASE IMOBILIZADA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para obtenção do
grau em Química com
Atribuições Tecnológicas pela
Universidade Federal do Rio de
Janeiro.

PROFESSOR RODRIGO OCTAVIO MENDONÇA ALVES DE SOUZA – ORIENTADOR
PROFESSORA MELISSA LIMOEIRO ESTRADA GUTARRA – COORIENTADOR

**RIO DE JANEIRO
JULHO/2013**

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer minha família por toda a dedicação, ajuda e apoio incondicionais.

Melissa Gutarra, por me apresentar o mundo da pesquisa permitindo que eu ajudasse em seu doutorado enquanto calouro e após 6 anos me orientar em meu trabalho de conclusão de curso.

A professora Denise Maria Guimarães Freire por sempre manter as portas do seu laboratório abertas para mim, me aceitando como aluno de Iniciação Científica por duas vezes.

Ao professor Rodrigo Octavio por acreditar no trabalho mantendo seu laboratório e equipamentos sempre a disposição.

A todos do LaBim, pelas horas de descontrações, principalmente a Jaqueline, Matheus, Elisa e Roberta por toda ajuda, não só no trabalho de conclusão de curso como também em minha vida como aluno de iniciação científica.

A todos do Grupo de biocatálise e síntese orgânica, principalmente Ivaldo Junior por toda ajuda e paciência nas muitas horas de reações ao lado do fluxo contínuo.

Aos amigos da época do Cefet-Química, que mesmo distante estão sempre juntos nos momentos difíceis, principalmente ao Tiago que após ser meu veterano, veio para a UFRJ como meu calouro fazendo com que nossa amizade crescesse ainda mais.

Aos amigos que fiz na faculdade por me ajudarem a estudar para as provas e por estarem juntos nas viagens e festas, mostrando que sem eles a faculdade não teria a menor graça.

Aos amigos Diogo, Reinaldo e Paulista por estarem sempre dispostos a saírem para rir e beber após um dia cansativo de trabalho.

E aos meus professores, sem todos eles nada disso seria possível.

RESUMO

PROJETO DE CURSO

TÍTULO: Síntese de ésteres em reações de fluxo contínuo a partir do rejeito de ácidos graxos da produção de óleo de palma catalisado por lipase imobilizada

ALUNO: Marcus Vinicius de Mattos Silva

ORIENTADORES: Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza – Instituto de Química

Melissa Limoeiro Estrada Gutarra – Escola de Química

RESUMO – Devido a diversidade de reações que as lipases são capazes de catalisar e às suas características, estas enzimas estão entre as mais utilizadas como biocatalisadores industriais. Para uma melhor aplicação industrial, a imobilização das enzimas é comumente realizada, pois facilita a separação e reutilização das mesmas. Neste contexto, esse trabalho teve como objetivo a produção de ésteres a partir do rejeito de ácidos graxos da extração do óleo de palma empregando a lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em reação de fluxo contínuo. Essa enzima foi expressa em *Pichia pastoris* e imobilizada em octadecil-sepabeads®. Para otimização das condições reacionais foi utilizado um planejamento fatorial 2^4 e posteriormente um fatorial 3^2 . Verificando assim uma conversão superior a 99% com a temperatura de 60°C, vazão de 0,1mL/min, razão soquetal/ácido graxos 1:1 e concentração inicial de substrato de 100 mM e de uma produtividade superior a 52 mg éster/min/g de suporte, com temperatura de 60°C, vazão de 1,0 mL/min, razão álcool/ácido 1:1 e concentração inicial de substrato de 200 mM.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Lipase	1
1.2. Expressão da lipase B de <i>Candida antarctica</i> (Cal-B) em <i>Pichia pastoris</i>	4
1.3. Vantagens da imobilização.....	6
1.4. Fluxo contínuo	7
1.5. Reação de esterificação do soquetal com ácidos graxos	8
1.6. Aplicações	10
2. Objetivo.....	11
3. Materiais e Métodos	11
3.1. Cepa recombinante de <i>Pichia pastoris</i>	11
3.2. Preparo do pré-inóculo	11
3.3. Produção em bioreatores de Lip B de <i>Candida antarctica</i> expressa em <i>Pichia pastoris</i>	12
3.4. Imobilização	12
3.5. Reação	12
3.5.1. Planejamento experimental	14
3.6. Métodos de análise	15
3.6.1. Atividade lipásica	15
3.6.2. Método de quantificação de proteína por Bradford.....	16
3.6.3. Método de quantificação de ácidos graxos livres Lowry-Tinsley (modificado)	17
4. Resultado e Discussão.....	18
5. Conclusão	30
6. Bibliografia	31

1. Introdução

1.1. Lipase

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são definidas como carboxilesterases que possuem como função catalítica natural a hidrólise de triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeias superiores a 10 átomos de carbono, gerando ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis e glicerol (JAEGER, DIJKSTRA & REETZ, 1999).

Em ambientes com pouca disponibilidade de água, a maioria das lipases pode exercer sua atividade reversa, realizando também reações de esterificação e transesterificação. É possível que elas também possam realizar a catalise de reações como acidólise, aminólise, alcoólise e interesterificação (Figura 1). Devido a essa diversidade de reações que são capazes de catalisar e às suas características de régio e enântiosseletividade, as lipases vêm sendo amplamente utilizada em diversos campos, tais como a indústria de detergentes, alimentícia, farmacêutica, de química fina, de couros, de polpa e papel e no tratamento de resíduos industriais, entre outros (SHARMA, CHISTI, & BANERJEE., 2001).

Hidrólise



Síntese de éster



Acidólise



Interesterificação



Alcoólise



Aminólise

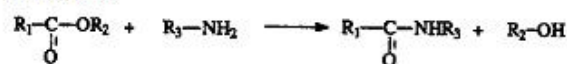


Figura 1.1: Principais reações catalisadas por lipases (GUTARRA, 2007).

As lipases utilizadas para cada aplicação são selecionadas de acordo com suas propriedades catalíticas, como especificidade por substrato, enântiosseletividade, pH e temperatura de atuação, assim como estabilidade em solventes orgânicos e a temperaturas elevadas. Embora haja muitas lipases descritas na literatura, a busca por novas lipases com elevada estabilidade e especificidade por diferentes substratos ainda é um importante campo de pesquisa (GUTARRA, 2007).

Apesar de terem sequências de aminoácido diferentes, as lipases apresentam uma estrutura terciária comum, o dobramento de α/β hidrolase (Figura 2). Esta estrutura apresenta um núcleo central formado por uma folha β central, consistindo de oito diferentes fitas β ($\beta 1$ - $\beta 8$), conectadas com seis α hélices (A-F) (SCHARG& CYGLER, 1997). As lipases normalmente apresentam massa molar entre 19 e 60 kDa.

Semelhante as serina-proteases uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos serina, histidina e aspartato (ou glutamato) compõem o sítio catalítico das lipases (Figura 2). Este fato leva a acreditar que o mecanismo catalítico das lipases é semelhantes ao das serina-proteases (JAEGER et al., 1994; JAEGER & REETZ, 1998).

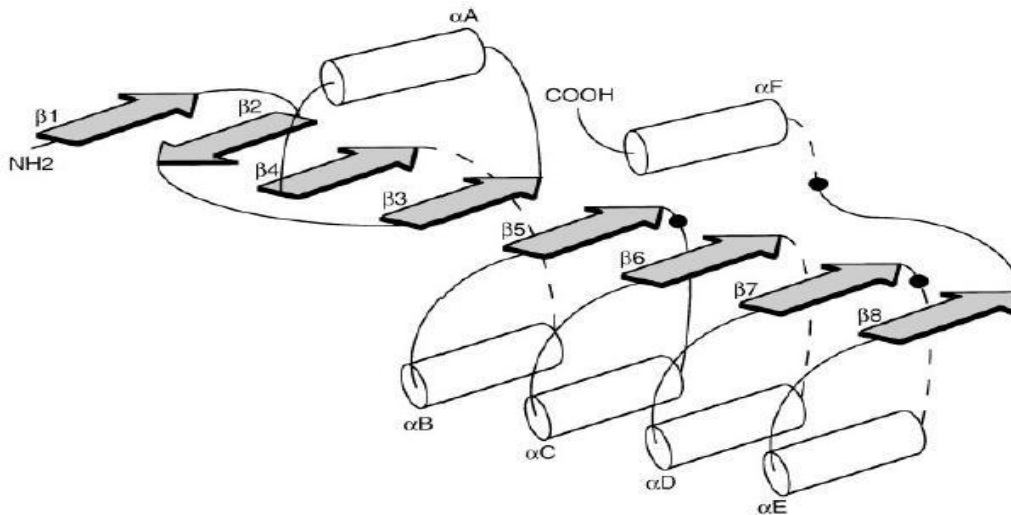


Figura 1.2 – Estrutura α/β das hidrolases. α -Hélices são mostradas como os cilindros e estruturas β como as setas escuras. Os círculos pretos representam os resíduos de aminoácidos da tríade catalítica. (JAEGER, et al. 1999)

A estrutura das lipases são bem características, uma vez que a maioria delas possuem uma espécie de “tampa” que recobre o seu sítio catalítico. Esta “tampa” é uma estrutura anfipática móvel, chamada região de tampa hidrofóbica ou lid, que está relacionada com a seletividade das lipases (CHERUKUVADA et al., 2005). O mecanismo de abertura da “tampa” para exposição do sítio catalítico da enzima ainda não foi bem elucidado, porém é reconhecido na literatura que a aproximação do substrato promoveria a abertura da “tampa” alterando assim a conformação da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface. Esse efeito é conhecido como ativação interfacial, e por haver uma mudança na estrutura da enzima pode causar alterações no comportamento da mesma, alterando sua especificidade e estabilidade. (JAEGER & REETZ, 1998; GUTARRA, 2007 e SECUNDO et al., 2007). O elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos, e sua região e enantiosseletividade (FERNANDES et al., 2004, ROVEDA et al. 2010). Essas vantagens têm proporcionado um aumento considerável em tecnologias para a produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de alternativas consistentes para utilização industrial (CASTRO et al., 2004, ROVEDA et al. 2010).

Cada vez mais as lipases vêm sendo uma alternativa na transformação seletiva de moléculas complexas. Elas possuem muitas características interessantes para seu uso como catalisadores, tais como maior especificidade em relação a catalisadores químicos, diminuição do número de etapas de reação, menor consumo de energia e diminuição de problemas de separação de subprodutos (Pandey et al., 1999). Industrialmente elas são amplamente utilizadas para produção de detergentes, onde sua aplicação está basicamente relacionada a reações de hidrólise, mas também na indústria alimentícia, farmacêutica, de química fina, de cosméticos, de óleos e gorduras, de couros, de polpa e papel, no tratamento de efluentes industriais, e na produção de biodiesel, com exploração também das reações de síntese e transesterificação e das características de enâncio- e região-seletividade destas enzimas (Sharma et al., 2001). A tabela 1 mostra algumas aplicações.

Tabela 1.1: Exemplos de aplicações industriais de lipases (PARQUES & MACEDO, 2006)

Área Industrial	Aplicação	Produto
Alimentação	Hidrólise de gordura de leite	Aromas para produtos matinais
	Síntese de ésteres	Aromas para alimentos e bebidas
Química	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, diglicerídios, monoglicerídios
	Remoção de gorduras/manchas	Detergentes para lavanderia ou uso doméstico
	Síntese de ésteres	Éster, emulsificantes
Alimentação/química /farmacêutica	Transesterificação de óleos naturais	Óleos e gordura (análogo de manteiga de cacau)
Cosméticos	Síntese de ésteres	Fragrância para perfumes
Médica	Ensaio de triglicerídeos no sangue	Kits de diagnóstico

1.2. Expressão da lipase B de *Candida antarctica* (Cal-B) em *Pichia pastoris*

A levedura *Candida antarctica* produz duas diferentes lipases, lipases A e B, sendo a lipase B (CAL-B) uma hidrolase amplamente utilizada no campo da biocatálise e biossíntese (de MARÍA et al. 2005, GOTOR-FERNÁNDEZ et al. 2006). A CAL-B é constituída por 317 aminoácidos e tem uma massa molecular de 33 kDa (Figura 1). Esta lipase foi primeiramente obtida a partir da levedura *Candida antarctica*, porém industrialmente é produzida em sistema heterólogo. A estrutura de raios-X de CAL-B foi elucidada em 1994 (UPPEBERGET et al. 1994), Sendo a tríade catalítica Asp187-Ser105-His224 (GOTOR-FERNÁNDEZ et al. 2006).

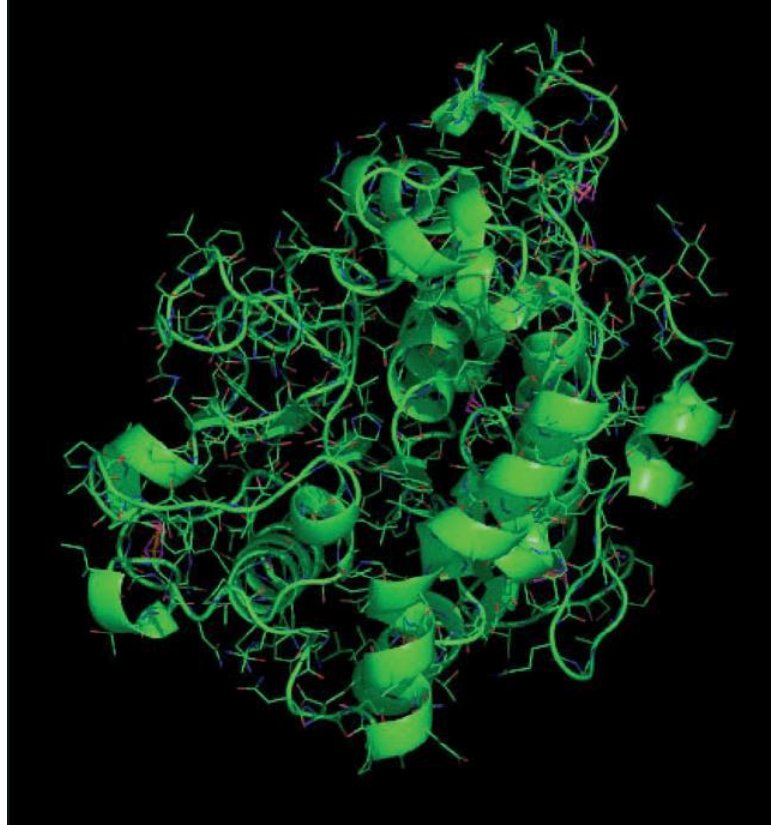


Figura 1.3: Lipase B de *C. Antarctica* (GOTOR-FERNÁNDEZ et al. 2006)

A levedura *Pichia pastoris* vem despontando como um dos hospedeiros mais utilizados em biologia molecular, sendo utilizada em aproximadamente 17% das expressões heterólogas (SORENSEN, 2010). Essa levedura tem como característica, secretar proteínas com relativa facilidade, realizar modificações pós-traducionais e expressar proteínas de forma bem regulada (CERENGHINO e CREGG, 2000). A glicosilação pós-traducional tem se mostrado uma vantagem na expressão da lipase de *C. antarctica*, pois aumenta a enantiosseletividade, atividade de transesterificação e termoestabilidade quando imobilizada em octil-agarose comparada com a Cal B não glicosilada (GUTARRA et al. 2011 (a), GUTARRA et al. 2011(b)). Devido à evolução de novas ferramentas de biologia molecular, é possível a obtenção de novos biocatalisadores projetados para ter um ótimo desempenho em uma transformação alvo específica levando a catalisadores específicos (Kragl et al., 1996 e NIKOLOVA e WARD, 1993).

1.3. Vantagens da imobilização

Durante séculos a humanidade utilizou processos biocatalíticos na produção de vinho, cerveja e pão. Apesar do conhecimento tecnológico disponível há milhares de anos, somente nos últimos 200 anos os cientistas desenvolveram os conceitos e ferramentas que permitem que os químicos e bioquímicos possam usar o poder natural de biocatalisadores em laboratório (HALLING e KVITTINGER 1999). A tecnologia enzimática vem se mostrando cada vez mais promissora dentro das novas tecnologias de síntese para compostos de alto valor agregado. O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando, especialmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como biocatalisadores em processos industriais.

A imobilização é uma opção, onde as enzimas suportadas podem fornecer um sistema facilmente separável e reutilizável (em conjunto com a recuperação de produtos melhorados), que é frequentemente também mais resistente a desativação, em comparação com a enzima livre (TRAN e BALKUS, 2011 e YANG et al., 2009). A imobilização tem várias implicações na geração de biocatalisadores mais estáveis, compatíveis com as tecnologias de processamento contínuo. Várias formas foram relatadas para imobilizar enzimas em diversos suportes. Estas vão desde os métodos físicos mais extensos e amplamente utilizados (adsorção, aprisionamento e/ou imobilização eletrostática) para protocolos químicos (a imobilização covalente) (ITABAIANA-Jr et al., 2013(a)). A adsorção interfacial das lipases sobre suportes hidrofóbicos tem sido um método simples para imobilizar as lipases, de forma que a mesma permaneça ativa em diferentes meios. A estratégia de imobilização é tirar vantagem do mecanismo complexo das lipases (abertura e fechamento da tampa) como uma ferramenta que permite a imobilização das mesmas através de uma estratégia de afinidade com o suporte (BASTIDA et al. 1998). Usando um suporte hidrofóbico que de alguma maneira se assemelha à superfície das gotas dos óleos (substrato natural das lipases), e uma baixa força iônica, promove a adsorção seletiva das lipases. A adsorção envolve as áreas hidrofóbicas próximas do centro ativo e a face interna da tampa (outras proteínas solúveis em água não são adsorvidas sobre o suporte sob estas condições moderadas) (BASTIDA et al. 1998 e MILED et. al. 2001). Estas lipases adsorvidas ficam na forma aberta, com o centro ativo acessível para os substratos, de fato, a enzimas imobilizadas geralmente exibem uma atividade maior (pelo

"mecanismo de ativação interfacial"). Isto é, temos uma lipase imobilizada em que a forma aberta foi "fixada", e não depende da presença de interfaces hidrofóbicas externas (PALOMO et. al. 2002).

1.4. Fluxo contínuo

Fluxo contínuo, é o processo onde os substratos passam de forma contínua por uma matriz sólida (catalisador) onde ocorre a reação e após a mesma se obtém os produtos. A utilização do processo de fluxo contínuo tem cada vez maior importância na síntese orgânica como uma ferramenta importante para o desenvolvimento de metodologias. Durante os últimos anos, um aumento do número de obras na literatura sobre reações biocatalisadas em fluxo contínuo mostra que esta tecnologia pode melhorar as reações enzimáticas (RAO, 2009). Essas conquistas são diretamente relacionadas à grande quantidade de equipamentos lançados no mercado e também a necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias de biocatálise para fins industriais. A utilização de fluxo contínuo em reações orgânicas biocatalisadas decorre essencialmente do sucesso em conseguir a imobilização do biocatalisador (células, enzimas ou conjunto). Quando se trabalha em condições de fluxo contínuo, a lixiviação da proteína é sempre uma preocupação e deve ser levada em consideração quando se escolhe o protocolo de imobilização e/ou método durante o processo de desenvolvimento (ROSEVEAR, 1984 – BORNSCHEUER, 2003)

Em muitos casos, os reatores de leito fixo são uma escolha para o processo de biocatálise em fluxo contínuo. Este tipo de reator é constituído por uma coluna empacotada com o catalisador heterogêneo desejado onde o meio de reação é bombeado através da coluna com uma vazão específica, que vai determinar o tempo de residência (tempo de reação), de acordo com o volume da coluna. A melhor escolha é a de converter os reagentes em produtos em apenas um ciclo, evitando trabalhar em condições de reciclagem, onde os reagentes passam através do leito empacotado por várias vezes até que a conversão total é obtida (ITABAIANA-Jr et al.,2013(b)). Nas indústrias é mais utilizado o sistema de fluxo contínuo do que reatores de batelada, isso ocorre, pois nesse processo, há vantagens como alta produtividade, maior controle do processo, melhoria da qualidade e elevada pureza (JUNIOR et al, 2011).

Porém esse processo também tem limitações, quando utilizamos substratos viscosos, que o produto seja insolúvel no meio de reação ou até mesmo quando há a formação de um produto volátil que possa aumentar muito a pressão do sistema.

1.5. Reação de esterificação do soquetal com ácidos graxos

A reação estudada, teve como substrato o (R,S)-1,2 isopropilideno glicerol (soquetal) e resíduo de ácidos graxos do refino de óleo de palma (mistura de ácidos contendo 44% palmítico, 42% oléico e 14% esteárico)(Figura 1.4).

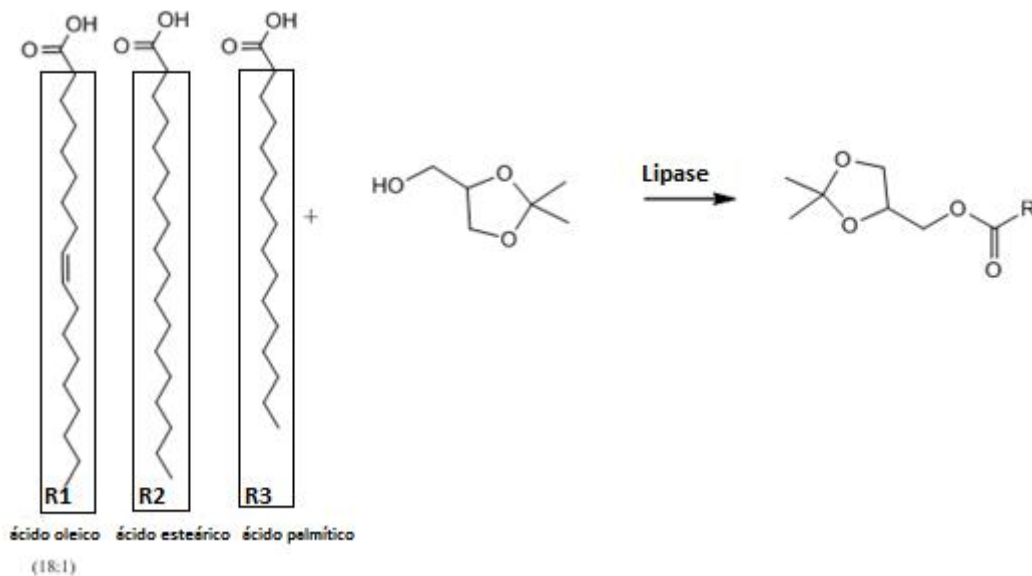


Figura 1.4: Reação do Soquetal com o resíduo de ácidos graxos do refino de óleo de palma

O soquetal pode ser obtido através da reação de cetalização da glicerina com acetona (Figura 1.5), sendo o produto de síntese apenas uma mistura dos enantiômeros do soquetal (MOTA et.al. 2010). A maior vantagem na utilização do soquetal é a proteção de duas das hidroxilas do glicerol na forma de um anel de dioxolana. Uma vez protegido, a esterificação passa a ocorrer em apenas um ponto, formando apenas, por exemplo, monoesterarina evitando a formação de di- e triestearinas que podem ser indesejado em alguns casos.

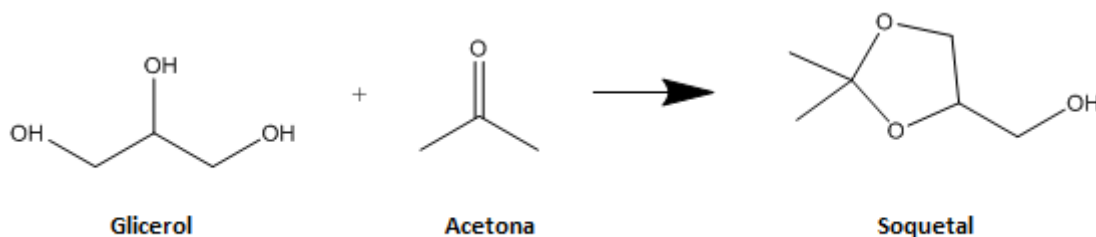


Figura 1.5: Reação de síntese do (R,S)-1,2 isopropilideno glicerol (Soquetal)

Os surfactantes vêm sendo usados na indústria de alimentos durante muitos séculos. Eles ocorrem naturalmente, como a lecitina da gema do ovo e de várias proteínas do leite e são utilizados para a preparação de muitos produtos alimentares, tais como a maionese, cremes para saladas, molhos, sobremesas, entre outros (KRALOVA & SJOBLOM 2004). Acilgliceróis parciais, como o mono- e diacilgliceróis (MAG e DAG) são surfactantes não iônicos bem conhecidos. Estes tipos de produtos são reconhecidos como seguro, e pode ser utilizado em muitos produtos alimentares, cosméticos e em fármacos, sem quaisquer limitações. Enormes esforços têm sido feitos por muitos grupos para o tratamento de gorduras com ácidos graxos para sintetizar o monoglicerol. Os mono e diacilgliceróis possuem características de grande interesse industrial, exatamente por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não-tóxicos (KRALOVA & SJOBLOM 2004). Eles são compostos por uma parte hidrofóbica que é constituída por ácidos graxos (isto é, ácido láurico, ácido mirístico, palmítico, esteárico e oleico), ao passo que a parte hidrófila pode ser formada pelo glicerol.

Nosso trabalho teve como proposta a síntese de um intermediário na síntese do monoacilglicerol. A hidrólise foi feita com ácido acético/água 70% por 6 horas a 45°C, obtendo assim o monoacilglicerol correspondente (Figura 1.6).

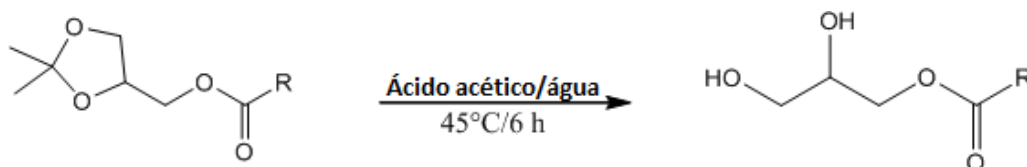


Figura 1.6- Reação de hidrólise do éster formado com o soquetal

A esterificação catalisada por lipase vem sendo cada vez mais investigada como um potencial substituto para a glicerólise química tradicional, uma vez que lipases enquanto biocatalisadores exigem condições de reação mais brandas (60°C) enquanto a

glicerólise de triacilgliceróis usam temperaturas de 220-250°C e catalisadores alcalinos como NaOH, KOH e Ca(OH)₂. Sendo assim, as utilizações de enzimas minimizam os custos energéticos, permitem um melhor controle de reação e fornecer produtos de alta qualidade (CAMACHO et al. 2006 e dos SANTOS & REZENDE 2012).

1.6. Aplicações

Monoacilgliceróis são monoésteres formados por ácido graxo e glicerol. Estes compostos são amplamente utilizados como surfactantes não-iônicos e emulsificantes nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e de cosméticos, representando cerca de 70% de todos os emulsificantes sintéticos utilizados (dos SANTOS & REZENDE 2012). Na indústria farmacêutica, os monoacilgliceróis são utilizados como emolientes para cremes ou emplastos, liberando lentamente o medicamento. Na indústria de alimentos são utilizados como emulsificantes em produtos de panificação, margarinas, derivados do leite, doces e molhos, chocolates, bolos (dos SANTOS & REZENDE 2012 e JUNIOR et al. 2012). E na indústria de cosméticos, são usados na melhora da consistência de cremes e loções (dos SANTOS & REZENDE 2012)

Entre os monoacilgliceróis, a monostearina se destaca devido a sua ampla aplicação geralmente como aditivo em doces, sorvetes, bolos e pão, tendo também funções de emulsificante, dispersante, antiespumante, melhorando a preservação, proteção e controle da aglutinação de lipídios em alimento. É também utilizado em chocolates, doces e sorvetes para evitar a cristalização do gelo e prevenir separações entre óleo e água (JUNIOR et al. 2012). Na indústria de cosmético é utilizado como emulsificante.

A tabela 1.2 mostra os padrões aceitáveis pela união europeia para a utilização de mono e diacilgliceróis em alimentos.

Tabela 1: Regulamento (UE) N.o 231/2012 da comissão de 9/3/2012

	Teor
Mono e diacilglicerol	> 70%
Glicerol	< 7%
Diacilglicerol	< 4%
Teor de acidez	< 6
Poligliceróis	< 1%

2. Objetivo

Neste trabalho, foi otimizado um processo de fluxo contínuo com um reator biocatalítico de leito fixo para a reação de esterificação entre o ácido (R,S)-1,2-isopropilideno glicerol (soquetal) e a mistura de ácidos graxos proveniente do rejeito da produção de óleo de palma (ácidos palmítico, oléico e esteárico).

3. Materiais e Métodos

3.1. Cepa recombinante de *Pichia pastoris*

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a levedura *P. pastoris* da linhagem selvagem X-33 transformadas anteriormente pela inserção de um vetor de expressão constitutiva pPGK Δ 3_PRO_LIPB, construído a partir de um gene sintético de lipase B de *Candida antarctica* (Lip B) (de acordo com o relatório descritivo da patente PI0905122-8), para expressão de lipase B de *C. antarctica* recombinante (Lip B).

As células de *P. pastoris* transformadas foram cultivadas em meio YPD 2% (extrato de levedura 1%, peptona 2% e glicose 2%, concentrações em p/v, pH 6) e armazenadas em glicerol 25% e mantidas a -80°C.

3.2. Preparo do pré-inóculo

As células mantidas congeladas foram estriadas em meio de cultivo sólido YPD 2% (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% e ágar 2%, concentrações em p/v, pH 6) em placas e incubadas a 30°C por 48 horas até surgimento de colônias. No preparo do pré-inóculo, 1 colônia crescida em placa foi inoculada em frasco tipo Erlenmeyer haletado (1000mL) contendo 200mL de meio mínimo (BSM -10% de glicerol). O cultivo foi realizado a 30°C por 30 horas sob agitação orbital de 250 rpm.

Após o período de pré-incubação, medidas de absorvância foram efetuadas e os meios foram utilizados como inóculos em diferentes cultivos e na concentração celular desejada.

3.3. Produção em bioreatores de Lip B de *Candida antarctica* expressa em *Pichia pastoris*

Para o escalonamento do processo de crescimento da levedura *P. pastoris* e produção de Lip B recombinante, os ensaios foram realizados em fermentador de bancada com volume total de 7,5L da marca New Brunswick Scientific com glicerol 100 g/L como fonte de carbono.

Inicialmente o fermentador foi mantido a 30 °C com velocidade de agitação igual a 250 rpm. Já a oxigenação (feita com ar) foi controlada a fim de tentar manter a saturação de oxigênio dissolvido em 30%. Esse controle foi feito através de uma cascata alterando a agitação de 250 a 500 rpm e a vazão de gás de 0 a 20 lpm. O pH foi controlado com NaOH. O pré-inóculo foi produzido como citado anteriormente e utilizado para inocular o fermentador na concentração desejada, normalmente entre 0,2 g/L e 0,4 g/L.

3.4. Imobilização

A imobilização foi feita baseando-se na capacidade do suporte de interagir com as enzimas através de adsorção hidrofóbicas. Para isso foi feita uma solução de 20mg de proteína liofilizada por grama de suporte da lipase B de *C. antarctica* produzida por *P. pastoris* em tampão fosfato de sódio 20 mM e pH 7,0 e retirada uma alíquota inicial. Após a retirada da alíquota, misturou-se a solução com o suporte octadecil-Sepabeads® (EC-OD) e o conjunto foi posto para agitar em um agitador do tipo Roller. Após 2 horas de agitação, foi retirada uma segunda alíquota. Com 24 horas a imobilização foi paralisada, sendo feita a filtração da mistura. Do volume filtrado foi retirada uma última alíquota e o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada. As alíquotas foram utilizadas para a verificação da atividade lipásica através do método espectrofotométrico e a quantificação de proteína através do método de Bradford.

3.5. Reação

A solução de reação foi composta pelo (R,S)-1,2 isopropilideno glicerol (soquetal) e resíduo de ácidos graxos do refino de óleo de palma (mistura de ácidos 44% palmítico, 42% oléico e 14% esteárico) em n-heptano. A reação foi feita num aparelho de fluxo contínuo com a enzima imobilizada na resina EC-OD. Sendo recolhidas

alíquotas na saída da coluna. Para os testes, foram feitas variações na vazão (0,1 – 1,0), na concentração da mistura de ácidos (50 – 200 mM), na razão álcool/ácido (1:1 – 2:1 – 3:1) e na temperatura de reação (60°C - 70°C). Com essas vazões, foi possível verificar o tempo de retenção de 2,38 até 23,8 minutos. Para os cálculos de concentração da mistura de ácido, foi utilizada a massa molar do ácido palmítico, uma vez que o mesmo se encontra em maior quantidade no rejeito. Inicialmente, foi pesado em uma coluna de vidro com dimensões (0,3421cm² de base x 7cm de altura) aproximadamente 1 grama do suporte com as enzimas de interesse. Essa coluna foi alimentada de forma ascendente através de uma bomba peristáltica, com vazão e temperatura controlada (figura 3.1).



Figura 3.1: Equipamento para reação em fluxo contínuo (Asia – Syrris); (A) bomba peristáltica de vazão, (B) aquecedor de temperatura controlada e (C) coluna onde colocamos as enzimas imobilizadas.

3.5.1. Planejamento experimental

Para verificação das melhores condições de reação, foi feito um planejamento experimental do tipo 2^4 com triplicata do ponto central, tal como mostra a tabela 3.1.

Tabela 3.1: Valores reais e codificados das variáveis testadas

	Temperatura(°C)	Concentração(mM)	Razão	Vazão(mL/min)
1	+(70)	+(100)	+(3:1)	+(1,00)
2	-(60)	+(100)	+(3:1)	+(1,00)
3	+(70)	-(50)	+(3:1)	+(1,00)
4	-(60)	-(50)	+(3:1)	+(1,00)
5	+(70)	+(100)	-(1:1)	+(1,00)
6	-(60)	+(100)	-(1:1)	+(1,00)
7	+(70)	-(50)	-(1:1)	+(1,00)
8	-(60)	-(50)	-(1:1)	+(1,00)
9	+(70)	+(100)	+(3:1)	-(0,10)
10	-(60)	+(100)	+(3:1)	-(0,10)
11	+(70)	-(50)	+(3:1)	-(0,10)
12	-(60)	-(50)	+(3:1)	-(0,10)
13	+(70)	+(100)	-(1:1)	-(0,10)
14	-(60)	+(100)	-(1:1)	-(0,10)
15	+(70)	-(50)	-(1:1)	-(0,10)
16	-(60)	-(50)	-(1:1)	-(0,10)
P.C	0(65)	0(75)	0(2:1)	0(0,55)
P.C	0(65)	0(75)	0(2:1)	0(0,55)
P.C	0(65)	0(75)	0(2:1)	0(0,55)

Posteriormente foi feito um segundo planejamento do tipo 3^2 com triplicata do ponto central, levando em conta somente as variáveis concentração e vazão, como mostrada na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Valores reais e codificados das variáveis testadas

	Concentração(mM)	Vazão(mL/min)
1	+(200)	+(1,00)
2	+(200)	0(0,55)
3	+(200)	-(0,10)
4	0(150)	+(1,00)
5	0(150)	0(0,55)
6	0(150)	-(0,10)
7	-(100)	+(1,00)
8	-(100)	0(0,55)
9	-(100)	-(0,10)
P.C	0(150)	0(0,55)
P.C	0(150)	0(0,55)

3.6. Métodos de análise

3.6.1. Atividade lipásica

A atividade lipásica foi medida pelo método espectrofotométrico, que se baseia na formação do produto (p-nitrofenol), que é cromóforo, a partir da reação de hidrólise do p-nitrofenil butirato catalisada pela lipases. As amostras analisadas foram retiradas antes da imobilização, após 2 horas de imobilização e após 24 horas de imobilização. A solução de reação foi preparada utilizando-se 0,25 mL de p-nitrofenil butirato 2,5 mM em 2,2 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0. A reação foi iniciada com a adição de 50 µL das amostras. A formação do p-nitrofenol foi acompanhada em espectrofotômetro a 412 nm. Uma unidade de atividade lipásica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1,0 µmol de p-nitrofenil butirato por minuto nas condições de ensaio. A atividade lipásica foi expressa em U/mL. O cálculo da atividade enzimática foi feito pela equação 1.

$$A_L = \frac{(\alpha \cdot F \cdot V_f)}{V_a} \cdot F_d \quad (1)$$

Onde:

AL = atividade (U/mL)

α = coeficiente angular da reta (Abs x tempo)

F = fator (Abs x concentração de produto)

Vf = volume final (mL)

Va = volume de amostra (mL)

Fd = fator de diluição

3.6.2. Método de quantificação de proteína por Bradford

A concentração de proteína solúvel foi determinada utilizando o método de Bradford e a proteína utilizada como padrão foi a albumina de soro bovino (BRADFORD, 1976). A curva de calibração foi feita com padrões de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6. A esse modelo, foi ajustada uma reta, como mostra o figura 3.2.

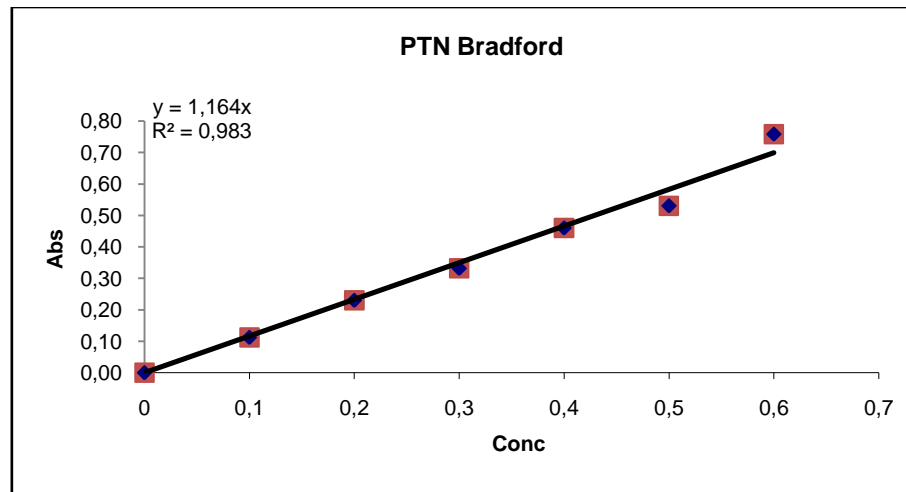


Figura 3.2: curva padrão da dosagem de proteína

3.6.3. Método de quantificação de ácidos graxos livres Lowry-Tinsley (modificado)

A taxa de esterificação foi medida usando uma modificação do ensaio descrito na literatura por Lowry e Tinsley (1976). O consumo dos ácidos graxos foi monitorizado com a retirada de uma alíquota de 0,30 mL da solução de reação. Essa alíquota foi transferida para um eppendorf contendo 0,6 mL de n-heptano P.A (Vetec) e 1 mL de acetato cúprico-piridina 5% (p/v, pH 6,0). Essa nova solução foi vigorosamente agitada durante 30 segundos em vórtex. Posteriormente 0,30 mL fase orgânica superior foi transferida para uma cubeta contendo 2,7 mL de n-heptano e agitada. Essa medida é feita através do ácido que não reagiu, uma vez que os ácidos graxos livres se ligam ao cobre, formando um composto de coloração esverdeada (figura 3.2). A medida foi realizada por um espectrofotômetro a 715nm. Cada reação foi analisada em triplicata, e a conversão foi calculada pela diferença da absorção da solução antes e após a reação (figura 3.3) e calculada segundo a equação 2:

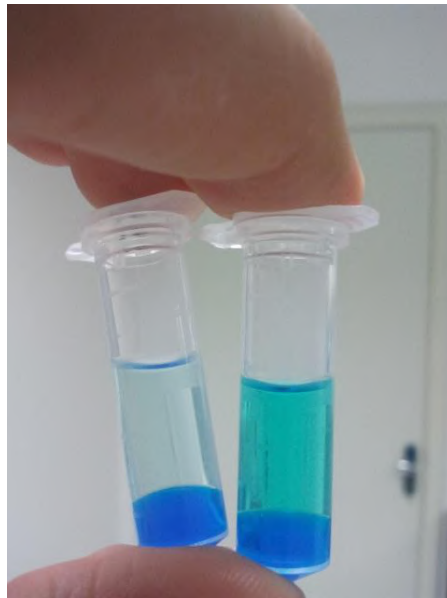


Figura 3.3: Lowry-Tinsley antes (direita) e depois (esquerda) da reação.

$$C(\%) = 100 - \left(\frac{Ad \cdot 100}{Aa} \right) \quad (2)$$

Onde:

$C(\%)$ = conversão (em porcentagem)

A_a = Absorbância da amostra antes da reação

A_d = Absorbância da amostra depois da reação

O cálculo final de conversão foi dado pela equação 3.

$$\text{Produtividade (mg éster/min/g de suporte)} = \frac{C \times [c] \times m M_{\text{éster}} \times V_c}{10^5 \times T_r \times M_s} \quad (3)$$

Onde:

C = Conversão

$[c]$ = Concentração inicial de ácidos graxos (mM)

$m M_{\text{éster}}$ = Massa molar do éster formado (370,58g/mol)

V_c = Volume da coluna

T_r = Tempo de Reação

M_s = Massa de suporte na coluna

4. Resultado e Discussão

Inicialmente foram feitos testes para verificar a conversão obtida com algumas enzimas imobilizadas. Sendo assim, foi feito em fluxo contínuo uma reação de esterificação de ácidos proveniente do rejeito da produção do óleo de palma com o soquetal, passando por uma coluna empacotada com a enzima Lip B em Octadecil Sepabeads (EC-OD). O mesmo procedimento foi realizado para a enzima Cal B (Novozymes) imobilizada em EC-OD e com a enzima comercial imobilizada comercialmente Novozymes® 435. Esses valores foram comparados como mostrado na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Comparação da conversão entre as enzimas Cal B, Lip B e Novozymes® 435

Condições (60°C;0,1mL/min)	Conversão	mg ptn/g de suporte	[substrato]	Mmol prod	Mmol prod/Ptn
Cal B/Octadecil	77,04%	20	100	77,04	3,85
lip B/octadecil	61,21%	10	100	61,21	6,12
Novozymes 435	90,66%	35	150	135,99	3,89

Como podemos verificar na tabela 4.1, a Lip B demonstrou uma conversão de 61,21%, sendo as lipases comerciais Cal B com 77,04% e a Novozymes 435 com 90,66%. No entanto os biocatalisadores foram preparados com concentrações distintas de proteína, tendo a Lip B metade da quantidade de proteína por grama de suporte que a Cal B e três vezes menos que a Novozymes 435. Sendo assim, ao calcular a produtividade por miligrama de proteína verificamos que a Lip B se mostrou interessante para maiores estudos, sendo feita uma imobilização com maiores quantidade de proteína por grama de suporte.

Com base nesses resultados, foi possível verificar que a enzima Lip B possui um potencial biotecnológico extremamente interessante, realizando assim uma maior pesquisa de otimização da atividade da mesma. Para isso foi feito um planejamento experimental fatorial do tipo 2⁴ com repetição do ponto central, para investigar os fatores que mais influenciavam na produtividade e na conversão dessa enzima com a reação estudada, tendo como variáveis a temperatura (60° - 70°), concentração da mistura de ácidos (50 – 100 mM), razão Soquetal/ mistura de ácidos (1:1, 2:1, 3:1) e vazão (0,1 – 1,0 mL/min). O resultado é mostrado na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Resultado da otimização do planejamento 2⁴ para conversão e produtividade da Lip B imobilizada em EC-OD

Conversão (%)	mg éster/min/g de suporte
----------------------	----------------------------------

1	88,33	33,11
2	94,87	35,56
3	92,97	17,42
4	95,83	17,96
5	86,20	32,31
6	96,31	36,10
7	>99	18,58
8	>99	18,58
9	95,13	3,57
10	95,77	3,59
11	88,02	1,65
12	91,15	1,71
13	91,39	3,43
14	>99	3,74
15	98,86	1,85
16	>99	1,87
P.C	98,29	13,81
P.C	95,05	13,36
P.C	96,76	13,60

Com a realização do planejamento, verificaram-se os fatores que influenciavam significativamente na conversão através do gráfico de Pareto (figura 4.1). Onde as variáveis temperatura (1), concentração inicial da mistura de ácidos no rejeito (2), razão etanol/ácidos (3) e vazão (4) são mostrada quanto a importância e a contribuição para a atividade, tanto sozinhas quanto a interações entre elas.

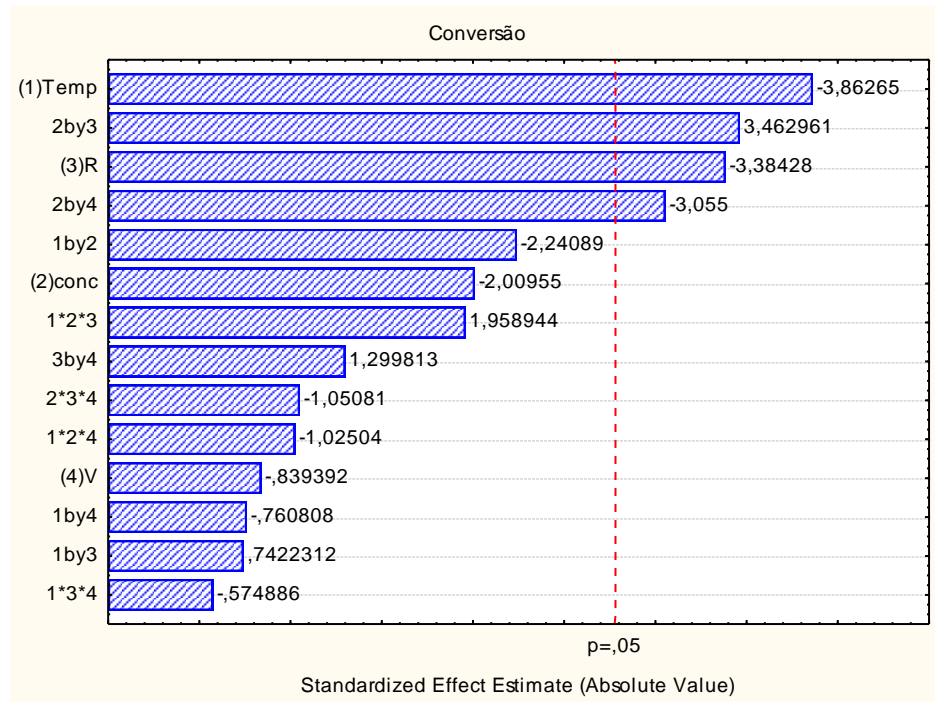


Figura 4.1 – Gráfico de Pareto da otimização para conversão no planejamento fatorial 2^4

Como foi possível verificar pelo figura 4.2 os parâmetros temperatura, concentração inicial de ácido graxos e razão molar álcool/ácido graxos tiveram os valores descritivos do parâmetro (p) com importância elevada, sendo também considerados para a obtenção da equação 4 os fatores combinados entre eles. Foram incluídos na equação os parâmetros significativos e marginalmente significativos. A conversão obteve um coeficiente de determinação $R^2 = 0,8822$

Equação 4: Cálculo de conversão do planejamento fatorial 2^4

$$\text{Conversão} = 98,9 - 2,0T - 1,1C - 1,8R - 1,2TC + 1,8CR - 1,6CV + 0,7RV + 1,0TCR$$

Onde: T = temperatura, C= concentração, R= razão Soquetal/ácido e V= vazão

Com base nos dados obtidos pelo planejamento foi possível analisar todos os parâmetros e a relação que eles possuíam com o aumento da conversão. Na equação 4 podemos verificar que a conversão diminui com o aumento da temperatura, da concentração e da razão, uma vez que os sinais são negativos, o que significa que nas condições +1 destas variáveis (70°C, 100mM e 3:1 Soquetal/ácido) menores valores de conversão serão obtidos. Agora quando foram utilizadas as variáveis no nível -1 (60°C, 50 mM e 1:1 Soquetal/ácido) verificou-se que os mesmos parâmetros assumem agora valores positivos, mostrando assim, que as condições -1 aumentam a conversão. A partir dessas análises, foi possível chegar a superfície de resposta da conversão considerando apenas os parâmetros razão e temperatura (figura 4.2). Para isso, mantiveram-se os outros dois parâmetros no nível zero.

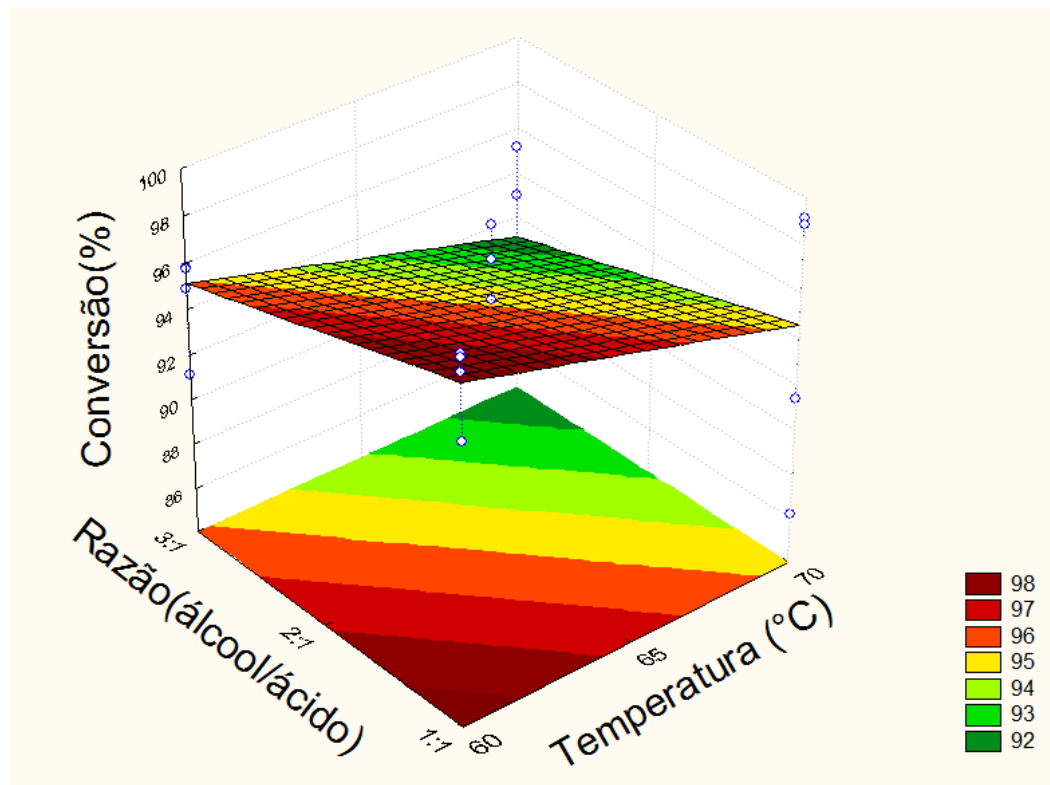


Figura 4.2: Superfície de resposta da conversão do planejamento fatorial 2^4 relacionando temperatura com razão.

Ao analisarmos a superfície, foi possível verificar que as variáveis no nível -1 (1:1 e 60°C) foram as condições em que a conversão foi melhor. Sendo assim, fixaram-se esses parâmetros em -1 e foi feita a superfície de resposta para concentração inicial e vazão (figura 4.3).

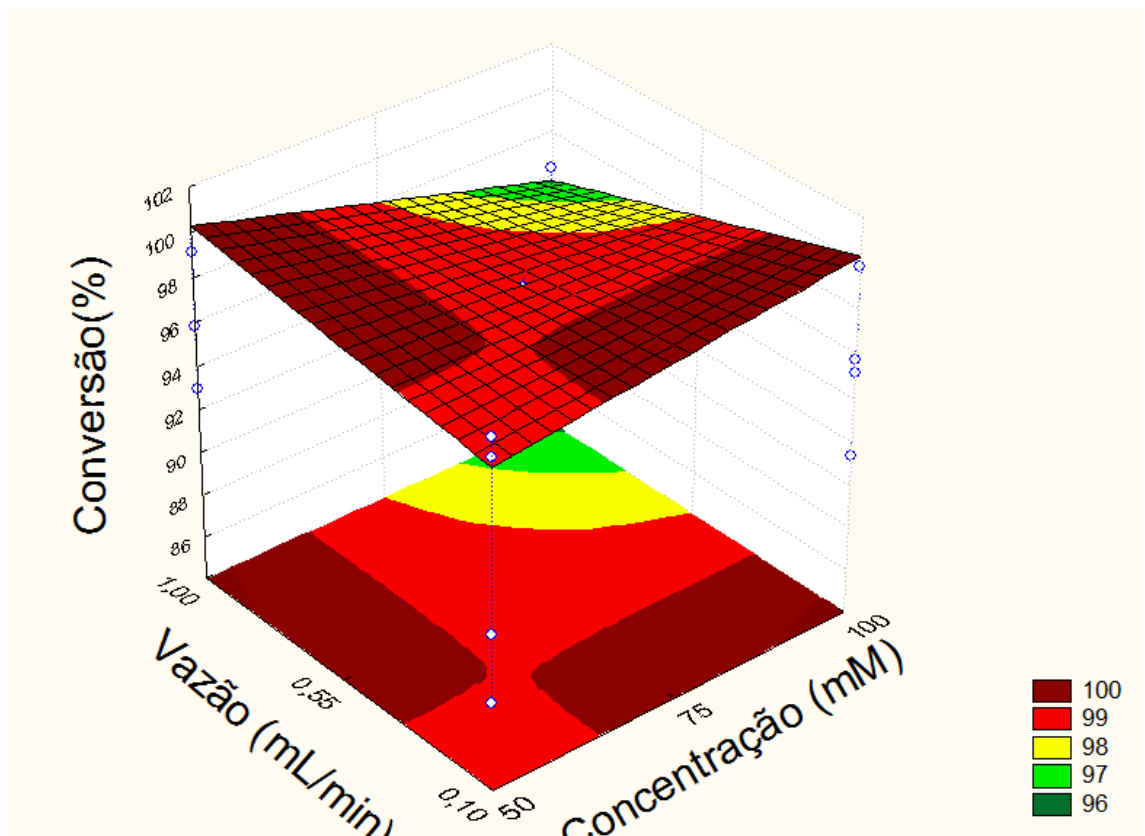


Figura 4.3: Superfície de resposta da conversão do planejamento fatorial 2^4 relacionando concentração e vazão

Essa superfície nos mostra que os parâmetros concentração inicial e vazão apresentam forte interação negativa, isto é maiores conversões serão obtidas quando uma das variáveis estiver no nível +1 e a outra no -1. Nesse caso, podemos ver que ao aumentarmos a vazão, temos que utilizar concentrações menores e nos casos que a concentração é maior, temos que ter uma vazão baixa.

A resposta seguinte a ser analisada foi a produtividade. Assim como no caso da conversão, fizemos para a produtividade o gráfico de Pareto (figura 4.4) para analisarmos os parâmetros que mais influenciaram a resposta produtividade.

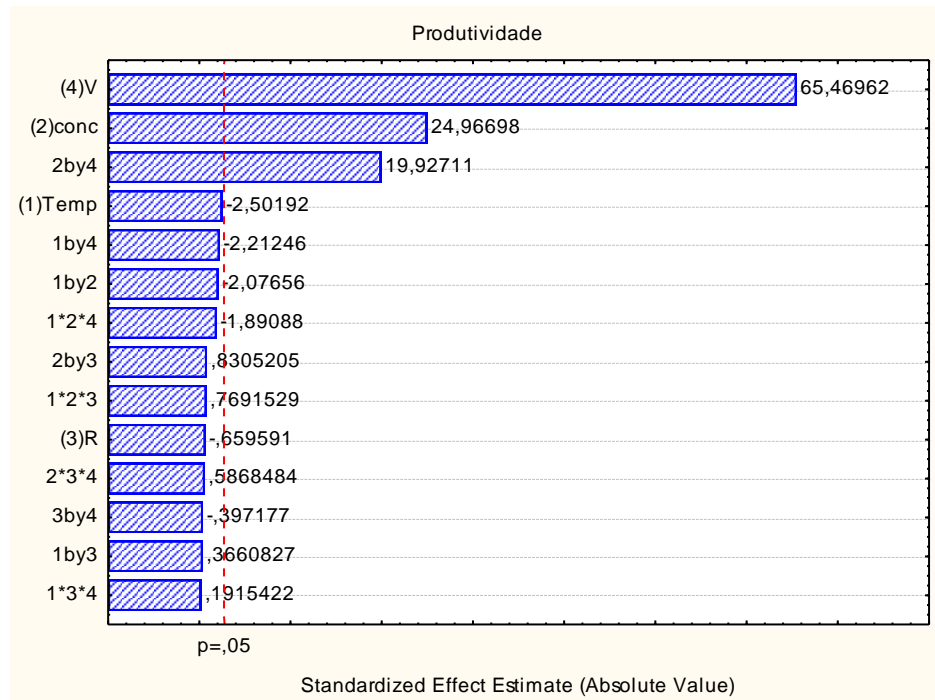


Figura 4.4 – Gráfico de Pareto da otimização para a Produtividade no planejamento fatorial 2^4

Com base na figura 4.4, podemos dizer que os parâmetros que mais influenciaram foi a vazão e a concentração inicial. A temperatura e a razão influenciaram pouco, ficando na área de influência marginal. Assim como para a conversão, foram utilizados apenas os parâmetros significativos e marginalmente significativos para a obtenção da equação de produtividade (equação 5). A produtividade obteve um coeficiente de determinação $R^2 = 0,9988$

Equação 5: Cálculo de produtividade do planejamento fatorial 2^4

Produtividade

$$= 14,3 - 0,4T + 4,5C + 11,8V - 0,4TC - 0,4TV + 3,5CV - 0,3TCV$$

Onde.: T = temperatura, C= concentração e V=vazão

Ao contrário da conversão, no caso da produtividade os parâmetros concentração e vazão, por possuírem o sinal positivo, aumentam a conversão com os valores +1 (100 mM e 1,0 mL/min). A partir desses dados, foi fixada a variável temperatura em -1 (60°C) e foi feito a superfície de resposta para concentração e vazão (figura 4.5).

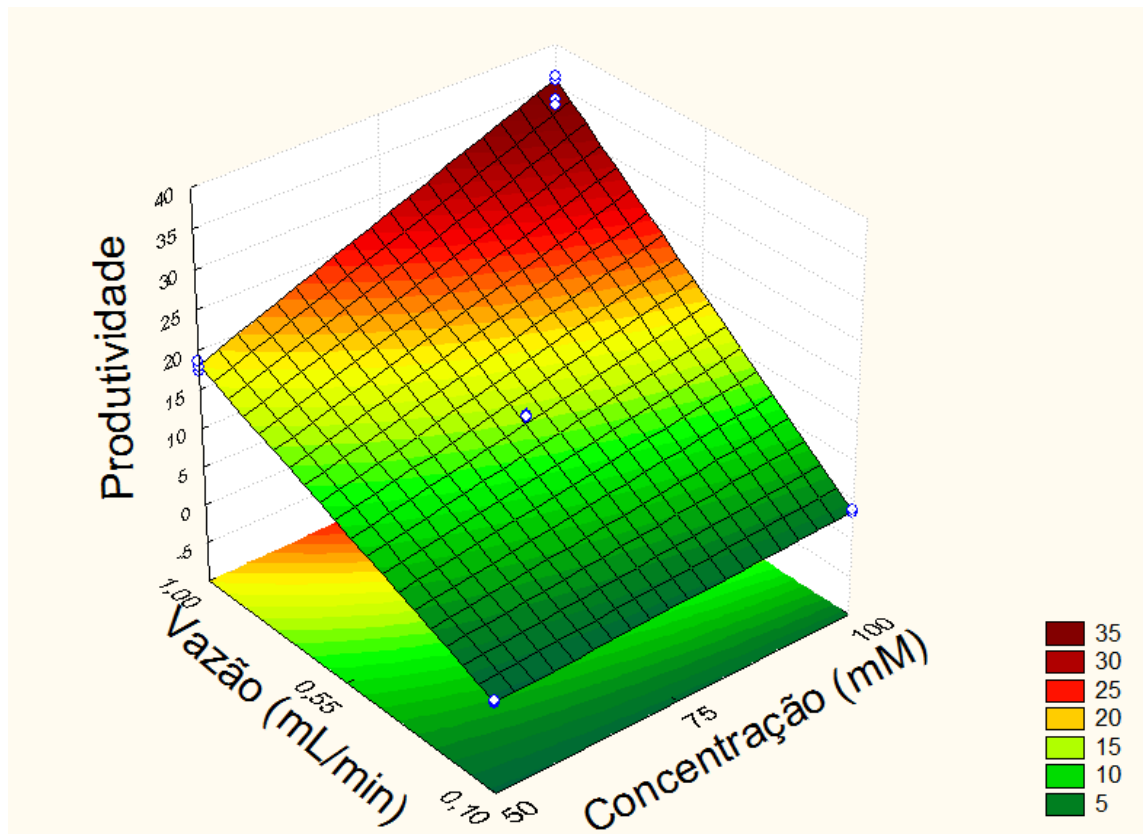


Figura 4.5: Superfície de resposta da produtividade do planejamento fatorial 2^4 em função da concentração e vazão

Com base nessa superfície, podemos dizer que quanto maior a concentração inicial e maior a vazão, maior será a produtividade. Essa produtividade se deu com conversões elevadas, sendo assim, foi proposta a realização de um segundo planejamento, para estudar a produtividade. Para isso, fixou-se a temperatura e a razão nos parâmetros -1 (60°C e 1:1 Soquetal/ácido), pois são os pontos onde a produtividade e a conversão são melhores, e foi mantido os parâmetros concentração e a vazão para estudo, pois foram os que mais influenciaram na produtividade. Como o estudo envolveu 2 parâmetros (vazão e concentração inicial) em 3 níveis (0,10-0,55-1,00 mL/min e 100-150-200 mM), foi realizado um planejamento fatorial 3^2 com repetição do ponto central para estudar melhor a produtividade com a melhor conversão possível. Os resultados podem ser vistos na tabela 4.3.

Tabela 4.3: Resultado da otimização por planejamento 3^2 da conversão e produtividade da Lip B em EC-OD

	Conversão (%)	Produtividade (mg éster/min/g suporte)
1	74,32	52,39
2	83,51	29,44
3	86,94	6,13
4	86,67	45,82
5	92,46	24,44
6	>99	5,24
7	>99	34,98
8	>99	17,57
9	>99	3,52
10	93,99	24,85
11	96,39	25,48

Com base na tabela anterior, foi possível obter o gráfico de Pareto (Figura 4.6) Que mostra a importância dos parâmetros concentração (1) e vazão (2) e a importância da interação dentre eles, tanto na forma linear (L), como também na quadrática(Q).

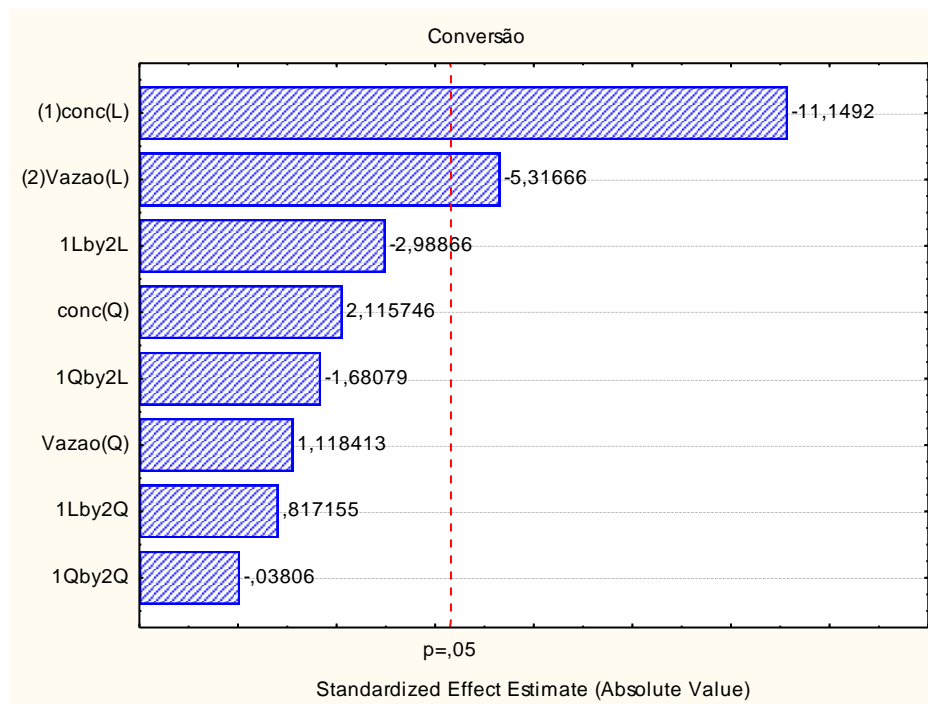


Figura 4.6: Gráfico de Pareto para otimização da conversão no planejamento fatorial 3^2

Como podemos ver no gráfico de Pareto, a concentração e a vazão na forma linear mostraram-se os principais parâmetros a influenciar na conversão. Utilizando os parâmetros significativos e marginalmente significativos, foi possível obter a equação de conversão (equação 6). A conversão obteve um coeficiente de determinação $R^2 = 0,9847$

Equação 6: Cálculo de conversão do planejamento fatorial 3^2

$$\text{conversao} = 94,3 - 9,0C - 2,7C^2 - 6,2V - 1,4V^2 - 3,0CV + 2,9C^2V$$

Onde: C = concentração e V = vazão

Com base na equação 6, foi possível determinar a superfície de resposta (figura 4.7) para a conversão com base na vazão e na concentração inicial da mistura de ácidos.

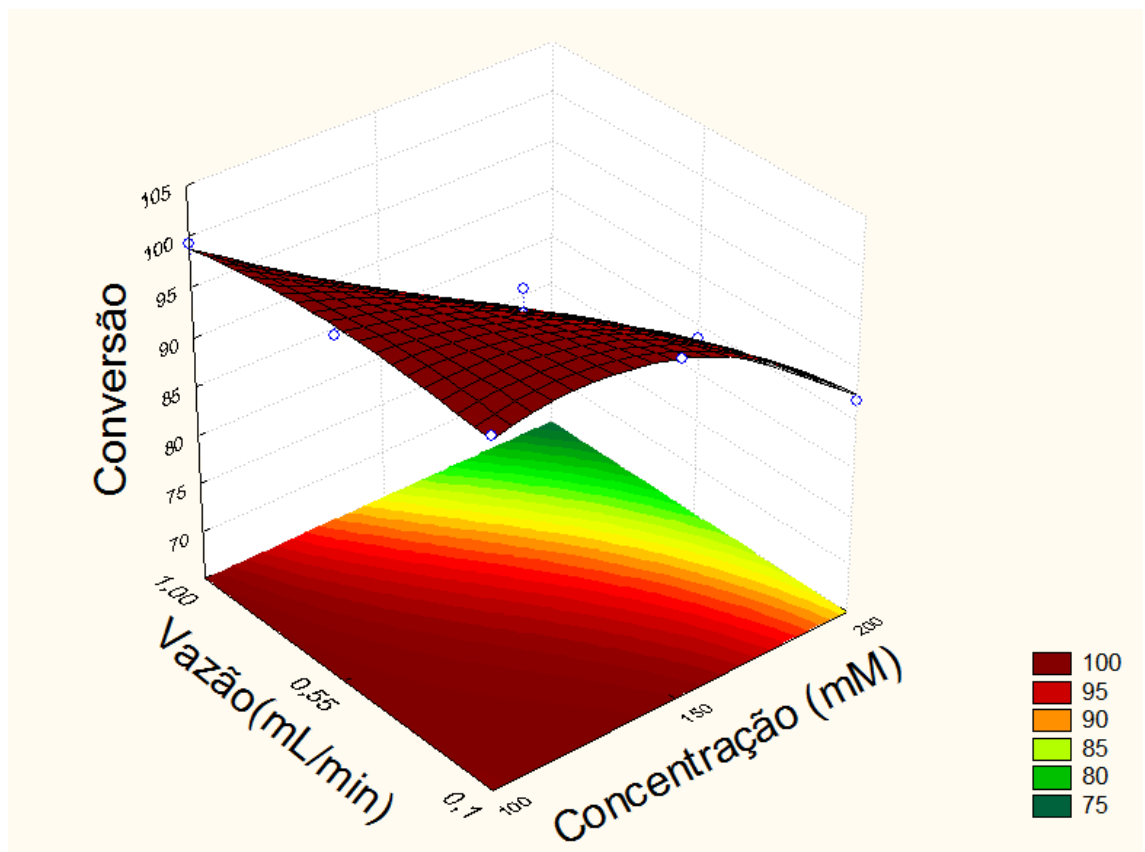


Figura 4.7: Gráfico de conversão do planejamento fatorial 3^2 relacionando concentração e vazão

Com essa superfície, podemos verificar que há uma boa conversão em uma grande área de estudos, porém ao nos aproximarmos de vazões e concentrações elevadas, podemos ver que há uma queda de conversão. Ao analisarmos a superfície de conversão (figura 4.7) podemos verificar que utilizando concentrações iniciais de até 150 mM, podemos utilizar vazões muito próximas a 1,00 mL/min e ainda teremos uma conversão muito boa (acima de 85%) e mesmo com concentrações iniciais de 200 mM a conversão ainda assim fica superior a 74%. Com base nessa superfície, podemos dizer ainda que a maior conversão foi obtida em 0,1 mL/min e 100 mM e foi de 100%. Porém, concentrações de 100 mM e vazões de 0,55 e 1,00 mL/min e 150 mM com vazões de 0,1 mL/min ainda assim teve conversões superiores a 99%.

Obtendo o gráfico de Pareto (figura 4.8) podemos verificar os parâmetros que mais influenciaram na produtividade.

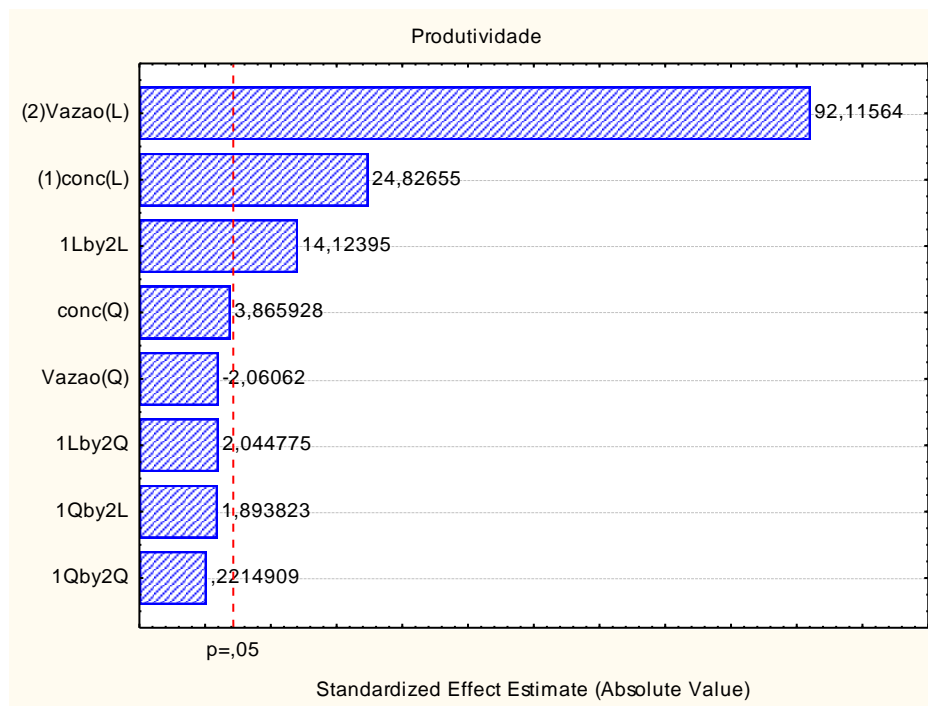


Figura 4.8: Gráfico de Pareto para otimização da produtividade no planejamento fatorial 3^2

Com base na análise da figura 4.8 foi possível verificar que a vazão e a concentração linear são os parâmetros que mais influenciam na produtividade. Com

base no tratamento dos dados e utilizando apenas os parâmetros significativos e marginalmente significativos foi obtida a equação 7 com o $R^2 = 0,999$

Equação 7: Cálculo de conversão do planejamento fatorial 3^2

$$produtividade = 24,9 + 5,9C - 1,3C^2 + 20,3V + 3,7CV - 0,9CV^2 - 0,9C^2V$$

Onde: C= concentração e V= vazão

Com base na equação 7, foi possível determinar a superfície de resposta (figura 4.9) para a produtividade com base na vazão e na concentração inicial da mistura de ácidos.

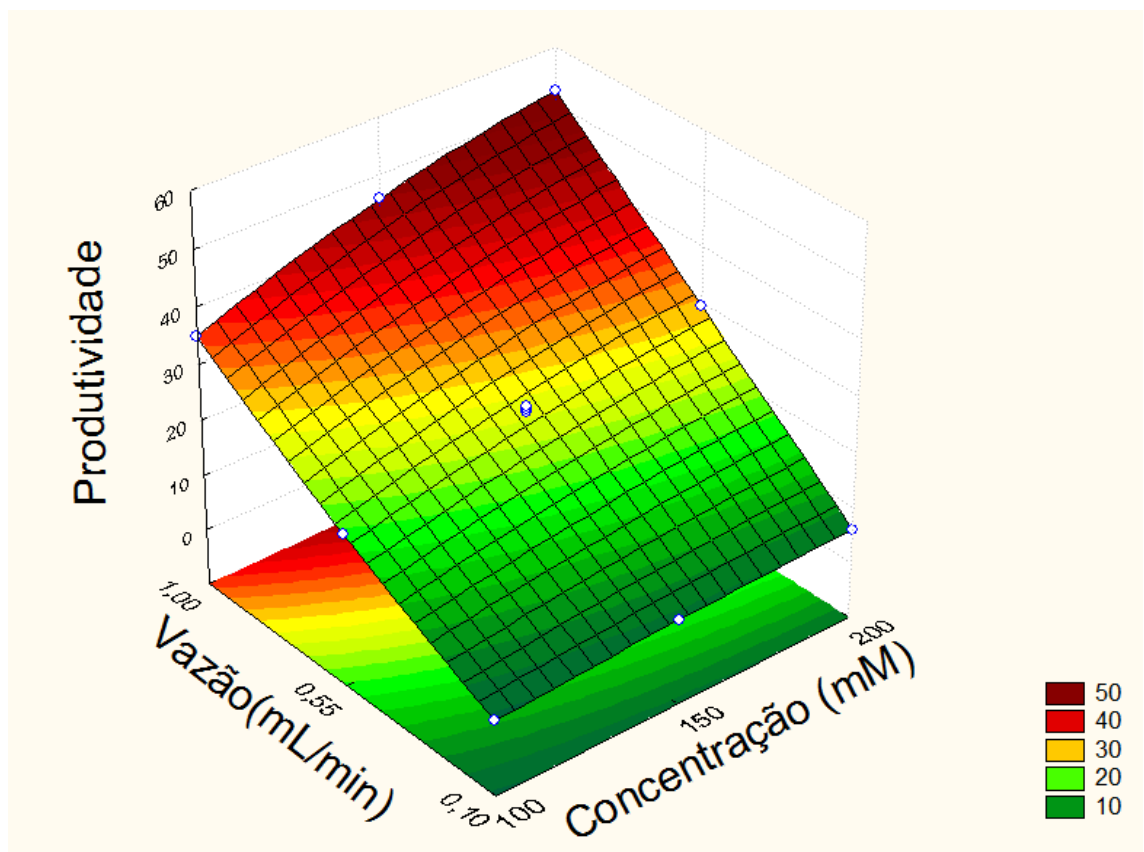


Figura 4.9: Superfície de resposta da produtividade do planejamento fatorial 3^2 relacionando concentração e vazão

Com base nas análises da superfície de produtividade (figura 4.9) podemos verificar que em concentrações iniciais de 200 mM e vazão de 1,00 mL/min a produtividade foi

superior a 52 mg de éster/min/g de suporte e em condições de vazões elevadas tivemos produtividade superior a 45 mg de éster/min/g de suporte para concentração inicial de 150 mM e superior a 34 mg de éster/min/g de suporte para 100mM.

Como podemos ver na figura 4.9 a superfície de resposta não foi otimizada para produtividade, mas isso se deu ao fato de que ao aumentarmos a vazão e a concentração inicial de ácidos, por mais que obtenhamos uma produtividade elevada, ela é feita ao custo de uma queda na conversão (figura 4.8), ou seja, o produto obtido ao final da reação está impuro com os reagentes, o que industrialmente pode começar a se tornar inviável por haver a necessidade de mais um processo para purificar o produto.

5. Conclusão

Inicialmente, foi possível determinar que a reação ocorreu. Sendo assim, verificamos que para um aumento da conversão, os fatores mais importantes são temperaturas menores e vazões menores. Para a produtividade, foi possível verificar que o aumento da vazão e da concentração inicial foram os fatores que mais influenciavam. Com base nesse estudo, podemos verificar que a produtividade é maior (52 mg de éster/min/g de suporte) quando usamos uma concentração inicial da mistura de ácidos de 200 mM, uma vazão de 1,00mL/min, temperatura de 60°C e uma razão Soquetal/ácidos 1:1. Temos uma conversão maior (> 99%) quando utilizamos 100 mM de concentração inicial da mistura de ácidos, uma vazão de 0,10mL/min, temperatura de 60°C e uma razão Soquetal/ácidos 1:1. Com base nesses dados, também podemos estimar a produtividade máxima para uma dada pureza desejada no produto final dentro das faixas estudadas. Como opções para melhorar esse processo, podemos aumentar a concentração de Lip B no suporte, empregar enzimas purificadas ou aumentar o caminho de reação, o que promove uma maior interação entre os substratos e as enzimas. Podemos citar também o fato de utilizarmos rejeito da produção do óleo de palma como principal substrato da síntese, o que estará diminuindo os custos de produção. Além disso, podemos mostrar que a enzima produzida pelo nosso grupo (home made), que é obtida com um custo reduzido, pode ser utilizada nesse processo diminuindo ainda mais os custos e obtendo conversões e produtividade elevadas.

6. Bibliografia

- BASTIDA, A., SABUQUILLO, P., ARMISEN P., FERNÁNDEZ-LAFUENTE R., HUGUET, J., GUISÁN, J.M.A single step purification, immobilization and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports *Biotechnol. Bioeng.*1998, 58, pp. 486–493
- BORNSCHEUER, U.T., *Immobilizing Enzymes: How to Create More Suitable Biocatalysts*, *Angewandte Chemie International Edition*, 2003, 42, 3336
- BRADFORD, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248-554,.
- CAMACHO, F.; ROBLES, A.; GONZÁLES, P. A.; CAMACHO, B.; ESTEBAN, L.; MOLINA, Mechanistic model for the lipase-catalyzed alcoholysis of triacylglycerols *E. Appl. Catal. A*, 2006, 301, 158.
- CASTRO, H.F., MENDES, A. A.; SANTOS, J.C. and AGUIAR, C. L., Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quím. Nova*. 2004, vol.27, n.1, pp. 146-156.
- CASTRO, A. M., BEVILAQUA, J. V., FREIRE, D. M. G, TORRES,F. A. G., SANTAANNA,L. M. M.,GUTARRA, M.L. E., BARBOSAC. A., ALMEIDA, R. V., MENEZES,R. R., CUNHA,A. G., USPTO Deposit number: 12/972,063. 2010.
- CEREGHINO, J.L., CREGG, J.M., Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*,2000, v. 24. 45-66.
- CHARTRAIN,M., GREASHAM,R., MOORE,J., REIDER,P., ROBINSON,D., BUCKLAND,B., Asymmetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceuticals, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2001, 11, 503.
- CHERUKUVADA, S.L., SESHASAYEE, A.S.N., RAGHUNATHAN, K., ANISHETTY, S., PENNATHUR, G. Evidence of a Double-Lid Movement in *Pseudomonas aeruginosa* Lipase: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *PLoS Comput Biol*, 2005, 1(3): e28

- DE MARÍA, P.D., CARBONI-OERLEMANS C., TUINB., BARGEMAN G., VAN DER MEERA., VAN GEMERTR., Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2005, 37, 36-46
- DOS SANTOS, N. B. L., REZENDE, M. J. C., Produção de Monoacilgliceróis: Rotas e Catalisadores, *Rev. Virtual Quim.*, 2012, 4 (2), 118-129.
- FERNANDES, M. L.M., KRIEGER N., BARONA A.M., ZAMORA P.P, RAMOS L.P, MITCHELL, D.A., Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in AOT/Isooctane reversed micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004. v. 30, p. 43-49.
- GOTOR-FERNÁNDEZ, V., BUSTO, E. and GOTOR, V., *Candida antarctica* Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. *Adv. Synth. Catal.*, 2006, 348: 797–812.
- GUTARRA, M.L.E., Produção de lipase pelo fungo *penicillium simplicissimum*: caracterização do processo fermentativo e do produto e desenvolvimento de biorreator para fermentação no estado sólido. Tese (doutorado) – UFRJ/Instituto de Química/Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, 2007. f. 141-155
- GUTARRA, M. L. E., ROMERO, O., ABIAN, O., TORRES, F. A. G., FREIRE, D. M. G., CASTRO, A. M., GUIBAN, J. M. and PAOLO, J. M., Enzyme Surface Glycosylation in the Solid Phase: Improved Activity and Selectivity of *Candida Antarctica* Lipase B. *ChemCatChem*, 2011, 3: 1902–1910.(a)
- GUTARRA, M. L. E., MATEO, C., FREIRE, D. M. G., TORRES F. A. G., CASTO A. M., GUIBAN J. M., PAOLO J. M., Oriented irreversible immobilization of a glycosylated *Candida antarctica* B lipase on heterofunctional organoborane-aldehyde support *Catal. Sci. Technol.* 2011, 1, 260 –266.(b)
- HALLING P., KVINTTINGEN L., Why did biocatalysis in organic media not take off in the 1930s, *Trends in Biotechnology* 1999, 17, 343.
- JUNIOR I. I., SUTILI, F. K., LEITE, S. G.F., MIRANDA, L. S. M., LEAL, I. C.R., de SOUZA, R.O.M.A., DoE oriented reaction optimization on the lipase-catalyzed

monostearin synthesis, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Volume 72, Issues 3–4, November 2011, Pages 313-318

JUNIOR I. I., FLORES M.C., SUTILI F.K., LEITES.G.F., MIRANDA L.S.M., LEAL I.C.R., de SOUZA R.O.M.A., Lipase Catalyzed Monostearin Synthesis under Continuous Flow Conditions *Org. Process Res. Dev.*, 2012, 16 (5), pp 1098–1101

ITABAIANA-Jr, I., SUTILI, F.K., LEITE, S.G.F., GONÇALVES, K.M., CORDEIRO, Y., LEAL I.C.R., MIRANDA L.S.M., OJEDA M., LUQUE R. and de SOUZA R.O.M.A., Continuous flow valorization of fatty acid waste using silica-immobilized lipases. *Green Chem.*, 2013,15, 518-524(a)

ITABAIANA-Jr, I., MIRANDA, L.S.M, de SOUZA, R.O.M.A., Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Volumes 85–86, January 2013, Pages 1-9(b)

JAEGER, K.E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B.W., COLSON, C., HEUVEL, M. & MISSET, O., Bacterial lipases. *FEMS Microbiology*, 1994, 15, 29-63.

JAEGER, K. & REETZ, M.T., Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 1998, 16, 396-403.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W. & REETZ, M.T. Bacterial Biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol*, 1999, 53, 315-351.

KRAGL, U., KRUSE. W., HUMMEL. W., WANDREY,C., Enzyme engineering aspects of biocatalysis: Cofactor regeneration as example, *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 52, 309.

KRALOVA, I.; SJOBLOM, J. J., Surfactants Used in Food Industry: A Review, *Dispersion Sci. Technol.* 2009, 30, 1363

LOWRY, R.R, TINSLEY, I.J., Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *Journal of American Oil Chemical Society.* 1976, 53(7):470-2.

- MILED, N., BEISSON, F., de CARO, J., de CARO, A., ARONDEL, V., VERGER, R.,
Interfacial catalysis by lipases *J.Mol. Catal. Part B. Enzym.*, 2001, V. 11, pp. 65–171
- MOTA, C. J. A.; Da SILVA, C. X. A.; ROSENBAACH JR, N.; COSTA, J.; Da SILVA,
Glycerin Derivatives as Fuel Additives: The Addition of Glycerol/Acetone Ketal
(Soquetal) in Gasolines, *F. Energy Fuels* 2010, 24, 2733.
- NIKOLOVA P., WARD O.P., Whole cell biocatalysis in nonconventional media, *Journal of
Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1993, 12, 76.
- PALOMO, J.M, MUÑOZG., FERNÁNDEZ-LORENTE,G., MATEOC., FERNÁNDEZ-
LAFUENTE,R., GUISÁNJ.M, Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic
support (octadecyl–Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the
open form of lipases, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, V. 19, Pag 279-
286
- PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C.R., SOCCOL, V.T., KRIEGER, N.,
FONTANA, J.D. Recent developments in microbial inulinases – its production, properties
and industrial aplicat. *Appl Biochem Biotechnol*, 1999, 81:35-52.
- PARQUES,F.W. e MACEDO,G. A.,LIPASES DE LÁTEX VEGETAIS: PROPRIEDADES
E APLICAÇÕES INDUSTRIAIS, *Quim. Nova*,2006, Vol. 29, No. 1, 93-99
- RAON.N.,LÜTZS., WÜRGESK., MINÖRD., Continuous biocatalytic processes, *Organic
Process Research & Development* 2009, 13, 607.
- REGULAMENTO (UE) N.º231/2012 DA COMISSÃO de 9 de março de 2012,
que estabelece especificações para os aditivos alimentares enumerados nos anexos II e III do
Regulamento (CE) n.º1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho
- ROSEVEARA., Immobilised biocatalysts—a critical review, *Journal of Chemical
Technology and Biotechnology*, 1984, 34 127.
- ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M. and COLLA, L. M., Avaliação da produção de lipases
por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por
fermentação submersa. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2010, vol.30, n.1, pp. 126-131.

- SCHRAG, J.D., CYGLER, M., Lipases and alpha/beta hydrolase fold. *Methods Enzymol* 1997, 284, 85–107.
- SECUNDO, F., CARREA, G., TARABIONO, C., GATTI-LAFRANCONI, P., BROCCA, S., LOTTI, M., JAEGER, K-R., PULS, M., EGGERT, T. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. *J Mol Catal B* 2006., 39:166-170.
- SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv*, 2001,19, 627-662.
- SORENSEN, H.P., Towards universal systems for recombinant gene expression. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9:27, 1-4p.
- TRAN, D. N. and BALKUS Jr, K. J.,“A Perspective of recent progress in immobilization of enzymes, *ACS Catal.*, 2011, 1, 956.
- UPPEBERG J., PATKAR S., BERGFORS T., JONES T. A., *J.Mol. Biol.* Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of Molecular Biology*, 1994, vol. 235, n° 2, pp. 790-792.
- WANDREY,C., LIESE,A., KIHUMBU,D., *Industrial biocatalysis: Past, present and future*, *Organic Process Research & Development*, 2000, 4, 286.
- YANG,G., WU, J. P., XU,G., YANGL. R., Enhancement of the activity and enantioselectivity of lipase in organic systems by immobilization onto low-cost support, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2009, 57, 96.