



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACEUTICAS

ROTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA A SÍNTESE DE
MONOACILGLICERÓIS

Ivaldo Itabaiana Junior

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Rodrigo Octávio Mendonça Alves de Souza

Co-Orientadores: Ivana Correa Ramos Leal

Leandro Soter de Mariz e Miranda

Colaborações Internacionais: Dr. Aris Xenakis

Dra. Maria Zoumpanioti

Rio de Janeiro

Setembro, 2013.

ROTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA A SÍNTESE DE MONOACILGLICERÓIS

Ivaldo Itabaiana Junior

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGCF) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Examinada por:

Prof. Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza, D. Sc.

Prof.^a Denise Maria Guimarães Freire, D. Sc.

Prof.^a Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D. Sc.

Prof.^a Selma Gomes Ferreira Leite, D. Sc.

Prof.^a Yraima Moura Lopes Cordeiro, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ- BRASIL.
SETEMBRO, 2013

I881r Itabaiana Junior, Ivaldo.

Rotas biotecnológicas para a síntese de monoacilgliceróis / Ivaldo

Itabaiana Junior; orientadores Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza,
Leandro Soter de Mariz e Miranda, Ivana Correa Ramos Leal. – Rio de
Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2013.

155f. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal
do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Lipase. 2. Monoacilgliceróis. 3. Fluxo contínuo. 4. Micelas reversas
e organogel. 5. Cinética enzimática. I. Souza, Rodrigo Octavio Mendonça
Alves de. II. Miranda, Leandro Soter de Mariz e. III. Leal, Ivana Correa
Ramos. IV. Título.

CDD 615.19

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Ivaldo e M^a de Fátima, minha irmã Lívia e meu sobrinho e afilhado Kauã, que sempre vibraram comigo a cada conquista, dividiram as angústias, e compreenderam minhas ausências e impaciências, nos momentos em que mais precisei. A vocês, meu eterno amor e gratidão.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis." José de Alencar.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter me dado saúde, lucidez e forças para percorrer todo este caminho, e ter desfrutado do grande crescimento e amadurecimento ao qual me foram proporcionados. Considero-me um ser de sorte, pois pude ter pessoas especiais nos dias certos, e nas horas certas!

A minha mãe, Maria de Fátima, por todo amor, compreensão, dedicação, e principalmente, incentivo para que eu pudesse prosseguir e realizar meus sonhos! Nenhuma palavra expressa a gratidão e amor que sinto por você! Obrigado por sempre me criar e educar com tanto carinho, por sempre colocar a gente em primeiro lugar em sua vida! Tantos momentos que me vêm em mente agora... mas em todos eles, sempre feliz por ter a melhor mãe do mundo comigo! Obrigado por sempre me compreender, acalmar meus anseios, dúvidas, entender minhas distâncias, e me fazer ver que família é de fato, a base de tudo! Obrigado por me fazer aproveitar a cada pequeno momento ao seu lado! Amo-te!

Ao meu pai, Ivaldo (grande Ivaldo Pai), por sempre me incentivar a estudar, e a seguir meus sonhos, mesmo você não gostando muito de química... rs. Obrigado por abrir mão de seus sonhos pessoais, e fazer sacrifícios para que eu pudesse ter uma educação de qualidade, e me tornar um ser humano íntegro. Obrigado por ser meu exemplo de homem, minha referência, meu herói! Hoje eu entendo porque te desenhava na escola com uma capa do Batman! Você já era meu super-herói!

A minha irmã Lívia, que mesmo distante fisicamente hoje, torce por mim e me demonstra isso sempre! Brigas fazem e sempre fizeram parte de um cotidiano fraternal. O que importa realmente, é que pudemos ter tempo de demonstrar um para o outro, que o amor e a admiração mútua são maiores do que qualquer diferença, ou temperamento. Amo-te! Obrigado pelo grande presente dado, meu sobrinho Kauã, que a cada sorriso e a cada brincadeira juntos, me mostra que as coisas mais simples da vida nunca devem ser deixadas de lado!

A toda minha família por todo apoio, em especial minha madrinha, tia gêmea, segunda mãe “Tia Zezé”, por todo carinho, amor, e grande incentivo durante todas as épocas da minha vida até aqui! De fato, sei o que é ter duas mães! Agradeço especialmente também, a minha prima Paula, pelos longos minutos ao telefone, conversas, bilhetes, amizade, e risadas longas, de mais de uma pessoa rs rs! Obrigado! Vocês são muito especiais para mim!

Ao meu orientador Rodrigo Souza, por ter me aceitado como aluno de doutorado, sem mesmo me conhecer, e por ter acreditado em mim durante este trabalho. Obrigado pelas cobranças desde o início, pelos grandes conhecimentos transmitidos, pelas palavras e por me mostrar que sou capaz de realizar grandes trabalhos. Obrigado pela parceria, que para mim, foi de grande sucesso! Que venha mais!

A minha querida co-orientadora, e amiga, Ivana, por todos os conhecimentos adquiridos, por me “aturar” desde a época de iniciação científica, até hoje! Obrigado por ser meu exemplo de dedicação, competência, organização e sinceridade! Por ter me ensinado tanta coisa nestes nove anos como seu aluno! Por ter me ensinado a caminhar com minhas próprias pernas desde a iniciação científica, a ter maturidade, pro-atividade, e principalmente, por ter me apresentado ao grupo do prof. Octávio, que veio a ser minha segunda casa. Obrigado!

Ao meu co-orientador Leandro Soter, pelos grandes conhecimentos transmitidos, pelos questionamentos que só ele teve, pela importância que isto agregou ao meu trabalho, e por ser um exemplo de competência e dedicação para todos.

A todos do BossGroup pela sempre agradável e animadora convivência! Foi um prazer imenso dividir meus dias com todos vocês! Agradeço de coração a: Ingrid (obrigado pelos papos, por me apresentar ao Lowry-Tinsley, por toda a ajuda no CG-EM, pela p... na hora do almoço... rs), Flavinha (pela descontração durante as jornadas de experimentos, por abastecer o povo com os quitutes mais famosos de Caxias), Zé, Gizelda (Presê), Jonathan (Bassut), Luciana (Lu Ciênciasxxxx Farmacêuticaxxxxx), Raquelzinha (Fiscal oficial das pias e da limpeza do laboratório), Raquel (ora Raquel Boss, ora Raquel pós-doc, ora Raquelzona, ora Raquel mesmo... vamos pegar um trabalho pesado agora pela frente!), Halliny (desde os tempos mais primórdios no NPPN), Daniel (Jack Daniels), Guilherme (Esse é o ritmo), Silésia, Amanda, Alexandra (começo a rir só ao lembrar de você rindo), Ana Clara (Crrraaara), Larissa, Mariana, Felipe (IC da Amanda), João (Ic do Felipe), João (IC do Leandro), Yasmin. Um agradecimento especial a Karen, pela amizade, parceria científica e didática (até em Macaé você me perseguiu... rs), e pela ótima convivência em Atenas! Foi uma fase um pouco tensa para os dois rs, mas importante e proveitosa! Obrigado pelo incentivo, pelas besteiras (ou seriam p...?) que falamos, pelas conversas, pelos momentos de surto rs, enfim, por tudo! Valeu Nem! rs (Você está sentindo falta do Milan, e do povo trabalhador de lá...)! Ao Felipe, agradeço pela amizade, confiança, pelos momentos de descontração, desde manhã cedo no laboratório, pela burocracia diária (rs, diária mesmo!), pelas p... rs, e também, pela parceria científica, por dedicar parte do seu tempo para o desenvolvimento de nossos artigos. Sem dúvida, foi muito proveitoso! Que venham mais! A TODOS, obrigado!

A minha melhor amiga, Anne, agora Anne Bracho, rs por toda amizade, compreensão, conselhos, presença, durante todos esses anos! Obrigado por ser este grande presente para mim! Não disse que teria um agradecimento separado?

Ao meu irmão e amigo Raphael Tavares (Alô Tavaresxxxx) por todo incentivo, amizade e conselhos, desde os tempos de colégio! Rapaz, estamos velhos mesmo hein? Rs

Ao meu amigo Marcus Vinícius, pela curta e longa amizade ao mesmo tempo! Obrigado por todo o incentivo e compreensão!

Aos meus amigos Eduardo Infante, Cinthia Leida, Juliana Alves, Fernanda Moreira, Miliane Alves, por todos os momentos de descontração, amizade, e por me chamarem para sair nos dias em que não posso mesmo! Hahaha

A todos os meus queridos amigos que ganhei na Farmácia da UFRJ, e os trouxe para a vida! Jessica (Pirinem), Juliana (Chestin), Livia (Lévia), Sara, Priscila, Felipe (Bonitinho), Raphael (Putex Forever), Livinha, Victor (Puterex), Danielzão, Danielzinho, Renata (Pavunense, TG 22), Bianca (Béia), obrigado pela melhor fase da vida! Desculpa a ausência em diversos eventos, mas obrigado pela compreensão e incentivo de sempre!

Aos meus amigos, que desde a época de colégio, sempre estão presentes em minha vida: Jessika (Horácia), Euler, Desirée, Vinicius, Bruna, Jennifer, Katherine, Fabio, obrigado por tudo!

A todos do extinto Laboratório de Fisiologia Vegetal, onde iniciei minhas experiências como IC. Por mais que tenha ficado pouco tempo, ganhei amigos para uma vida inteira! Muito obrigado por tudo, Simone, Claudio, Janaína, Renata, Prof. Alice, Prof. Esquibel, Viviane, Sharon, Fábio, Vanessa, Thiago, Celso. Vocês são demais!

A todos do Laboratório de Fitoquímica, no NPPN, onde desenvolvi todo o meu gosto pela ciência, e fiz grandes amigos! Agradeço especialmente ao professor Ricardo Kuster, por me aceitar em seu laboratório, e principalmente, por seus conhecimentos engrandecedores, paciência, calma, e acima de tudo, por ter me dado autonomia e discernimento durante minha caminhada na IC. Agradeço por ser meu amigo até hoje, assim como por me apoiar em minha decisão de fazer doutorado em uma área diferente, mesmo não sendo meu orientador! Agradeço imensamente também a professora Naomi, que me ajudou a ser mais organizado, atencioso com o trabalho, através do método Japa de organização! Rs Obrigado pelas longas conversas durante o almoço, ou ao final do dia! Aos grandes amigos de laboratório H-029: Celsão, Kátia, Crizinha, Kassia, Crizona, Tati, Halliny (do Boss Group também), Anne, Katherine, e todos os agregados, o meu muito obrigado!

A todos do National Hellenic Research Foundation, em Atenas, pela colaboração, amizade e troca de experiências. Em especial, agradeço ao Dr Aris Xenakis, por aceitar a parceria, a doutora Maria Zoumpantioti, pela agradável convivência, e trabalho juntos; ao Georgious Soutirodis e Maria Savidou, pelo grande convívio e ensinamentos gregos, e pelo café! Rs rs

A minha aluna de iniciação Marcella, pela dedicação nos trabalhos, vontade de trabalhar e por ficar feliz junto comigo nos bons resultados! Assim como por não ficar chateada depois de um banho de Lowry-tinsley, ou por ter que correr até a sala 628 para ler rápido, as medidas de esterificação das altas concentrações de ácido esteárico, que muitas vezes tivemos que refazer! Mesmo depois de ter me largado, continuo gostando de você ta? Rs.

A Andrea Zanetti, da UEM, pela ajuda nos MEVs das amostras de enzimas.

A Leonice, do Lab 628 do IQ/UFRJ, pelos espectros de IV, além da paciência, atenção, e pelas reflexões científicas! Obrigado pelas broncas sutis ao quebrar cada uma das 3 cubetas de quartzo rs, ops, uma de quartzo e duas de vidro! Você me mostrou a diferença! Rs

Ao Ricardo do lab 622 pelos ensinamentos no CG-EM, e pela organização das imensas filas do *auto-sampler*.

A minha banca de acompanhamento, composta pelas profs Gisela Dellamora e Patricia Zancan, pelas contribuições no trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de ter feito parte desta instituição, e principalmente, por ter sido convidado a fazer diretamente o curso de doutorado. Obrigado pela confiança em mim depositada!

A banca examinadora por aceitar avaliar este trabalho.

A Capes pelo apoio financeiro.

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas (D.Sc.).

ROTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA A SÍNTESE DE MONOACILGLICERÓIS

Ivaldo Itabaiana Junior

Setembro/2013

Orientador: Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza

Co-Orientadores: Ivana Correa Ramos Leal

Leandro Soter de Mariz e Miranda

Programa: Ciências Farmacêuticas

Neste trabalho foram investigados biorreatores para a síntese enzimática do monoestearina protegida (MEP), tendo-se como substratos o R,S-1,2-O-isopropilideno glicerol (IPG) e o ácido esteárico (AE). Através de planejamentos experimentais, 95% de MEP foram obtidos pela enzima Lipozyme RM IM a 58,5°C, razão molar 1:1 entre substratos, 250 rpm e 0,1% (p/v) de enzima, em 4h de reação. Em condições de fluxo contínuo, valores semelhantes foram encontrados em 20 min. O sistema em batelada possibilitou cerca de oito ciclos da enzima, contra 15 demonstrados pelo reator de leito fixo. Reações livres de solventes também foram testadas, demonstrando excelentes conversões, entretanto, com apenas cinco ciclos possíveis em batelada, além da impossibilidade de execução em fluxo contínuo. Um resíduo de ácidos graxos oriundo da indústria de refino de óleo de palma foi utilizado como matéria-prima para a produção de MAGs, obtendo-se 95% de conversão em batelada, e mais de 90% de ésteres em fluxo contínuo, agregando-se valor ao produto final. A formação de monoestearina desprotegida (ME) foi obtida através de uma cascata químico-enzimática em fluxo contínuo, onde um resíduo de glicerol foi acetalizado a IPG por silicagel funcionalizada, com posterior esterificação com o AE catalisada pela enzima RM IM, e quebra dos acetais. Após 1h de reação ME final precipita em n-heptano. A síntese de MEP foi investigada também em micelas reversas, onde 80% de conversão foi observado em apenas 30 minutos em catalisada pela lipase CaL B estruturada em sistemas de AOT/iso-octano. Estudos cinéticos demonstraram que a reação segue o mecanismo bi-bi ordenado, com inibição pelo ácido. O sistema AOT/CaL foi imobilizado em uma matriz de gel de HPMC, onde 90% de conversão foram obtidas em 20 minutos com apenas 1,2 mg de lipase. Esta matriz pôde ser reutilizada 15 vezes sem perda significativa nas conversões.

Abstract of Doctoral Thesis presented to the Pharmaceutical Sciences Post-Graduate Program as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Pharmaceutical Sciences (D.Sc.).

BIOTECHNOLOGICAL ROUTES FOR MONOACYLGLYCEROL SYNTHESIS

Ivaldo Itabaiana Junior

September/2013

Advisor: Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza

Co-advisors: Ivana Correa Ramos Leal

Leandro Soter de Mariz e Miranda

Department: Pharmaceutical Sciences

This study investigated bioreactors for the enzymatic synthesis of protected monoestearin (MEP), using R,S-1,2-O-isopropylidene glycerol (IPG) and stearic acid (AE) as substrates. By Design of Experiments (DOE), 95% of MEP were obtained by Lipozyme RM IM at 58.5° C, with a molar ratio of 1:1 of substrates, 250 rpm and 0.1% (w/v) of enzyme with 4h of reaction time. Under continuous flow conditions, similar values were found in 20 min. The batch system allowed about 8 enzyme recycles against 15 obtained by packed-bed reactor. Free solvents reactions were also performed, showing excellent conversions, indeed, with only 5 possible recycles in batch conditions. This system did not work under continuous flow conditions. A fatty acid residue from palm oil refining industry was applied as raw material for the production of MAGs, obtaining 95% conversion in batch system, and over 90% of esters under continuous flow system, aggregating value of the final product. The final unprotected monoestearin (ME) was obtained by a chemo-enzymatic cascade bitstream, where a glycerol residue was transformed into IPG by functionalized silicagel with subsequent esterification reaction with AE catalyzed by RM IM lipase, followed by the ketals cleavage. After 1h the reaction, the ME precipitates in n-heptane. The synthesis of MEP was investigated in reverse micelles, in which 80% conversion was obtained in only 30 minutes catalyzed by CaL B lipase structured in AOT / iso-octane systems. Kinetic studies demonstrated that the reaction follows the ordered bi-bi mechanism, with inhibition by the acid. The AOT/CaL system was immobilized on a gel matrix of HPMC, where 90% conversion was obtained in only 20 minutes with 1.2 mg of lipase. This matrix could be reused 15 times without significant loss in conversions.

Índice

CAPÍTULO 1- Introdução e Objetivos	1
1.1 - Contextualização.....	1
1.2 – Considerações Parciais.....	6
CAPÍTULO 2 - Revisão Bibliográfica	7
2.1 – Enzimas	7
2.1.1 – Lipases.....	9
2.1.1.1 – Características Gerais	9
2.1.1.2– Especificidade de Lipases	12
2.1.1.3 - Aplicações de Lipases	13
2.1.1.4 - Mecanismo Catalítico e Estrutura de Lipases	15
2.2 - Tensoativos	18
2.2.1 - Classificação dos Tensoativos	20
2.2.2 - Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL)	22
2.3- Monoacilgliceróis	23
2.3.1 - Síntese de Monoacilgliceróis	26
2.3.1.1 - Interesterificação: Glicerólise de TAG e Glicerol (GL)	26
2.3.1.3 - Catálise Enzimática	28
2.3.1.3.1 - Esterificação de glicerol com ácidos graxos livres ou ésteres para produção de 1(3) MAG.	29
2.3.1.3.2 - Interesterificação enzimática de TAGs	30
2.3.1.3.3 - Glicerólise de triacilgliceróis para produção de 1(3)-MAG.	31
2.3.2 - Patentes para a produção de monoacilgliceróis por catálise enzimática	32
2.3.3- A Monoestearina	33
2.3.3.1 - Síntese de Monoestearina	34
2.4 - Sistemas Microemulsionados.....	35
2.4.1- Micelas Reversas.	37
2.4.1.1 – Surfactantes	38
2.4.1.2 - Lipases em Micelas Reversas.....	40
2.4.1.2.1 – Incorporação da Enzima	44
2.4.1.2 - Imobilização de Enzimas em Organogel	45
2.4.1.3- Lipases em Organogel	46

2.4.1.4 - <i>Influência dos surfactantes</i>	47
2.4.1.5 - <i>Efeito da difusão e da temperatura sobre a taxa inicial da síntese</i>	47
2.4.1.6 - <i>Estabilidade de armazenagem</i>	48
2.5 – <i>Reatores Utilizados em Biocatálise</i>	49
2.5.1 - <i>Reatores de Fluxo Contínuo</i>	50
2.5.1 - <i>Reatores de Leito Fixo (“Packed-Bed reactors”)</i>	52
2.5.2 - <i>Aplicações de Reatores de Leito Fixo</i>	53
CAPÍTULO 3 - <i>Materiais e Metodologia</i>	54
3.1 - <i>Materiais</i>	54
3.1.1 - <i>Enzimas</i>	54
3.1.3 – <i>Substratos</i>	55
3.1.4 - <i>Equipamentos</i>	55
3.2- <i>Métodos:</i>	56
3.2.1 - <i>Análise da Pureza dos Reagentes de Partida</i>	56
3.2.2 - <i>Teste de Solubilidade dos Reagentes de Partida</i>	57
3.2.3- <i>Seleção de Lipases</i>	57
3.2.4 - <i>Verificação do Percentual de Conversão</i>	58
3.2.5 - <i>Curva Padrão do Ácido Esteárico e Resíduo de Ácidos Graxos</i>	59
3.2.6 - <i>Determinação do Tempo Reacional</i>	60
3.2.7 - <i>Determinação da atividade de esterificação</i>	60
3.2.8 - <i>Avaliação do Efeito do Solvente</i>	61
3.2.9 - <i>Determinação das Velocidades Iniciais de Reação</i>	61
3.2.10 - <i>Efeito da Razão Molar de IPG e AE na Cinética de produção do MEP em n-heptano</i> ...	62
3.2.11 - <i>Otimização das Condições Reacionais:</i>	62
3.2.12 - <i>Aumento de Escala e Estudo da Influência de um Reator de Tanque agitado na síntese da MEP</i>	64
3.2.13 - <i>Avaliação da Capacidade de Reusos da lipase RM IM</i>	64
3.2.14 - <i>Quantificação de Proteínas Lixiviadas do Suporte (Lipase RM IM)</i>	64
3.2.15- <i>Análise do Suporte da Enzima RMIM por Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	65
3.2.16 - <i>Estudo da Dessorção da Lipase de Rhizomucor miehei de seu suporte</i>	65
3.2.17 - <i>Síntese de MEP e MRAG em condições de Fluxo Contínuo.</i>	66
3.2.18 - <i>Otimização das variáveis Reacionais:</i>	67
3.2.19 - <i>Adaptação para outro Equipamento</i>	68

3.2.20 - Estudo da Síntese de Monoacilgliceróis catalisada pela Lipase RM IM em sistemas livres de solventes	69
3.3 – Síntese de MONOEST e MONORES via Reação Químio-Enzimática em Cascata	69
3.3.1 – Produção de Silicagel Funcionalizada (SGF)	69
3.3.2 – Acetalização do Glicerol	70
3.3.3 – Reação de Esterificação	70
3.3.4 – Clivagem do Acetal Presente no MEP e no MRAG	70
3.3.5 - Reação em Cascata	70
3.4 – Biocatálise em sistemas microemulsionados: Micelas Reversas e Organogel	71
3.4.1 - Reações em microemulsões AOT/Iso-octano	71
3.4.2- Reações em Microemulsões em Lecitina	71
3.4.3 – Análise das Conversões	72
3.4.4 – Determinação dos Parâmetros Reacionais	72
3.4.5 - Preparação de Organogel	73
4.1 - Considerações Iniciais:	75
4.2 - Análise de pureza dos Materiais de Partida.	75
4.3 - Teste de solubilidade dos Reagentes	77
4.4 - Seleção de Lipases	78
4.5– Escolha do melhor Tempo Reacional	80
4.6 – Efeito do Solvente	82
4.7 - Efeito da Razão Molar de IPG e AE na Cinética de produção do MEP em n-heptano	86
4.8 - Otimização dos Parâmetros Reacionais	88
4.9 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a produção de MEP	90
4.10 – Avaliação da Capacidade de Reusos da enzima Lipozyme RM IM	95
4.11 - Aumento de Escala e Estudo da Influência de um Reator de Tanque agitado na síntese da MEP	98
4.12 - Estudo da Dessorção da Lipase de <i>Rizhomucor miehei</i> de seu suporte	100
4.13 - Síntese da MEP em Condições de Fluxo Contínuo	103
4.14 – Adaptação das condições reacionais obtidas para outro equipamento de Leito Fixo	112
4.15- Reciclos da lipase RM IM em condições de Fluxo Contínuo	118
4.16 - Aplicação de Lipases comerciais no tratamento de um resíduo de ácidos graxos	119
4.17 - DCCR para Amostra de Ácidos Graxos com as Enzima CalA e CalC	127
4.18 - Adaptação das Condições Reacionais para outro Reator de Leito Fixo	129
4.19 - Estudo da Síntese de Monoacilgliceróis catalisada pela Lipase RM IM em sistemas livres de solventes	132

<i>CAPÍTULO 5: Resultados e Discussão - PARTE 2: Síntese de Monoacilgliceróis via Químio-enzimática em Cascata sob condições de Fluxo Contínuo.</i>	137
5.1 - Contextualização:	137
5.2 – Estudo da Acetalização do Glicerol: Formação de IPG	138
5.3 - Estudo da Desproteção do MEP	144
5.4 – Análise dos Produtos de Esterificação por Espectroscopias de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).	150
<i>CAPÍTULO 6: Resultados e DiscussãoPARTE 3: Biotálise em Sistemas Microemulsionados – Micelas Reversas e Organogel.</i>	157
4.1 – Considerações Iniciais:	157
4.2 – Escolha do Melhor Sistema Microemulsionado	157
5.3 – Estudos do Efeito da Temperatura	162
5.4 – Efeito da Quantidade de Água	163
5.5 - Efeito da concentração da Lipase CaL B na microemulsão AOT Iso-octano	165
5.6 – Estudos Cinéticos e Mecanismo de Esterificação para a Lipase CaL B na Microemulsão AOT/Iso-octano	165
5.7 - Imobilização da Microemulsão AOT CaL em Organogel	173
<i>CAPÍTULO 7: Considerações Finais Sobre o Trabalho</i>	180
7.1 – Relação entre Produtividade e Eficiência dos Biorreatores Estudados	180
7.2 – Conclusões Finais	182
<i>CAPÍTULO 8: Referências Bibliográficas</i>	184
<i>APÊNDICE A - Métodos Cromatográficos e Cromatogramas Ilustrativos</i>	203
A1 - Curva de Calibração do AE	203
A2 – Cromatogramas Ilustrativos	204
<i>APÊNDICE B - Detalhamento dos Resultados</i>	208
<i>APÊNDICE C - Espectros de RMN</i>	220
<i>APÊNDICE D - Publicações</i>	227

Lista de Siglas e Abreviaturas

AE - Ácido esteárico

AOT - bis-(2-etilexil)-sulfocinato de sódio

AOT/CaL – micela reversa em AOT/Iso-octano contendo a lipase CaL B

APT - *Attached Proton Test*

BSA – albumina de soro bovino

CaL B – lipase B de *Cândida antarctica*

CG – Cromatografia Gasosa

CG-EM – Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

¹³C-RMN – Ressonância Magnética Nuclear e Carbono 13

CLN – carreadores lipídicos nanoestruturados

CMC – Concentração Micelar Crítica

COSY - *Correlation Spectroscopy*

CSTR - Continuous Stirred-Tank Reactor

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio

DAG – Diacilglicerol

DCCR – delineamento do composto central rotacional.

DOE – *Design of Experiments*

DMSO – dimetilsulfóxido

E.C - *Enzyme Commission*

EHL - equilíbrio hidrofílico-lipofílico

EUA - Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

FFD – planejamento experimental fracionário

FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

g – Grama

GL – glicerol

Glu – Ácido glutâmico

GRAS - *Generally Recognized as Safe*

h – hora

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

¹H-RMN – Ressonância Magnética de Hidrogênio

His – Histidina
HPMC – hidroxipropilmetil celulose
HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Correlation*
IPG – R,S-1,2-O-isopropilideno glicerol (Solketal)
IV – infravermelho
Km - Constante de Michaelis-Menten
Log *P* – Coeficiente de partição (1-octanol/água)
MAG – monoacilglicerol
ME – monoestearina (monoestearato de glicerila)
MEP – monoestearina protegida – produto de esterificação do ácido esteárico com o R, S –
min – minuto.
mM – Mili molar
MRAG – éster proveniente do resíduo de ácidos graxos (RAG) com o IPG
MONORES – MRAG após a quebra dos acetais
N435 - Novozym[®] 435 – lipase B de *Cândida antarctica* imobilizada em resina de troca
iônica tipo acrílica
NC-IUBMB - *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and
Molecular Biology*
NLS – nanopartículas lipídicas sólidas
OG – organogel
P – Produtividade (g de produto . h⁻¹ . U⁻¹)
RAG – resíduo de ácidos graxos proveniente da indústria de refino do óleo de palma
RM IM – lipase de *Rizhomucor miehei* imobilizada em resina de troca iônica fenólica;
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
Ser – Serina
TAG – Triacilglicerol
TL IM – Lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em cerâmica
U - Unidade de atividade enzimática, μmol/min
UV – ultravioleta
V – Volume
W₀ – quantidade de água em uma microemulsão.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: ESQUEMA DOS PROCESSOS REACIONAIS ENVOLVIDOS NO PRESENTE TRABALHO (PRODUÇÃO DO 1-MAG A PARTIR DO GLICEROL PROTEGIDO) E, ALTERNATIVAS DE ROTAS SINTÉTICAS PARA PRODUÇÃO DO 1-MAG QUE LEVAM A FORMAÇÃO DE SUB-PRODUTOS.	4
FIGURA 2 : PERSPECTIVAS PARA O MERCADO MUNDIAL DE ENZIMAS INDUSTRIAIS NO PERÍODO DE 2008-2015. (HTTP://WWW.BCCRESEARCH.COM/REPORT/BIO030F.HTML , 2012, CITADO POR MACHADO, 2011).....	8
FIGURA 3: REAÇÃO DE HIDRÓLISE CATALISADA POR LIPASES. (ADAPTADO DE CARVALHO ET AL, 2005).	9
FIGURA 4: ESTRUTURA CRISTALINA DA LIPASE DE RIZHOMUCOR MIEHEI, EVIDENCIANDO A TAMPA HIDROFÓBICA EM SUA FORMA FECHADA (A) E ABERTA (B). FONTE: RODRIGUEZ & FERNANDES-LAFUENTE, 2010.....	11
FIGURA 5: PRINCIPAIS REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES DO TIPO NÃO ESPECÍFICA E 1,3 ESPECÍFICA (ADAPTADO DE PAQUES E MACEDO, 2006).	12
FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MODELO ESTRUTURAL DE A/B HIDROLASES. FILAMENTOS EM CONFORMAÇÃO B (1-8) FORMANDO UMA ESTRUTURA EM FOLHA B-PREGUEADA ESTÃO INDICADOS PELAS SETAS, ESTRUTURA EM A-HELICES (A-F) INDICADAS PELOS CILINDROS. A POSIÇÃO TOPOLÓGICA DO SÍTIO ATIVO É REPRESENTADA POR UM CÍRCULO SÓLIDO, ONDE O NUCLEÓFILO É O RESÍDUO DE AMINOÁCIDO DEPOIS DE B5, O RESÍDUO DE ASP/GLU ESTÁ DEPOIS DE B7 E O RESÍDUO DE HISTIDINA ESTÁ ENTRE B8 E AF (JAEGER ET AL, 1999).....	15
FIGURA 7: MECANISMO CINÉTICO (PING-PONG BI BI) DE LIPASE CATALISANDO REAÇÕES ENVOLVENDO MÚLTIPLOS SUBSTRATOS E PRODUTOS USANDO A NOTAÇÃO DE CLELAND'S (E: ENZIMA; ES: ÉSTER; AL: ÁLCOOL; AC: ÁCIDO, W: ÁGUA, F: ACIL ENZIMA, I = 1, 2, 3, ..., I; J = 1, 2, 3, ..., J). (PAIVA ET AL, 2000, CITADO POR GOMES ET AL, 2011).....	16
FIGURA 8: ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE LIGAÇÕES ÉSTER CATALISADA POR ESTERASES E LIPASES. ONDE T _D 1 E T _D 2 REPRESENTAM O PRIMEIRO E O SEGUNDO INTERMEDIÁRIOS TETRAÉDRICOS. (FIGURA MODIFICADA POR MANOEL ET AL 2013 A PARTIR DE BORNSCHEUER E KAZSLAUSKAS, 2006 E SIMAS ET AL, 2011).....	17
FIGURA 9: REPRESENTAÇÃO DO MONOESTEARATO DE GLICERILA, UM TENSOATIVO NÃO-IÔNICO, EVIDENCIANDO AS DUAS REGIÕES DE SOLUBILIDADES DISTINTAS.	18

FIGURA 10: ESTRUTURA QUÍMICA DO CLORETO DE DIESTEARILDIMÔNIO.....	20
FIGURA 11: EXEMPLOS DE SURFACTANTES ANIÔNICOS. ESTRUTURAS QUÍMICAS DO 1- TRIETANOLAMINA; 2- LAURIL ÉTER SULFATO DE SÓDIO.	21
FIGURA 12: ESTRUTURA QUÍMICA DA COCOAMIDO PROPILBETAÍNA.	21
FIGURA 13: ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ISÔMEROS DE MONOACILGLICERÓIS. ADAPTADA DE MAO ET AL, 2013.	24
FIGURA 14: PRINCIPAIS AGENTES UTILIZADOS PARA A ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÕES ALIMENTÍCIAS. ADAPTADO DE SINGH ET AL, 2009.	25
FIGURA 15: REAÇÕES DE GLICERÓLISE. ADAPTADO DE MARTINEZ ET AL, 2005.	27
FIGURA 16: ESTRUTURA QUÍMICA DO MONOESTEARATO DE GLICERILA.....	33
FIGURA 17: ESTRUTURA DAS MICROEMULSÕES. CORREA ET AL, 2005.....	36
FIGURA 18: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA MICELA REVERSA. FONTE FERNANDES ET AL, 2004.....	37
FIGURA 19: ESTRUTURA QUÍMICA DO BIS (2-ETILHEXIL)SULFOSUCCINATO DE SÓDIO (AOT)...	39
FIGURA 20: DIAGRAMA DE FASES DO SISTEMA MICELAR EM AOT/ISOOCTANO/ÁGUA. ADAPTADO DE TAPAS E MAITRA, 1995).....	40
FIGURA 21: POSSÍVEIS LOCALIZAÇÕES DE UMA ENZIMA EM MICELAS REVERSAS. (A) ENZIMA SOLÚVEL EM ÁGUA; (B) ENZIMA ATIVA NA SUPERFÍCIE; (C) ENZIMA ANCORADA NA MEMBRANA. (1) CABEÇA POLAR DO SURFACTANTE; (2) CAUDA APOLAR DO SURFACTANTE; (3) MOLÉCULA DE ÁGUA OU CONTRA-IONS E (4) ENZIMA. ADAPTADO DE CARLSON & NAGARAJAN, 1992.	45
FIGURA 22: FATORES QUE INFLUENCIAM O DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS CATALÍTICOS COM O USO DE BIOCATALISADORES IMOBILIZADOS.	49
FIGURA 23: DESIGNAÇÕES DE REATORES DE FLUXO CONTÍNUO DE ACORDO COM O VOLUME OPERACIONAL (SOUZA E MIRANDA, 2013).....	50
FIGURA 24: DIREÇÃO DA REAÇÃO EM UM REATOR DE FLUXO CONTÍNUO (ADAPTADO DE SOUZA E MIRANDA, 2013).	51
FIGURA 25: REATORES DE LEITO FIXO (A) E REATOR DE LEITO FLUIDIZADO (B).	51
FIGURA 26: ENSAIO DE LOWRY-TINSLEY ANTES E DEPOIS DA REAÇÃO. A) ENSAIO EM BRANCO, COM N-HEPTANO; B) SOLUÇÃO INICIAL DE AE E IPG; C) REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO, EVIDENCIANDO A REDUÇÃO DE INTENSIDADE DO COMPLEXO FORMADO NA FASE SUPERIOR.	58

FIGURA 27: CURVAS-PADRÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS UTILIZADOS COMO REAGENTES DE PARTIDA. A: CURVA-PADRÃO DO AE; B: CURVA-PADRÃO DO RAG.	59
FIGURA 28: REATOR DE LEITO FIXO X-CUBE (THALES NANO). FONTE: HTTP://WWW.THALESNANO.COM/PRODUCTS/X-CUBE	66
FIGURA 29: SISTEMA ASIA DE FLUXO CONTINUO.....	68
FIGURA 30: CROMATOGRAMAS DOS REAGENTES DE PARTIDA. A – AE PURÍSSIMO, MARCA VETEC®; B- IPG, MARCA FLUKA®; C- AE 99,5% SIGMA ALDRICH®.	76
FIGURA 31: REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO AE E O IPG, REALIZADA A 60°C, 250RPM E RAZÃO MOLAR AE:IPG 1:2, E VOLUME REACIONAL DE 1ML.	78
FIGURA 32: INVESTIGAÇÃO INICIAL DE LIPASES NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO AE COM O IPG. A- RESULTADOS OBTIDOS PELAS LIPASES EM SUAS FORMAS LIVRES; B- RESULTADOS OBTIDOS PELAS LIPASES IMOBILIZADAS. CONDIÇÕES: AE (75MM) E IPG (150MM) 2:1 EM N- HEPTANO, 250 RPM, 60°C, LIPASES 1% P/P OU P/V.....	79
FIGURA 33: CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DO MEP EM N-HEPTANO. A- CINÉTICA DA LIPASE RM IM; B- CINÉTICA DA LIPASE TL IM. CONDIÇÕES: AE (75MM) E IPG (150MM) 2:1 EM N-HEPTANO, 150 RPM, 60°C, LIPASES 1% OU P/V.....	80
FIGURA 34: FIGURA 33: RESULTADO EXPERIMENTAL DA CINÉTICA DE REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO MEP EM DIFERENTES SOLVENTES. A- RESULTADOS OBTIDOS COM A ENZIMA RM IM; B- RESULTADOS OBTIDOS COM A ENZIMA TL IM. CONDIÇÕES: AE:IPG 1:2, 60°C, 250 RPM.	82
FIGURA 35: TEMPO DE REAÇÃO PARA A INTERESTERIFICAÇÃO DO IPG E O ESTEARATO DE ETILA EM DIFERENTES SOLVENTES. 1- N-HEPTANO; 2- N-DODECANO; 3- N-HEXANO; 4 – CLOROFÓRMIO; 5 – DIMETILFORMAMIDA. FONTE: HESS ET AL, 1995	85
FIGURA 36: EFEITO DA RAZÃO MOLAR SOBRE A CONVERSÃO DE MONOESTEARATO DE IPG À TEMPERATURA DE 60°C, CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA DE 1% (P/V) E AGITAÇÃO DE 250 RPM.	86
FIGURA 37: GRÁFICO DE PARETO DO DCCR EVIDENCIANDO A SIGNIFICÂNCIA DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO. T, TEMPERATURA, S, CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO, L, EFEITO LINEAR, Q, EFEITO QUADRÁTICO.	92
FIGURA 38: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E CURVAS DE CONTORNO (B) PARA A FORMAÇÃO DE MEP CATALISADA PELA ENZIMA LIPOZYME RM IM, EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO.	94
FIGURA 39: RECICLOS POSSÍVEL PARA A ENZIMA RM IM NA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO MEP E AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNAS LIXIVIADAS PARA O MEIO REACIONAL EM CADA	

CICLO. CONDIÇÕES: AE:IPG 1:1 (53,6MM), 58,5°C, 225RPM. QUANTIDADE DE PROTEÍNAS DOSEADA PELO MÉTODO DE BRADFORD (1976).....	95
FIGURA 40: MEV DA ENZIMA LIPOZYME RM IM ANTES DA REAÇÃO. AUMENTO DE 200X.	96
FIGURA 41: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE AMOSTRAS DA ENZIMA LIPOZYME RM IM. A – LIPASE RM IM ANTES DAS REAÇÕES; B- LIPASE RM IM APÓS AS REAÇÕES DE RECICLO. AUMENTO DE 1000X.	97
FIGURA 42: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA ENZIMA IMOBILIZADA RM IM – AUMENTO DE 2000X, EVIDENCIANDO O EFEITO DE CISLHAMENTO DA AGITAÇÃO.....	98
FIGURA 43: REATOR EASY MAX, METTER TOLEDO. 1) REATOR JAQUETADO; 2- AGITADOR; 3- SENSOR DE PH.	99
FIGURA 44: MONITORAMENTO DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DA MEP CATALISADA PELA ENZIMA RM IM EM REATOR EASY-MAX E AVALIAÇÃO DE RECICLOS E LIXIVIAÇÃO DE PROTEÍNAS. PARA O MEIO REACIONAL EM CADA CICLO. CONDIÇÕES: AE:IPG 1:1 (53,6MM), 58,5°C, 225RPM. QUANTIDADE DE PROTEÍNAS DOSEADA PELO MÉTODO DE BRADFORD (1976).....	99
FIGURA 45: ATIVIDADE RESIDUAL DO SOBRENADANTE DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DE TRITON X-100 UTILIZADA NA DESSORÇÃO DA LIPASE RM IM DE SEU SUPORTE, SEGUNDO A METODOLOGIA DESCRITA POR CABRERA ET AL, 2008.	102
FIGURA 46: REATOR DE LEITO FIXO UTILIZADO NA ETAPA INICIAL DE INVESTIGAÇÃO DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DA MEP CATALISADA PELA LIPASE RM IM. CONDIÇÕES: AE/IPG 1:1 (35MM) EM N-HEPTANO, 60°C	104
FIGURA 47: SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A REAÇÃO DE FORMAÇÃO DA MEP CATALISADA PELA LIPASE RM IM EM CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO, EM FUNÇÃO DO FLUXO E CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO	109
FIGURA 48: EXEMPLO DE COLUNA DE LEITO FIXO DO REATOR X-CUBE (THALES NANO). FONTE: HTTP://WWW.THALSNANO.COM/PRODUCTS/CATCART ACESSO: MARÇO 2013.	113
FIGURA 49: EQUIPAMENTO PARA REAÇÃO EM FLUXO CONTÍNUO (ASIA – SYRRIS); (A) BOMBA PERISTÁLTICA DE VAZÃO; (B) AQUECEDOR COM TERMOSTATO; (C) COLUNA CILÍNDRICA DE LEITO FIXO RECHEADA COM BIOCATALISADOR; (D) SUBSTRATOS; (E) SAÍDA DO PRODUTO REACIONAL.....	114
FIGURA 50: DECRÉSCIMO DAS CONVERSÕES DEMONSTRADAS PELA LIPASE RM NA FORMAÇÃO DA MEP DE ACORDO COM O FLUXO APLICADO.	116
FIGURA 51: ANÁLISE DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DA MEP EM CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO, EM TEMPO DE RESIDÊNCIA DE 48 MIN (0,05ML/MIN).	117

FIGURA 52: RECICLOS POSSÍVEIS E QUANTIDADE DE PROTEÍNAS PRESENTE NO SOBRENADANTE NA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE MEP EM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATOS SOB CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO. AE:IPG 1:1 (2,5M), 60°C E FLUXO DE 0,1 ML/MIN.....	118
FIGURA 53: ANÁLISE POR CG-MS DO RESÍDUO DE ÁCIDOS GRAXOS DE PALMA ORIUNDO DO REFINO DE PETRÓLEO (RAG).	120
FIGURA 54: SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA AS REAÇÕES DE FORMAÇÃO DO MRAG EM BATELADA CATALISADAS PELAS LIPASES RMIM (A) E TL IM (B), E PARA A REAÇÃO CATALISADA PELA LIPASE RM IM (C) EM FLUXO CONTINUO.	127
FIGURA 55: ESQUEMA DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO MRAG EM CONDIÇÕES DE FLUXO CONTINUO EM SISTEMA ASIA. RAG:IPG 1:1 (100MM), 60°C, 420MG DE RM IM, COLUNA DE 2,4ML.	129
FIGURA 56: RECICLOS POSSÍVEIS E ANÁLISE DE PROTEÍNAS NAS ALÍQUOTAS RECOLHIDAS NA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO MRAG EM CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO. CONDIÇÕES: IPG E RAG 1:1 (1,5MOL/L EM N-HEPTANO), 60°C, 0,1ML/MIN.	131
FIGURA 57: ESQUEMA DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE MEP E MRAG EM CONDIÇÕES LIVRES DE SOLVENTES.....	132
FIGURA 58: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA RM IM SOBRE A CONVERSAO DO MEP, A RAZÃO MOLAR DE AE: IPG 1:1, TEMPERATURA DE 58,5°C, AGITAÇÃO DE 250 RPM, EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES.	133
FIGURA 59: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA RM IM SOBRE A CONVERSAO MRAG, A RAZÃO MOLAR DE RAG: IPG 1:1, TEMPERATURA DE 58,5°C, AGITAÇÃO DE 250 RPM, EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES.	133
FIGURA 60: ETAPAS ESTUDADAS PARA A SÍNTESE DE MAGS.	137
FIGURA 61: POSSÍVEIS ACETAIS FORMADOS NA REAÇÃO DE CONDENSAÇÃO DO GLICEROL COM A ACETONA (ADAPTADO DE KHAYOON & HAMEED, 2013).....	138
FIGURA 62: MECANISMO PROPOSTO PARA A ACETALIZAÇÃO DO GLICEROL. DA SILVA ET AL, 2009.....	139
FIGURA 63: ESQUEMA DA REAÇÃO INICIAL DE ACETALIZAÇÃO DO GLICEROL EM CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO. CONDIÇÕES: RAZÃO MOLAR ACETONA:GLICEROL 6:1, 55°C, COLUNA DE LEITO FIXO DE 5,5ML (580MG DE SGF).	140
FIGURA 64: ACETALIZAÇÃO DO GLICEROL EM ACETONA EM FLUXO CONTÍNUO CATALISADA POR SGFS: FLUXO DE 0,1ML/MIN; 55°C; RAZÃO MOLAR ACETONA/GLICEROL 6:1.	140

FIGURA 65: CROMATOGRAMAS DAS REAÇÕES DE ACETALIZAÇÃO DO GLICEROL EM REATOR DE LEITO FIXO, EM FLUXOS DE 0,1;0,2 E 0,5ML/MIN. RAZÃO MOLAR ACETONA/GLICEROL 6:1, TEMPERATURA DE 55°C.	142
FIGURA 66: ESQUEM DA REAÇÃO DE DESPROTEÇÃO DO MEP.....	144
FIGURA 67: POSSÍVEIS SUBPRODUTOS FORMADOS NA CATÁLISE ÁCIDA DE DESPROTEÇÃO DO MEP. 1- MEP;1-MONOESTEARATO DE GLICERILA; 3-GLICEROL E 4- AE.	144
FIGURA 68: CROMATOGRAMAS DAS REAÇÕES DE QUEBRA DO ACETAL MEP EM DIFERENTES FLUXOS, EVIDENCIANDO A SELETIVIDADE PARA A FORMAÇÃO DOS PRODUTOS POSSÍVEIS. CONDIÇÕES: 55°C, 2,0MOL/L (N-HEPTANO) DE MAG PROTEGIDO.....	146
FIGURA 69: ESQUEMA DA REAÇÃO EM CASCATA PARA A FORMAÇÃO DE MONOESTEARATO DE GLICERILA, EVIDENCIANDO O ACOPLAMENTO DE TODAS AS ETAPAS ENVOLVIDAS. 1 – SUSPENSÃO ACETONA/GLICEROL; 2 – COLUNA DE LEITO FIXO CONTENDO SGF PARA A ACETALIZAÇÃO DO GL; 3 – CONEXÃO PARA A RETIRADA DE PRODUTOS DA PRIMEIRA ETAPA; 4 – IPG E EM N-HEPTANO; 5 – COLUNA DE LEITO CONTENDO A LIPASE RM IM PARA A ESTERIFICAÇÃO DE IPG COM AE; 6 – COLUNA DE LEITO FIXO CONTENDO SGF PARA A QUEBRA DOS ACETAIS DO MEP; 7 – MONOEST EM N-HEPTANO, EVIDENCIANDO SUA PRECIPITAÇÃO APÓS O RESFRIAMENTO.	147
FIGURA 70: SOLUÇÃO CONTENDO O PRODUTO FINAL DA REAÇÃO EM CASCATA PARA A FORMAÇÃO DA MONOESTEARINA SOB CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO. 1 - MONOESTEARINA RECÉM-RECOLHIDA A 60°C, 2- INÍCIO DA PRECIPITAÇÃO DO PRODUTO A 40°C; 3- DECANTAÇÃO DO PRODUTO EM N-HEPTANO.....	148
FIGURA 71: MUDANÇAS FÍSICAS OBSERVADAS NOS MONOACILGLICEROIS SINTETIZADOS, ANTES E DEPOIS DAS REREAÇÕES DE CLIVAGEM DOS ACETAIS: 1 – MEP; 2-MRAG; 3- MONOEST; 4- MONORES	148
FIGURA 72: FILTRAÇÃO A VÁCUO DA REAÇÃO FINAL DE FORMAÇÃO DO MRAG OBTIDA ATRAVÉS DE REAÇÃO EM CASCATA SOB CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO, EVIDENCIANDO A MUDANÇA DE COLORAÇÃO DO PRODUTO FINAL (MONORES), NA PARTE SUPERIOR DO FUNIL DE BUCHNER.....	149
FIGURA 73: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO MEP, FEITO SOB A TÉCNICA DE FILME. REGIÃO 1: AUSÊNCIA DE BANDAS DEMONSTRANDO DEFORMAÇÕES AXIAIS DE O-H DE ÁLCOOL; REGIÃO 2: BANDAS REFERENTES A DEFORMAÇÃO AXIAL DE LIGAÇÃO C-H DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS; REGIÃO 3: BANDA REFERENTE A DEFORMAÇÃO AXIAL DE LIGAÇÃO C=O DE CARBONILA DE ÉSTER.	150

- FIGURA 74:** ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA ME, FEITO SOB A TÉCNICA DE FILME. REGIÃO 1: BANDAS REFERENTES A DEFORMAÇÃO AXIAL DA LIGAÇÃO O-H DE ÁLCOOL; REGIÃO 2: BANDAS REFERENTES A DEFORMAÇÃO AXIAL DE LIGAÇÃO C-H DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS; REGIÃO 3: BANDA REFERENTE A DEFORMAÇÃO AXIAL DE LIGAÇÃO C=O DE CARBONILA DE ÉSTER. **151**
- FIGURA 75:** ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA □-MONOESTEARINA, PRODUZIDO EM PASTILHA DE KBR. REGIÃO 1: BANDAS REFERENTES A DEFORMAÇÃO AXIAL DA LIGAÇÃO O-H DE ÁLCOOL; REGIÃO 2: BANDAS REFERENTES A DEFORMAÇÃO AXIAL DE LIGAÇÃO C-H DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS; REGIÃO 3: BANDA REFERENTE A DEFORMAÇÃO AXIAL DE LIGAÇÃO C=O DE CARBONILA DE ÉSTER. FONTE: SBDS - [HTTP://RIODB01.IBASE.AIST.GO.JP/SDBS/CGI-BIN/DIRECT_FRAME_TOP.CGI](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)..... **152**
- FIGURA 76:** ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO PRODUTO MRAG. REGIÃO 1: PEQUENA BANDA REFERENTE A DEFORMAÇÃO AXIAL DA LIGAÇÃO O-H DE ÁCIDO CARBOXÍLICO; REGIÃO 2: BANDAS REFERENTES A DEFORMAÇÃO AXIAL DE LIGAÇÃO C-H DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS; REGIÃO 3: BANDA REFERENTE A DEFORMAÇÃO AXIAL DE LIGAÇÃO C=O DE CARBONILA DE ÉSTER. **153**
- FIGURA 77:** ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO PRODUTO MONORES. REGIÃO 1: BANDA REFERENTE A DEFORMAÇÃO AXIAL DA LIGAÇÃO O-H DE ÁLCOOL; REGIÃO 2: BANDAS REFERENTES A DEFORMAÇÃO AXIAL DE LIGAÇÃO C-H DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS; REGIÃO 3: BANDA REFERENTE A DEFORMAÇÃO AXIAL DE LIGAÇÃO C=O DE CARBONILA DE ÉSTER. **154**
- FIGURA 78:** ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA MONOOLEÍNA, FEITO EM PASTILHA DE KBR. REGIÃO 1: BANDA REFERENTE A DEFORMAÇÃO AXIAL DA LIGAÇÃO O-H DE ÁLCOOL; REGIÃO 2: BANDAS REFERENTES A DEFORMAÇÃO AXIAL DE LIGAÇÃO C-H DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS; REGIÃO 3: BANDA REFERENTE A DEFORMAÇÃO AXIAL DE LIGAÇÃO C=O DE CARBONILA DE ÉSTER. FONTE: SBDS - [HTTP://RIODB01.IBASE.AIST.GO.JP/SDBS/CGI-BIN/DIRECT_FRAME_TOP.CGI](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)..... **155**
- FIGURA 79:** ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA MONOPALMITINA, FEITO EM PASTILHA DE KBR. REGIÃO 1: BANDA REFERENTE A DEFORMAÇÃO AXIAL DA LIGAÇÃO O-H DE ÁLCOOL; REGIÃO 2: BANDAS REFERENTES A DEFORMAÇÃO AXIAL DE LIGAÇÃO C-H DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS; REGIÃO 3: BANDA REFERENTE A DEFORMAÇÃO AXIAL DE LIGAÇÃO C=O DE CARBONILA DE ÉSTER. FONTE: SBDS - [HTTP://RIODB01.IBASE.AIST.GO.JP/SDBS/CGI-BIN/DIRECT_FRAME_TOP.CGI](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)..... **155**

FIGURA 80: RASTREAMENTO INICIAL DA MELHOR MICROEMULSÃO PARA A SÍNTESE DE MEP. A) MICROEMULSÕES EM LECITINA; B) MICROEMULSÕES EM AOT; C) REAÇÃO COM ENZIMAS IMOBILIZADAS. CONDIÇÕES: 0,9MG DE LIPASE; AE E IPG 1:1 (100MM), 40°C.....	159
FIGURA 81: PRODUTIVIDADE GERADA PELOS SISTEMAS REACIONAIS ESTUDADOS. CONDIÇÕES: 40°C, AE E IPG 1:1 (100MM), 0,9MG DE ENZIMA NAS MICROEMULSÕES E 1% P/V DE SUPORTE COM AS ENZIMAS IMOBILIZADAS.	160
FIGURA 82: PERFIL REACIONAL DA MICROEMULSÃO AOT CAL. CONDIÇÕES: AOT/ISO-OCTANO 0,1M, CONTENDO AE:IPG 1:1 (100MM), 40°C, 0,9MG DE LIPASE CAL B.	161
FIGURA 83: EFEITO DA TEMPERATURA NA CONVERSÃO DEMONSTRADA PELA MICROEMULSÃO AOT/ISO-OCTANO CONTENDO A LIPASE CAL B PARA A FORMAÇÃO DE MEP. CONDIÇÕES: AOT/ISO-OCTANO 1:1 (100MM), 0,9MG DE LIPASE.	162
FIGURA 84: EFEITO DA QUANTIDADE DE ÁGUA NAS TAXAS INICIAIS DE REAÇÃO PARA A FORMAÇÃO DE MEP CATALISADA PELA ENZIMA CAL B ESTRUTURADA EM MICROEMULSÃO AOT/ISO-OCTANO. CONDIÇÕES: AOT/ISO-OCTANO 1:1 (100MM), 0,9MG DE LIPASE, 40°C	163
FIGURA 85: EFEITO DA QUANTIDADE DE ÁGUA (W ₀) NA CONVERSÃO APRESENTADA POR DIVERSAS ENZIMAS NA ESTERIFICAÇÃO DO N-HEXANOL COM O ÁCIDO OLEICO EM SISTEMAS AOT/ISO-OCTANO. ADAPTADO DE STAMATIS ET AL, 1999.	164
FIGURA 86: EFEITO DA QUANTIDADE DE ENZIMA NA VELOCIDADE INICIAL DE FORMAÇÃO DE MEP, CATALISADA PELA LIPASE CAL B EM MICROEMULSÃO AOT/ISO-OCTANO, A 40°C, COM AE E IPG 1:1 (100MM).....	165
FIGURA 87: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AE NA VELOCIDADE INICIAL DE REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO AE COM O IPG EM MICROEMULSÕES AOT/ISO-OCTANO. CONCENTRAÇÕES DE IPG: 40 MM (□); 60 MM (◇); 80 MM (Δ); 100 MM (○); 150 MM (×). .	166
FIGURA 88: GRÁFICOS DE DUPLOS RECÍPROCOS DA VELOCIDADE INICIAL DE ESTERIFICAÇÃO DO IPG COM O AE EM MICROEMULSÃO EM AOT: (A) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IPG, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FIXAS DE AE: 25 MM (□), 35 MM (◇), 50 MM (Δ), 80 MM (○), 100 MM (×) E 120 M MM (+); (B) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FIXAS DE IPG: 40 MM (□); 60 MM (◇); 80 MM (Δ); 100 MM (○); 150 MM (×). AS LINHAS DE TENDÊNCIA TRACEJADAS FORAM DESENHADAS PARA AS MENORES CONCENTRAÇÕES DE AE.	167

FIGURA 89: REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DE ESTERIFICAÇÃO BI-BI ORDENADO COM INIBIÇÃO “DEAD-END” PELO AE, NA FORMAÇÃO DE MEP CATALISADA PELA ENZIMA CAL B EM MICROEMULSÃO AOT.....	168
FIGURA 90: A) PLOTAGEM DO DECLIVE 1/[IPG] (CALCULADO A PARTIR DA FIGURA 88) CONTRA O INVERSO DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES BAIXAS DE AE, ONDE ESTE ATUA PRINCIPALMENTE COMO SUBSTRATO; B) PLOTAGEM 1/[IPG] (CALCULADO A PARTIR DA FIGURA 59) CONTRA O INVERSO DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES ALTAS DE AE, ONDE ESTE ATUA PRINCIPALMENTE COMO INIBIDOR.....	169
FIGURA 91: RELAÇÃO ENTRE 1/VMAX CONTRA O INVERSO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO ESTEÁRICO, CALCULADOS A PARTIR DA FIGURA 90.	170
FIGURA 92: MATRIZ DE ORGANOGEL DE HPMC CONTENDO A MICROEMULSÃO AOT CAL IMOBILIZADA, EVIDENCIANDO O ASPECTO SEMISSÓLIDO OPACO.....	173
FIGURA 93: CONVERSÕES EM MEP DEMONSTRADAS PELOS DIFERENTES SOLVENTES TESTADOS NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO AE E IPG CATALISADA PELO SISTEMA AOT/CAL IMOBILIZADO EM ORGANOGEL (OG). AE/IPG 1:1 (100MM), 40°C.....	174
FIGURA 94: PERFIL REACIONAL PARA A REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE MEP CATALISADA PELO SISTEMA OG: AE E IPG 1:1 (100MM), 40°C.	175
FIGURA 95: ESQUEMA DA INVESTIGAÇÃO DO PERFIL REACIONAL PARA A FORMAÇÃO DE MEP CATALISADA PELO SISTEMA OG EM CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO.....	175
FIGURA 96: QUANTIDADE DE PROTEÍNAS LIXIVIADAS, EM MG/ML DAS ALÍQUOTAS DE MEIO REACIONAL RETIRADAS NA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE MEP, CATALISADA PELO SISTEMA OG EM CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO.	177
FIGURA 97: RECICLOS POSSÍVEIS E RELAÇÃO COM QUANTIDADE DE PROTEÍNAS LIXIVIADAS PARA A REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE MEP CATALISADA PELO SISTEMA OG EM FLUXO CONTÍNUO, A 0,5 ML/MIN, 45°C, AE E IPG 1:1 (500MM) EM N-HEPTANO.....	178
FIGURA A 1: CURVA DE CALIBRACAO DO ÁCIDO ESTEÁRICO	204
FIGURA A 2: CROMATOGRAMA DO ÁCIDO ESTEÁRICO, DENOTANDO TEMPO DE RETENÇÃO EM 15,76MIN.....	204
FIGURA A 3: CROMATOGRAMA DO IPG, DENOTANDO TEMPO DE RETENÇÃO EM 5,96 MINUTOS.	205
FIGURA A 4: CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE MEP EM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATOS SOB CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO. AE:IPG 1:1	

(2,5M), 60°C E FLUXO DE 0,1 ML/MIN, EVIDENCIANDO PEQUENAS QUANTIDADES DE AE E AUSÊNCIA DE IPG.....	205
FIGURA A 5: CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE MONOEST, ORIUNDA DA QUEBRA DO ACETAL PRESENTE NA MEP.	205
FIGURA A 6: CROMATOGRAMA DO RAG, DEMONSTRANDO A PRESENÇA DOS ÁCIDOS PALMÍTICO, ESTEÁRICO E OLEICO.....	206
FIGURA A 7: CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE MRAG, OBTIDO SOB CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO. CONDIÇÕES: IPG E RAG 1:1 (1,5MOL/L EM N-HEPTANO), 60°C, 0,1ML/MIN.....	206
FIGURA A 8: CROMATOGRAMA DE CG-FID DO INÍCIO DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE MRAG, CATALISADA PELO SISTEMA DE MICROEMULSÃO EM AOT/ISO-OCTANO CONTENDO A LIPASE CALB SOB CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO. CONDIÇÕES: IPG E RAG 1:1 (1,5MOL/L EM N-HEPTANO), 60°C, 0,1ML/MIN.....	206
FIGURA A 9: CROMATOGRAMA DO MELHOR RESULTADO OBTIDO EM MICROEMULSÕES AOT/ISO-OCTANO.....	207
FIGURA C 1: ESPECTRO DE 1H-RMN DA MONOEST.....	221
FIGURA C 2: ESPECTRO DE 13C-RMN DA MONOEST.....	222
FIGURA C 3: ESPECTRO DE APT DA MONOEST	223
FIGURA C 4: ESPECTRO DE COSY DA MONOEST	224
FIGURA C 5: ESPECTRO DE HSQC DA MONOEST	225
FIGURA C 6: ESPECTRO DE HMBC PARA A MONOEST	226

Índice de Tabelas

TABELA 1: REGIOSSELETIVIDADE DE ALGUMAS LIPASES MICROBIANAS.	13
TABELA 2: RELAÇÃO DOS SETORES, TIPOS DE APLICAÇÃO E PRODUTOS OBTIDOS COM A UTILIZAÇÃO DE LIPASES.	14
TABELA 3: FAIXAS DE EHL DE ALGUMAS CLASSES DE TENSOATIVOS	22
TABELA 4: VALORES DE EHL PARA ALGUNS EMULSIFICANTES EMPREGADOS EM PANIFICAÇÃO. ADAPTADO DE MANZOCO ET AL, 2012.	23
TABELA 5: METODOLOGIA DE CG-MS UTILIZADA NA ANÁLISE DOS PERFIS REACIONAIS E REAGENTES.	57
TABELA 6: PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO PROPOSTO PARA AS LIPASES RM IM E TL IM COM VALORES REAIS E CODIFICADOS (+ NÍVEL SUPERIOR, 0 INTERMEDIÁRIO, - NÍVEL INFERIOR) PARA AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES.	63
TABELA 7: VALORES REAIS E CODIFICADOS (+NÍVEL SUPERIOR, 0 INTERMEDIÁRIO, - NÍVEL INFERIOR) PARA AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES, 22	63
TABELA 8: VALORES REAIS E CODIFICADOS (+ ALTO NÍVEL, 0 INTERMEDIÁRIO, -BAIXO NÍVEL) PARA AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES, 2^{3-1}	67
TABELA 9: VALORES REAIS E CODIFICADOS PARA AS VARIÁVEIS ANALISADAS (+ NÍVEL SUPERIOR, 0 INTERMEDIÁRIO – NÍVEL INFERIOR) NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO ENTRE IPG E RAG CATALISADA PELA LIPASE RM IM SOB CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO.	68
TABELA 10: TABELA 6: RAMPA DE AQUECIMENTO UTILIZADA NA CONFIRMAÇÃO DE.....	72
TABELA 11: ENSAIO DE SOLUBILIDADE DO AE E O DO IPG.....	77
TABELA 12: RESULTADOS EXPERIMENTAIS DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO E ATIVIDADE RESIDUAL NAS REAÇÕES DE DETERMINAÇÃO DA TEMPO REACIONAL DE SÍNTESE ENZIMÁTICA DO MONOESTEARATO DE IPG UTILIZANDO AS ENZIMAS LIPOZYME RM IM E LIPOZYME TL IM, EM N-HEPTANO.	81
TABELA 13: VELOCIDADE INICIAL DE REAÇÃO, ATIVIDADE RESIDUAL E VALORES DE LOG P DOS SOLVENTES ORGÂNICOS UTILIZADOS NA SÍNTESE DO MEP CATALISADA PELAS LIPASES RM IM E TL IM.....	83
TABELA 14: VELOCIDADE INICIAL DE REAÇÃO, ATIVIDADE RESIDUAL E VALORES DE LOG P DOS SOLVENTES ORGÂNICOS UTILIZADOS NA TRANSFERIFICAÇÃO DO IPG E O ESTEARATO DE ETILA PARA A SÍNTESE DO DE MONOESTEARATO DE IPG, CATALISADA PELA LIPASE DE <i>PSEUDOMONAS CEPACEAE</i> . ADAPTADO DE HESS ET AL, 1995.)	85

TABELA 15: VELOCIDADE INICIAL DE REAÇÃO EM FUNÇÃO DA RAZÃO MOLAR DE SUBSTRATOS NA CINPÉTICA DE FORMAÇÃO DA MEP EM N-HEPTANO, UTILIZANDO AS ENZIMAS RM IM E TL IM.	87
TABELA 16: RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL COMPLETO OBTIDO PARA APRESENTADOS PELAS ENZIMAS ESTUDADAS.	88
TABELA 17: EFEITOS ESTIMADOS PARA CADA ENZIMA ESTUDADA NO FFD 2^{4-1}	89
TABELA 18: PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO E RESULTADOS OBTIDOS COM A LIPASE RM IM PARA A SÍNTESE DE MEP	91
TABELA 19: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VALIDAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS (ANOVA)*	93
TABELA 20: RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS OBTIDAS POR DIFERENTES MÉTODOS.....	102
TABELA 21: QUANTIDADE DE ENZIMA IMOBILIZADA DE ACORDO COM O SUPORTE UTILIZADO. ADAPTADO DE CABRERA ET AL, 2008.	103
TABELA 22: INVESTIGAÇÃO INICIAL DA FORMAÇÃO DA MEP CATALISADA PELA LIPASE RM IM, EM N-HEPTANO A 60°C E RAZÃO MOLAR 1:1 (35MM) DE AE E IPG.	104
TABELA 23: MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO EXPERIMENTAL 2^{3-1} COM VALORES CODIFICADOS E REAIS PARA A SÍNTESE DA MEP CATALISADA PELA ENZIMA RM IM EM CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO.....	105
TABELA 24: EFEITO ESTIMADO DOS PARÂMETROS DO PLANEJAMENTO 23-1 PARA A ENZIMA ESTUDADA.....	106
TABELA 25: PLANEJAMENTO FATORIAL EXPERIMENTAL 2^2 COMPLETO COM VALORES CODIFICADOS.....	107
TABELA 26 : EFEITOS ESTIMADOS DOS PARÂMETROS UTILIZADOS NO DCCR 22 ESTUDADO. .	108
TABELA 27: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VALIDAÇÃO DOS MODELS MATEMÁTICOS (ANOVA)*	110
TABELA 28: ESTERIFICAÇÃO DE DIVERSOS ÁCIDOS GRAXOS COM IPG EM FLUXO CONTÍNUO. .	111
TABELA 29: EFEITOS DE OUTRAS LIPASES COMERCIAIS NA ESTERIFICAÇÃO DO AE E IPG EM FLUXO CONTÍNUO.....	111
TABELA 30: CONVERSÕES EM MONOESTEARATO DE IPG DEMONSTRADAS PELA LIPOZYME RM IM EM CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO DE ACORDO COM O TEMPO DE RESIDÊNCIA DOS SUBSTRATOS. CONDIÇÕES: 60°C, AE E IPG 1:1 (87,5MM), COLUNA DE LEITO FIXO DE 2,41ML E 420MG DE LIPASE.	114

TABELA 31: AUMENTO DE CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATOS PARA A SÍNTESE DA MEP EM CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO. CONDIÇÕES: 60°C/AE E IPG 1:1 EM N-HEPTANO, REATOR DE VOLUME FINAL DE 2,41ML, 420MG DE RM IM.	115
TABELA 32: RESULTADOS DO CCD PARA A REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO ENTRE O IPG E O RAG, CATALISADA PELAS LIPASES RM IM E TL IM, EM CONDIÇÕES DE BATELADA. IPG E RAG 1:1 (100MM), 60°C, 250 RPM DE AGITAÇÃO, 1% DE CATALISADOR (P/V).	121
TABELA 33: EFEITOS ESTIMADOS DOS PARÂMETROS ETUDADOS NO CCD.	122
TABELA 34: RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² PARA A FORMAÇÃO DO MRAG CATALISADA PELA LIPASE RM IM SOB CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO.	124
TABELA 35: EFEITOS ESTIMADOS DOS PARÂMETROS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2 ² PARA A REAÇÃO DE GFORMAÇÃO DO MRAG PELA LIPASE RM IM SOB CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO.	125
TABELA 36: RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² PARA A ESTERIFICAÇÃO DO RAG E O IPG CATALISADA PELA LIPASE CAL A SOB CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO.	127
TABELA 37: RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ² PARA A ESTERIFICAÇÃO DO RAG E O IPG CATALISADA PELA LIPASE CAL C SOB CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO.	128
TABELA 38: CONVERSÕES APRESENTADAS PELA ENZIMA RM IM NA FORMAÇÃO DO MRAG EM CONDIÇÕES DE FLUXO CONTINUO, DE ACORDO COM O TEMPO DE RESIDÊNCIA.....	130
TABELA 39: CONVERSÕES APRESENTADAS PELA ENZIMA RM IM NA FORMAÇÃO DO MRAG EM CONDIÇÕES DE FLUXO CONTINUO, DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATOS (RAG E IPG 1:1), EM FLUXO DE 0,1ML/MIN.....	130
TABELA 40: VELOCIDADES INICIAIS CALCULADAS PARA AS CINÉTICAS DE FORMAÇÃO DE MEP E MRAG DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA, E ÁCIDO COMO MATERIAL DE PARTIDA.	135
TABELA 41: RESULTADOS DE CONVERSÃO EM IPG DE ACORDO COM O TEMPO DE RESIDÊNCIA. RAZÃO MOLAR ACETONA, GLICEROL 6:1; 55°C.	141
TABELA 42: RESULTADOS DA INVESTIGAÇÃO DE DIFERENTES TEMPERATURAS E RAZÕES MOLARES ACETONA:GLICEROL NA REAÇÃO DE ACETALIZAÇÃO DO GLICEROL EM COLUNA DE LEITO FIXO. CONDIÇÕES: 55°C, COLUNA DE 5,5ML (480MG DE SGF), FLUXO DE 0,2ML/MIN (28MINUTOS).....	143

TABELA 43: SELETIVIDADE PARA OS PRODUTOS POSSÍVEIS DA DESPROTEÇÃO DOS ACETAIS DO MONOESTEARATO DE IPG.	145
TABELA 44: VALORES DAS CONSTANTES CINÉTICAS DETERMINADAS PELOS DADOS EXPERIMENTAIS. A E B REPRESENTAM OS SUBSTRATOS IPG E AE, RESPECTIVAMENTE. ..	171
TABELA 45: INVESTIGAÇÃO INICIAL DA SÍNTESE DE MEP CATALISADA PELO SISTEMA OG EM CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO. AE: IPG 1:1 (100MM, N-HEPTANO), 1,2MG DE LIPASE CAL B.....	176
TABELA 46: RESULTADO DO AUMENTO DE CONCENTRAÇÃO DE REAGENTES PARA A FORMAÇÃO DE MEP CATALISADA PELO SISTEMA OG SOB CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO, A 0,5ML/MIN (11 MINUTOS), 45°C.....	178
TABELA 47 : COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS EM CASA ROTA BIOTECNOLÓGICA ESTUDADA.....	180
TABELA B 1: RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA INVESTIGAÇÃO INICIAL DE LIPASES NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO AE COM O IPG COM ENZIMAS LIVRES. CONDIÇÕES: AE (75MM) E IPG (150MM) 2:1 EM N-HEPTANO, 250 RPM, 60°C, LIPASES 1% P/P OU P/V.....	208
TABELA B 2: RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA INVESTIGAÇÃO INICIAL DE LIPASES NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO AE COM O IPG COM ENZIMAS IMOBILIZADAS. CONDIÇÕES: AE (75MM) E IPG (150MM) 2:1 EM N-HEPTANO, 250 RPM, 60°C, LIPASES 1% P/P.	208
TABELA B 3: RESULTADOS OBTIDOS PARA A CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DO MEP EM N-HEPTANO, CATALISADA PELAS LIPASES RM IM E TL IM. CONDIÇÕES: AE (75MM) E IPG (150MM) 2:1 EM N-HEPTANO, 250 RPM, 60°C, LIPASES 1% OU P/V.	209
TABELA B 4: RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS PARA A CINÉTICA DE REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO MEP CATALISADA PELA LIPASE RM IM EM DIVERSOS SOLVENTES. CONDIÇÕES: AE:IPG 1:2, 60°C, 250 RPM.	209
TABELA B 5: RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS PARA A CINÉTICA DE REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO MEP CATALISADA PELA LIPASE RM IM EM DIVERSOS SOLVENTES. CONDIÇÕES: AE:IPG 1:2, 60°C, 250 RPM.	210
TABELA B 6: EFEITO DA RAZÃO MOLAR SOBRE A CONVERSÃO DE MONOESTEARATO DE IPG, CATALISADA PELA LIPASE RM IM À TEMPERATURA DE 60°C, CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA DE 1% (P/V) E AGITAÇÃO DE 250 RPM.	210

TABELA B 7: EFEITO DA RAZÃO MOLAR SOBRE A CONVERSÃO DE MONOESTEARATO DE IPG, CATALISADA PELA LIPASE TL IM À TEMPERATURA DE 60°C, CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA DE 1% (P/V) E AGITAÇÃO DE 250 RPM.	211
TABELA B 8: RECICLOS POSSÍVEIS PARA A ENZIMA RM IM E CONVERSÕES OBTIDAS NA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO MEP, EM CONDIÇÕES DE BATELADA, COM AGITAÇÃO ORBITAL (EM SHAKER), JUNTAMENTE COM A AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNAS LIXIVIADAS PARA O MEIO REACIONAL EM CADA CICLO. CONDIÇÕES: AE:IPG 1:1 (53,6mM), 58,5°C, 225RPM. QUANTIDADE DE PROTEÍNAS DOSEADA PELO MÉTODO DE BRADFORD (1976)....	212
TABELA B 9: MONITORAMENTO DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DA MEP CATALISADA PELA ENZIMA RM IM EM REATOR (CSTR) EASY-MAX, METTLER TOLEDO. CONDIÇÕES: AE:IPG 1:1 (53,6mM), 58,5°C, 225RPM.	212
TABELA B 10: AVALIAÇÃO DE RECICLOS E LIXIVIAÇÃO DE PROTEÍNAS. PARA O MEIO REACIONAL EM CADA CICLO. CONDIÇÕES: AE:IPG 1:1 (53,6mM), 58,5°C, 225RPM. QUANTIDADE DE PROTEÍNAS DOSEADA PELO MÉTODO DE BRADFORD (1976).	213
TABELA B 11: RESULTADOS OBTIDOS PARA A ATIVIDADE RESIDUAL DO SOBRENADANTE, DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DE TRITON X-100 UTILIZADA NO ENSAIO DE DESSORÇÃO DA LIPASE RM IM DE SEU SUPORTE, SEGUNDO A METODOLOGIA DESCRITA POR CABRERA ET AL, 2008.....	213
TABELA B 12: RECICLOS POSSÍVEIS E QUANTIDADE DE PROTEÍNAS PRESENTE NO SOBRENADANTE NA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE MEP EM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATOS SOB CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO. AE:IPG 1:1 (2,5M), 60°C E FLUXO DE 0,1 mL/MIN.	214
TABELA B 13: RECICLOS POSSÍVEIS, CONVERSÕES OBTIDAS E ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NAS ALÍQUOTAS RECOLHIDAS NA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO MRAG EM CONDIÇÕES DE FLUXO CONTÍNUO, CATALISADA PELA LIPASE RM IM. CONDIÇÕES: IPG E RAG 1:1 (1,5MOL/L EM N-HEPTANO), 60°C, FLUXO DE 0,1ML/MIN.....	215
TABELA B 14: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA RM IM (P/V) SOBRE A CONVERSÃO DO MEP, A RAZÃO MOLAR DE AE: IPG 1:1, TEMPERATURA DE 58,5°C, AGITAÇÃO DE 250 RPM, EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES.....	215
TABELA B 15: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA RM IM SOBRE A CONVERSÃO MRAG, A RAZÃO MOLAR DE RAG: IPG 1:1, TEMPERATURA DE 58,5°C, AGITAÇÃO DE 250 RPM, EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES	216

TABELA B 16: RESULTADOS DAS CONVERSÕES OBTIDAS NO RASTREAMENTO INICIAL DAS MICROEMULSÕES EM AOT/ISO-OCTANO E EM LECITINA/ISOPROPRANOL, ASSIM COMO A COMPARAÇÃO COM ENZIMAS IMOBILIZADAS, PARA A SÍNTESE DE MEP. CONDIÇÕES: 0,9MG DE LIPASE (EM MICROEMULSÕES), 1% (P/V) COM ENZIMAS IMOBILIZADAS; AE E IPG 1:1 (100MM), 40°C.	216
TABELA B 17: CONVERSÕES DEMONSTRADAS NO ESTUDO DO PERFIL REACIONAL DA MICROEMULSÃO AOT CAL. CONDIÇÕES: AOT/ISO-OCTANO 0,1M, CONTENDO AE:IPG 1:1 (100MM), 40°C, 0,9MG DE LIPASE CAL B.....	217
TABELA B 18: RESULTADOS OBTIDOS NO ESTUDO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA CONVERSÃO DEMONSTRADA PELA MICROEMULSÃO AOT/ISO-OCTANO CONTENDO A LIPASE CAL B PARA A FORMAÇÃO DE MEP. CONDIÇÕES: AOT/ISO-OCTANO 1:1 (100MM), 0.9MG DE LIPASE.....	217
TABELA B 19: RESULTADOS OBTIDOS NO ESTUDO DO EFEITO DA QUANTIDADE DE ÁGUA NAS TAXAS INICIAIS DE REAÇÃO PARA A FORMAÇÃO DE MEP, CATALISADA PELA ENZIMA CAL B ESTRUTURADA EM MICROEMULSÃO AOT/ISO-OCTANO. CONDIÇÕES: AOT/ISO-OCTANO 1:1 (100MM), 0.9MG DE LIPASE, 40°C.	217
TABELA B 20: ESTUDO DO EFEITO DA DA QUANTIDADE DE ENZIMA NA VELOCIDADE INICIAL DE FORMAÇÃO DE MEP, CATALISADA PELA LIPASE CAL B EM MICROEMULSÃO AOT/ISO-OCTANO, A 40°C, COM AE E IPG1 1:1 (100MM).....	218
TABELA B 21: CONVERSÕES ENCONTRADAS NO ESTUDO DO PERFIL REACIONAL PARA A REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE MEP CATALISADA PELO SISTEMA EM OG: AE E IPG 1:1 (100MM), 40°C.	218
TABELA B 22: RECICLOS POSSÍVEIS E RELAÇÃO COM QUANTIDADE DE PROTEÍNAS LIXIVIADAS PARA A REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE MEP CATALISADA PELO SISTEMA OG EM FLUXO CONTÍNUO, A 0,5 ML/MIN, 45°C, AE E IPG 1:1 (500MM) EM N-HEPTANO.	218

CAPÍTULO 1

Introdução e Objetivos

1.1 - Contextualização

A Química moderna mundial tem voltado seus olhares para o desenvolvimento de processos químicos sustentáveis. Os Doze Princípios da Química Verde refletem a necessidade de medidas definitivas no que diz respeito ao desenvolvimento de processos, tanto nas universidades quanto na indústria (Tang, Smith, & Poliakoff, 2005). Neste contexto, a disponibilidade de matéria-prima barata e energia renovável a partir da natureza é a base para a sustentabilidade industrial, bem como para uma melhor utilização de resíduos industriais. Para tal, as estratégias para o desenvolvimento de tecnologias limpas para os processos químicos tem tido como objetivo equilibrar os aspectos econômicos e ambientais (Hernaiz et al, 2010; Anastas & Eghbali, 2010; Luque & Clark, 2013). Nesta tendência, o emprego de enzimas como biocatalisadores é uma alternativa promissora para a química sintética tradicional (Fernandez-Lafuente, 2010). O termo biocatálise inclui o conceito dos processos em que um catalisador biológico é utilizado para converter substratos nos mais diversos produtos de interesse. E, para estabelecer um processo de biotransformação eficaz, faz-se necessário o estudo detalhado dos fatores que influenciam no desenvolvimento e na otimização do mesmo (Anastas & Eghbali, 2010).

Monoacilgliceróis (MAGs) são moléculas anfifílicas, conhecidas como surfactantes não-iônicos, biodegradáveis, não tóxicos e biocompatíveis (Sjoblom & Kralova, 2009). A parte hidrófoba destas moléculas é formada por ácidos graxos, geralmente saturados e de cadeias longas, ao passo que a parte hidrófila é formada por glicerol, podendo ocasionalmente ser substituída por um dos seus derivados ésteres de ácidos orgânicos (Batte et al, 2007). Pelo seu interessante balanço hidrofílico-hidrofóbico, os MAGs possuem diversas aplicações biotecnológicas nos setores químico, alimentício, farmacêutico, têxtil, cosmético, dentre outros, atuando como emulsificantes, antiespumantes, agentes de solubilidade, lubrificantes em máquinas e, até, como blocos de construção quiral em síntese (Boo et al, 2011; Bilkova et

al, 2010; Molina et al, 2008). Estima-se que os MAGs representem cerca de 70% de todos os emulsificantes sintéticos usados nas indústrias, sendo considerados seguros pela *Food and Drug Administration* (FDA), aumentando o interesse na sua utilização e no desenvolvimento de novos métodos de síntese (Grosch et al, 1999). Dentre os MAGs, o monoestearato de glicerila ou monoestearina se destaca devido a sua ampla aplicação como aditivo em doces, sorvetes, bolos e pães, como emulsionante, dispersante e anti-mofo, melhorando a preservação, sabor e textura nestes alimentos (Manzoco et al, 2012). A monoestearina é ainda utilizada como tensoativo de primeira escolha em nanotecnologia como componente de nanopartículas e biofilmes de liberação controlada de fármacos (Thanki et al, 2013).

MAGs são atualmente produzidos a partir de glicerólise alcalina de óleos e gorduras naturais sob elevadas temperaturas (220-250°C) e pressão sob atmosfera de azoto. Além do elevado consumo de energia, as condições utilizadas nesta síntese resultam em uma baixa produtividade (<50%) e formação de subprodutos de polimerização do glicerol, gerando coloração escura e má qualidade dos produtos finais, o que exige extensas e dispendiosas etapas de purificação posteriores (Hut et al, 2004; Garcia et al, 2005). Desta forma, o uso de processos enzimáticos pode auxiliar contornando estas problemáticas e, assim, conduzir a uma abordagem mais ecológica (Aksoy, 2000). Um grupo de enzimas que vêm sendo bastante empregadas neste campo são as lipases (EC 3.1.1.3) que, além de serem versáteis em reações de hidrólise e esterificação, biotransformações e resoluções ópticas, são também acessíveis, de baixo custo, estáveis em solventes orgânicos e apresentam alta atividade catalítica em condições brandas de reação, o que as torna extremamente atrativas em processos biocatalíticos em geral.

A importância dos MAGs tem aumentado nos últimos anos devido à grande quantidade de glicerol gerada pela indústria de biodiesel (Velyt et al, 2007; Leschinski et al, 2008; Lu (Max) et al, 2008; Shen et al, 2008). Além disto, rejeitos industriais de ácidos graxos constituem uma fonte barata e extensa de matéria-prima ácida (Itabaiana Junior et al, 2012) para a síntese dos MAGs. Como exemplo, citamos os ácidos graxos livres removidos pelo processo de refino do óleo de palma, o qual remove ainda material odorífero, água e impurezas para produzir um óleo com qualidade comestível (Lumpur et al, 2000). Neste processo, os ácidos graxos livres restantes são aplicados como matéria-prima na fabricação de borrachas, velas e sabonetes. Entretanto, menos de 10% desse resíduo é aproveitado, carecendo de novas alternativas para a produção de aditivos com valor agregado. Diante do exposto, foi proposta a utilização de um resíduo oriundo do refino de óleo de palma contendo

os ácidos esteárico, palmítico e oléico como reagente de partida para a produção de MAG, agregando-se relevante valor econômico e sustentável ao produto final.

Os processos enzimáticos podem ocorrer em diferentes tipos de biorreatores, sejam eles em condições de batelada ou em fluxo contínuo. Para fins industriais, o sistema de fluxo contínuo apresenta vantagens sobre os reatores em batelada, como o maior controle do processo, alta produtividade e melhoria da qualidade, pureza e rendimento (Lindner et al, 2008; Lima et al, 2011). Além disto, os reatores em fluxo contínuo proporcionam melhoria da transferência de massa e uma maior possibilidade de reciclos e aplicações do biocatalisador imobilizado, diferentemente dos reatores em batelada, onde há eventual cisalhamento do suporte que imobiliza o biocatalisador, devido ao efeito da agitação e atrito entre os grãos, inviabilizando novos processos. Diversos tipos de reatores podem ser utilizados em sistemas contínuos, e, dentre estes, os reatores de leito fixo (*Packed Bed Reactors*) são os mais populares, devido à alta eficiência, baixo custo e facilidade de construção, operação e manutenção. Nos últimos anos, diversos processos de síntese, incluindo diferentes etapas, têm sido realizados em sequência ou em cascata, através de fluxo contínuo, sem isolamento de intermediários (Porcar et al, 2009; Komers et al, 2010; Alqahtani et al, 2012; Ntihuga et al, 2012;). O uso da tecnologia de fluxo contínuo tem sido ainda bastante interessante na implementação de reações químico-enzimáticas, pois enzimas e reagentes químicos podem ser acondicionados em diferentes ambientes, evitando a inativação do biocatalisador, devido à presença de um catalisador químico (Whitesides et al, 2006; Watts et al, 2009; Kirschning et al, 2011;). Como alternativa à glicerólise enzimática de óleos vegetais, e, visando obter o 1-monoacilglicerol puro, procede-se a esterificação de ácidos graxos com derivados de glicerol, como o R,S-1,2-O-isopropilidenglicerol (IPG) um reagente comercial.

Comparativamente ao glicerol, o 1,2-IPG apresenta maior solubilidade em solventes orgânicos e, propicia a formação de 1-monoacilgliceróis apenas, já que duas das hidroxilas apresentam-se protegidas por um grupamento acetal.

Neste trabalho, a síntese em cascata da monoestearina foi desenvolvida sob condições de fluxo contínuo, envolvendo o acoplamento de três etapas: acetalização do glicerol, reação esterificação catalisada por lipase do álcool protegido com o ácido graxo de interesse e, por fim, a remoção dos acetais do glicerol, gerando um único produto: o 1-monoacilglicerol (figura 1).

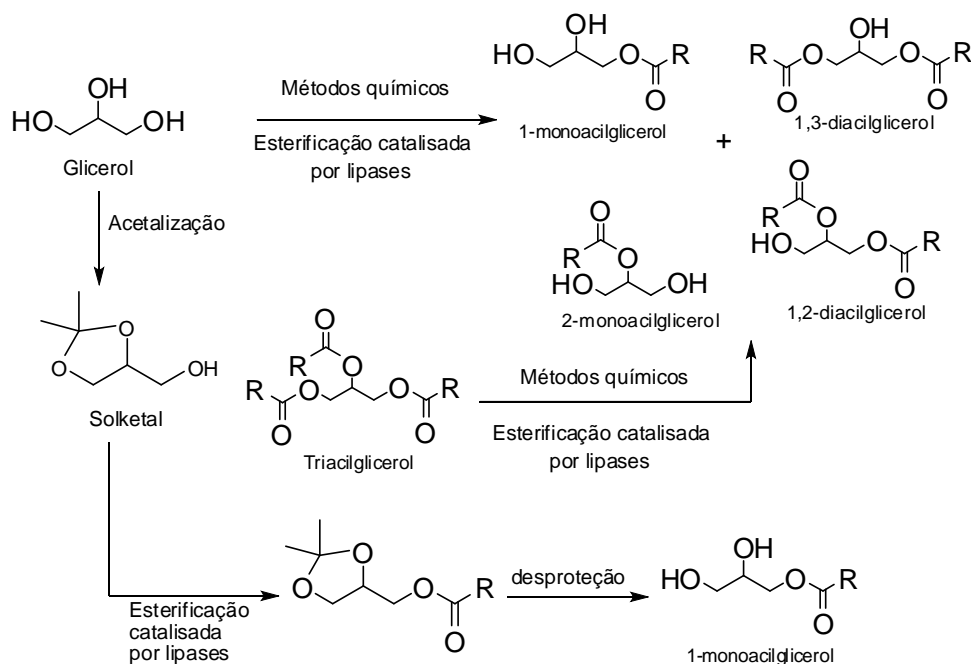


Figura 1: Esquema dos processos reacionais envolvidos no presente trabalho (produção do 1-MAG a partir do glicerol protegido) e, alternativas de rotas sintéticas para produção do 1-MAG que levam a formação de subprodutos.

Um desafio importante da esterificação do glicerol catalisada por lipase é encontrar um solvente que dissolva o ácido graxo e solubilize o glicerol, sem conduzir a formação de produtos secundários, o que requer, portanto, satisfatória seletividade (Zheng et al, 2008). Devido a esses problemas, a maioria dos pesquisadores opta pela hidrólise seletiva de triacilgliceróis, em processos extensivos de batelada, a fim de se obter uma mistura de acilgliceróis enriquecidos com 1-monoacilgliceróis (Cheirsilp et al, 2009). Como alternativa, sistemas micro heterogêneos, tais como microemulsões água em óleo (A/O) conhecidas como micelas reversas, têm sido propostas (Xenakis et al, 2009). Micelas reversas são termodinamicamente estáveis e opticamente transparentes, com grande área interfacial que fornece um domínio aquoso onde as enzimas podem ser acomodadas. Fornece ainda uma interface onde o sítio ativo das enzimas pode ser ancorado e, uma fase orgânica não-polar, onde substratos e/ou produtos hidrofóbicos podem ser dissolvidos (Xenakis et al, 2009; Stamatis et al, 1997), sendo ambas as fases estabilizadas por um surfactante. Em vários casos as micelas reversas proporcionam melhora da atividade enzimática, gerando rendimentos elevados com baixas concentrações de biocatalisador. Neste trabalho, microemulsões em AOT e Lecitina foram testados objetivando a produção da monoestearina, catalisada pelas lipases B, de *Cândida antarctica* e de *Rhizomucor miehei*. Estudos cinéticos foram realizados a fim de se investigar os efeitos da temperatura e do teor de água na referida reação.

Embora micelas reversas apresentem diversas vantagens quanto à melhoria de atividade enzimática e solubilidade, uma das grandes limitações deste sistema é a separação do produto final devido à emulsificação com surfactantes. Entretanto, micelas reversas podem ser imobilizadas *in situ* através de matrizes gelificadas de celulose, ágar ou derivados (Zoumpanioti et al, 2006; Zoumpanioti et al, 2009, Xenakis et al, 2010). Esta tecnologia, denominada organogel, é uma alternativa biocatalítica interessante, visto que pode ser aplicada tanto em processos de batelada, quanto de fluxo contínuo. Além disso, procede a catálise enzimática sem haver a necessidade de posterior separação do produto, assim como ocorre em catálises convencionais utilizando enzimas imobilizadas. Neste trabalho, a síntese da monoestearina foi proposta tendo-se o isopropilidenglicerol e o ácido esteárico como reagentes de partida, em sistemas microemulsionados livres e imobilizados em organogel.

1.2 – Considerações Parciais

Tendo-se em vista as limitações para a síntese e purificação de MAGs, este trabalho tem como objetivo um estudo comparativo de rotas biotecnológicas, envolvendo processos em batelada, fluxo contínuo, sistemas sem solventes, além do emprego de microemulsões e organogel para a síntese do monoestearato de glicerila, empregando inicialmente o IPG como álcool e o AE. Neste sentido, resíduos industriais de ácidos graxos e glicerol foram também empregados como matérias-primas, na intenção de se agregar valor comercial e ambiental aos produtos finais.

Variáveis reacionais, como temperatura, agitação, fluxo reacional, quantidade de biocatalisador foram otimizadas via Planejamento de experimentos, empregando as enzimas imobilizadas de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei*.

Aumentos de escala, concentração e reprodutibilidade dos processos e suas respectivas produtividades foram investigados, além do potencial de reciclabilidade do biocatalisador em cada sistema.

Por fim, um sistema em fluxo contínuo em cascata, acoplando todas as etapas de formação de MAGs desprotegidos foi desenvolvido.

CAPÍTULO 2

Revisão Bibliográfica

2.1 – Enzimas

Algumas das limitações existentes na obtenção de produtos de interesse comercial podem estar associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, os quais, muitas vezes, são pouco versáteis, além de exigirem elevadas temperaturas para serem atingidas razoáveis velocidades de reação. Além disto, pela reduzida especificidade, podem fornecer subprodutos de decomposição química ou até mesmo contaminações, gerando, desta forma, a necessidade de etapas posteriores de purificação, elevando-se os custos do processo. Diferentemente de um catalisador químico, que muitas vezes não apresentam seletividade quanto ao substrato, e necessitam de elevadas temperaturas ou pressão para atingir resultados satisfatórios, enzimas são biocatalisadores de natureza protéica ou glicoprotéica que, além de atuarem em condições brandas de temperatura (30 a 70 °C), pH e pressão, apresentam elevada seletividade (a qual pode ser químico, região e/ou enantio), atingindo taxas de reação bastantes elevadas (cerca de 10^8 a 10^{12} vezes maior do que sem catalisador). Este comportamento das enzimas permite uma redução dos custos com o “*downstream*” do processo, já que sua elevada especificidade resulta em um maior rendimento do processo, obtenção de produtos biodegradáveis e redução na quantidade de resíduos (De Castro et al, 2004).

De acordo com o NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) as enzimas são classificadas e codificadas em relação à reação catalisada. A nomenclatura utiliza a abreviação E.C (*Enzyme Commission*) seguida de até quatro dígitos referentes à classe e subclasses a que pertence à enzima (Lima, 2004; Zimmermann, 2005). O interesse industrial por transformações enzimáticas em meios não aquosos tem aumentado intensamente nos últimos anos, principalmente, nas áreas de enzimologia e engenharia de proteínas, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. Entre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases. As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima são:

i) apresentam alta estabilidade em solventes orgânicos; ii) não requerem a presença de co-fatores; iii) possuem uma larga especificidade pelo substrato e, iv) exibem uma alta enantiosseletividade (Castro, 2004).

O reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de enzimas em geral, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial. De acordo com a reportagem da *Business Communications Company Inc.*, citada no trabalho de Machado (2011), o mercado global de enzimas para interesse industrial foi estimado em U\$ 4,4 bilhões de dólares em 2015. Esta estimativa está baseada no fato de que novas aplicações estão surgindo, exigindo desta forma que a indústria responda com um fluxo contínuo de produtos inovadores. A Figura 2 demonstra os principais consumidores de enzimas, assim como uma estimativa do valor gasto anualmente por estes setores.

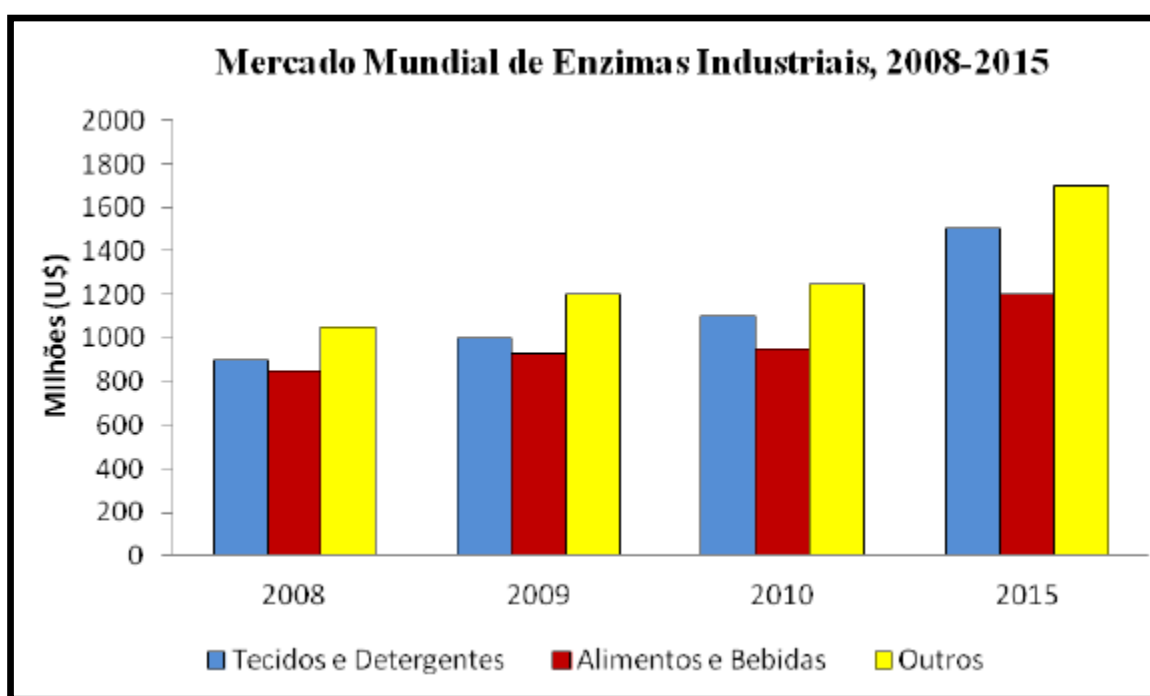


Figura 2 : Perspectivas para o mercado mundial de enzimas industriais no período de 2008-2015. (<http://www.bcresearch.com/report/BIO030F.html>, 2012, citado por Machado, 2011).

2.1.1 – Lipases

2.1.1.1 – Características Gerais

Lipases são enzimas classificadas como hidrolases (triacilglicerol éster hidrolases - E.C. 3.1.1.3) e catalisam reações de hidrólise de ésteres de ácidos carboxílicos (Figura 3), tendo-se como produto final os ácidos correspondentes e o glicerol (Lago et al, 2006). Em condições de baixa concentração de água, a reação inversa (síntese do TAG) pode ocorrer. Trata-se de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânico-aquosa, e não necessitam de cofatores para sua atividade. Apresentam grande importância na biocatálise atual, devido à imensa capacidade de catalisar diversas reações, além de serem estáveis tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico, com alta região, química e enantiosseletividade (Carvalho et al, 2005).

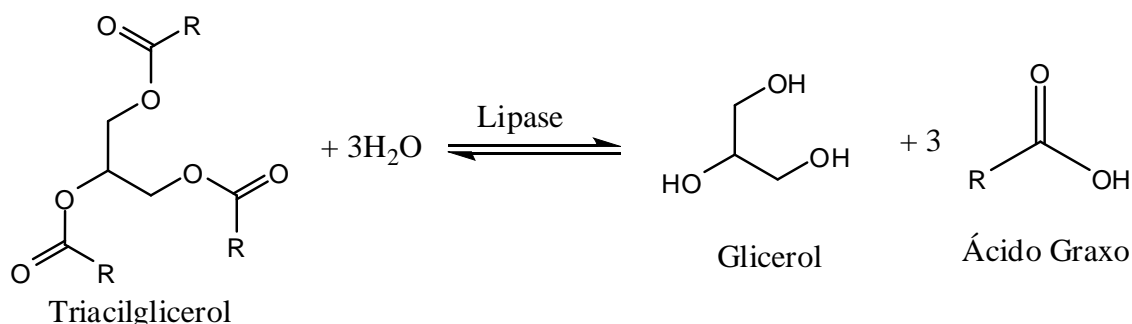


Figura 3: Reação de hidrólise catalisada por lipases. (Adaptado de Carvalho et al, 2005).

As lipases são enzimas bastante difundidas na natureza, sendo as principais fontes de obtenção as plantas (sementes oleaginosas, grãos), os animais (órgãos como fígado, pâncreas, estômago) e alguns microrganismos (leveduras, fungos, bactérias) (Paques e Macedo, 2006). São enzimas digestivas importantes para a mobilização da gordura utilizada como fonte de energia nos seres vivos, assim como para o metabolismo intracelular de lipídeos nas membranas biológicas (Villeneuve, 2000).

Dependendo da fonte de obtenção, lipases podem ter massa molar variando entre 20 a 75 kDa, assim como apresentar atividade em pH na faixa de 4 a 9 e, em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. Lipases são geralmente estáveis em soluções aquosas neutras, apresentando atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C, porém sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica.

Por serem estáveis e eficientes com diferentes substratos, além dos lipídios, bem como por suas propriedades químico, régio ou enantiosseletivas e, estereoespecificidade, as lipases têm sido biocatalisadores atraentes em uma série de reações químicas (Jaeger & Reetz, 1998, Bornscheuer & Kazlauskas, 1999; Villeneuve et al, 2000, Freire e Castilho, 2008). Além da hidrólise, as lipases também são conhecidas por catalisarem reações reversas, como esterificação (Ruela et al, 2012; Sutili et al, 2012), transesterificação (interesterificação), alcóólises e acidólises (Anuar et al, 2013; Ray et al, 2013), aminólise (Bonte et al, 2013), acilação regioseletiva (Badgujar et al, 2013), enantiosseletiva (Pilissão et al, 2009) e lactonização (Boratyński et al, 2013), em condições onde a quantidade de água do sistema reacional é suficientemente baixa a fim de favorecer o equilíbrio termodinâmico para o sentido da síntese (Ghanem e Aboul-Enein, 2004, Foresti e Ferreira 2006). Há ainda trabalhos recentes, dentre eles, do nosso grupo de pesquisa, onde há descrição de importante atividade de lipases em reações de epoxidação (Corrêa et al, 2012).

Uma grande quantidade de lipases oriundas de microrganismos tem sido aplicada em biocatálise (Athalye et al, 2013), assim como estudadas tanto do ponto de vista bioquímico quanto genético (Abdulla & Ravindra, 2013; Ruiz et al, 2013). Com os avanços da tecnologia do DNA recombinante, além da abundância e facilidade de cultivo e produção de microrganismos, a principal forma de produção atual de lipases tem sido a fermentação, apresentando um maior controle de processo e elevada produtividade como grandes vantagens (Gutarra et al, 2011; Godoy et al, 2012;). Dentre os microrganismos utilizados, destacam-se os fungos filamentosos dos gêneros *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor*, leveduras dos gêneros *Yarrowia* e *Cândida*, sendo esta última de grande importância industrial (Yuzbashev et al, 2012; Nakajima-Kambe et al, 2013; Romero et al, 2013), (Wang et al, 2012). Além disto, destacam-se algumas lipases de fontes bacterianas do gênero *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Serratia* (Bose & Keharia, 2013; Joshi & Khare, 2013; Song et al, 2013; Zhao et al, 2013).

Esterases (E.C.3.1.1.1), assim como as lipases, são também um extenso grupo de hidrolases que naturalmente catalisam tanto a quebra quanto a formação de ligações éster (Bornscheuer, 2002; Secundo et al, 2006; Nam et al, 2013). Entretanto, lipases hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa (mais de 10 átomos de carbono), enquanto as esterases hidrolisam acilgliceróis com menos de 10 átomos de carbono (Verger, 1997). Porém, o interesse nestas enzimas reside no fato de que as mesmas não requerem cofatores, são relativamente estáveis e ativas em solventes orgânicos (Bornscheuer, 2002). Deve-se enfatizar

também, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto que o inverso não é verdadeiro (Jaeger et al, 2002).

Sarda e Desnuelle (1958) definiram lipases levando-se em conta a ativação interfacial. Nesta obra, concluiu-se que a propriedade de ativação está relacionada com a presença de uma interface água/óleo que é gerada na presença de substratos insolúveis em água e que são emulsionados (Verger, 1997, citado por Borges, 2011). Portanto, o fenômeno da ativação interfacial tem como característica o aumento da atividade lipolítica quando a solubilidade do substrato é excedida, fazendo com que seja gerada uma fase independente. Além disto, as características e a qualidade da interface gerada podem influenciar intensamente na atividade catalítica das lipases (Costa e Amorim, 1999, citado por Borges, 2011).

Após a elucidação estrutural de diversas lipases, como a lipase pancreática humana, notou-se que a ativação poderia ser melhor explicada em função da presença de uma tampa hidrofóbica (conhecida como “*Lid*”), que apresenta a função de proteger o sítio ativo da enzima, além de expô-lo em eventuais mudanças conformacionais. Entretanto, trabalhos atuais demonstram que a presença desta tampa não está necessariamente relacionada a ativação interfacial, já que lipases oriundas de leveduras (*Cândida antarctica* B), fungos como a de *Rizhomucor miehei* (figura 4), ou até mesmo bactérias (*Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia glumae*), apresentam “*Lid*” em suas estruturas, porém não sofrem ativação interfacial (Jaeger e Reetz, 1998; De Castro *et al*, 2004; Freire e Castilho, 2008; Esakkiraj et al, 2012).

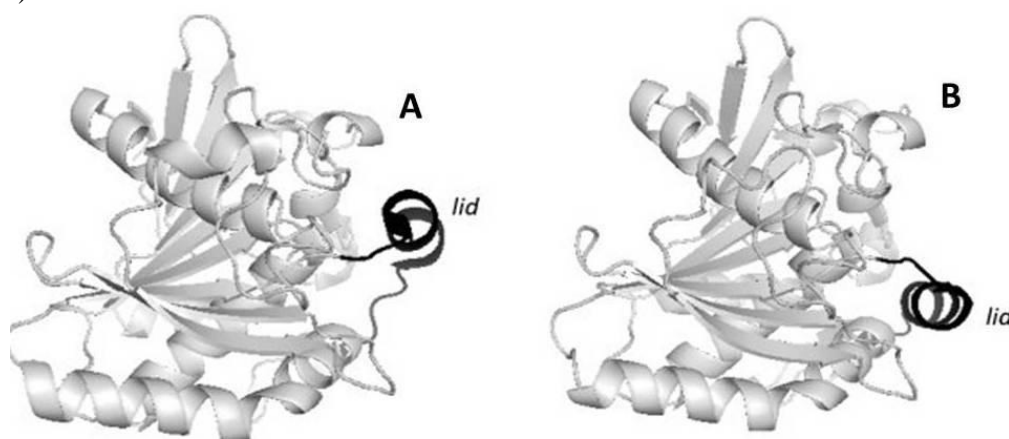


Figura 4: Estrutura cristalina da lipase de *Rizhomucor miehei*, evidenciando a tampa hidrofóbica em sua forma fechada (A) e aberta (B). Fonte: Rodriguez & Fernandes-Lafuente, 2010.

Além disto, as cutinases, enzimas conhecidas lipases “verdadeiras” que possuem a menor estrutura conhecida (~19 kDa), como a de *Fusarium solani* spp. *Pisi*, não apresentam a tampa catalítica e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica (Dalla-Vecchia et

al, 2004). Portanto, atualmente, as lipases têm sido definidas como carboxilesterases capazes de hidrolisar triacilgliceróis de cadeia longa (Verger, 1997; Lima, 2004).

2.1.1.2– Especificidade de Lipases

Para aplicação industrial, a especificidade da lipases é um fator crucial. De acordo com a especificidade com o seus substratos naturais preferenciais (acilgliceróis), as lipases podem ser divididas (figura 5 - Paques e Macedo, 2006):

1. *Regiosseletivas* – que podem ser subdividas em:

- *Lipases 1,3-específicas* - hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, ou seja, na posição 1 ou 3 (ex: *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium roquefortii*);
- *Lipases não-específicas*- hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2 (ex: *Cândida rugosa*, *Pseudomonas sp.*);

2. *Tipo-seletivas* - com relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ ou ao número de insaturação do grupo acila.

- *Enantioseletivas*.

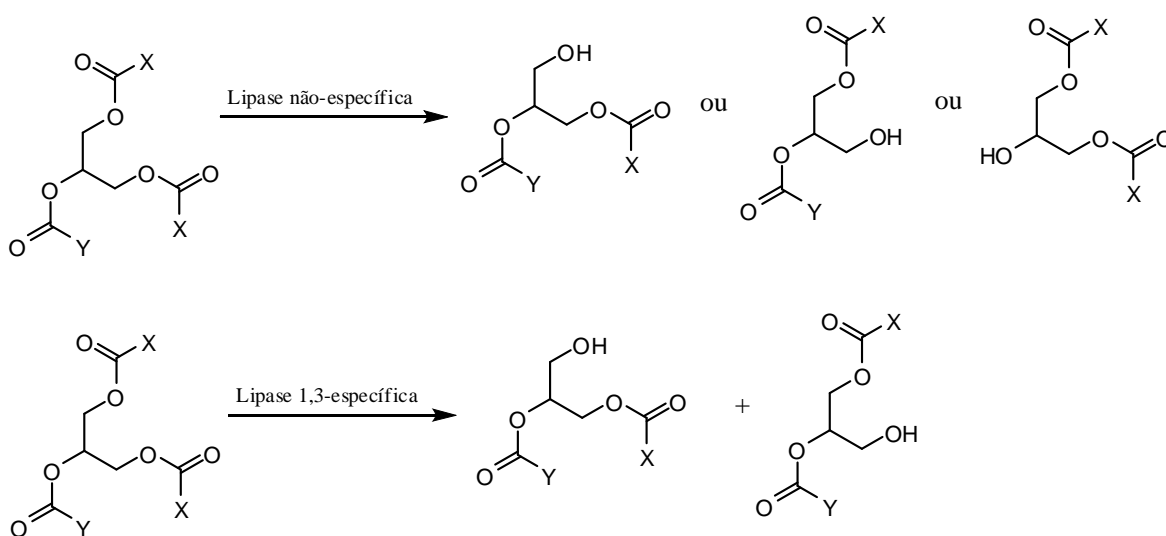


Figura 5: Principais reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica (Adaptado de Paques e Macedo, 2006).

Lipases de *Rhizomucor* e *Penicillium* são 1,3-específicas, porém a lipase de *Cândida antarctica* apresenta os dois tipos, 1,3-específica (*Cândida antarctica B*) e não específica (*Cândida antarctica A*). As lipases 1,3-específicas diferem entre si no grau de seletividade (ou especificidade), como indicado qualitativamente na Tabela 1.

Tabela 1: Regiosseletividade de algumas lipases microbianas.

Lipase (Fonte)	Regiosseletividade
<i>Aspergillus niger</i>	Moderadamente 1, 3-específica
<i>Cândida antarctica B</i>	1,3-específica
<i>Candidata antarctica A</i>	2-específica
<i>Cândida rugosa</i>	Não-específica
<i>Aspergillus oryzae</i>	Altamente 1,3-específica
<i>Rhizomucor miehei</i>	Moderadamente 1, 3-específica
<i>Geotrichum candidum</i>	Estereosseletiva
<i>Rhizomucor javanicus</i>	Levemente 1,3-específica

Adaptado de: Fregolente, 2010.

2.1.1.3 - Aplicações de Lipases

As lipases têm sido atraentes principalmente em aplicações industriais de larga escala, onde sua maior importância tem sido como aditivo em detergentes, os quais são usados principalmente em lavanderias domésticas e industriais e, na limpeza doméstica. O comércio mundial de enzimas para aplicações em detergentes é estimado em 450 milhões de dólares por ano (Freire e Castilho, 2008). Para melhorar o poder de detergência, geralmente são adicionados mais de um tipo de enzima nos detergentes, incluindo as proteases, amilases, celulasas e lipases. As enzimas podem reduzir o impacto ambiental causado pelos produtos detergentes, uma vez que são biodegradáveis, não produzem resíduos nocivos à saúde, não apresentam risco à vida aquática e a quantidade de compostos químicos lançada é reduzida. Além disto, lipases têm sido aplicadas também em outros setores, tais como: degradação de óleos e gorduras; síntese farmacêutica; produção de cosméticos; alimentício; papéis; couro; tratamento de efluentes; produção de biodiesel; diagnósticos; análises clínicas, químico, dentre outras (Reetz, 2002; Freire e Castilho, 2008). A Tabela 2 traz um panorama das principais aplicações industriais de lipases em função do tipo de reação catalisada.

Tabela 2: Relação dos setores, tipos de aplicação e produtos obtidos com a utilização de lipases.

SETOR INDUSTRIAL	APLICAÇÃO	PRODUTO	REFERÊNCIA
ALIMENTÍCIO	Processamento de carnes e peixes	Produtos embutidos	Motok e Seguro, 1998
	Transesterificação de óleos	Manteiga de Cacau	Paques e Macedo, 2006; Hasan et al, 2006.
	Melhorar aroma e remover excesso de gorduras	Maionese, molhos e cremes	Sisak et al, 2006
	Síntese de ésteres	Ésteres e emulsificantes	Freire e Castilho, 2008, Paques e Macedo, 2006.
	Hidrólise da gordura do leite	Agentes aromatizantes para produtos lácticos	Paques e Macedo, 2006; Hasan et al, 2006; Freire e Castilho, 2008.
QUÍMICO	Transesterificação de óleos vegetais	Biodiesel	Paques e Macedo, 2006; Hasan et al, 2006; Freire e Castilho, 2008.
	Síntese de ésteres	ésteres	Bornscheuer, 1999; Shimada et al, 2007.
MÉDICO	Dosagem de triglicerídeos do sangue	Kit Diagnóstico	Freire e Castilho, 2008, citado por Machado, 2011.
COSMÉTICO	Remoção de lipídeos, hidratação. Clareamento de manchas	Cosméticos em geral	Guth e Lentner, 2006.

2.1.1.4 - Mecanismo Catalítico e Estrutura de Lipases

Desde a descoberta e resolução das estruturas tridimensionais das lipases de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática humana por cristalografia de Raios-X, até hoje, todas as lipases têm sido do tipo α/β hidrolase (Bornscheuer, 2002) (Figura 6), apresentando um núcleo central, formado por uma folha β , constituída por até oito cadeias β diferentes ($\beta 1$ - $\beta 8$), ligada a até 6 hélices α (Ollis et al, 1992). No entanto, a curvatura das cadeias β pode variar significativamente, assim como a posição topológica das hélices α . As fitas β possuem geralmente orientação para a esquerda, e a primeira e a última fita possuem um ângulo de aproximadamente 90° entre si.

De modo geral, o sítio catalítico das lipases é formado por de três resíduos, conhecidos como tríade catalítica, que se apresentam sempre na mesma ordem: O resíduo nucleofílico (serina - Ser), um resíduo ácido (aspartato - Asp ou glutamato - Glu), e a Serina (Ser). O sítio localiza-se no lado C-terminal das fitas β . O nucleófilo catalítico, neste caso, o aminoácido serina, está localizado especificamente no C-terminal da fita $\beta 5$ em um pentapeptídeo altamente conservado (Glicina-X1-Serina-X2-Glicina, onde X1= histidina e X2= ácido glutâmico ou aspártico), que constitui o que é denominado de ângulo nucleofílico (Jaeger et al, 1999; Bornscheuer, 2002).

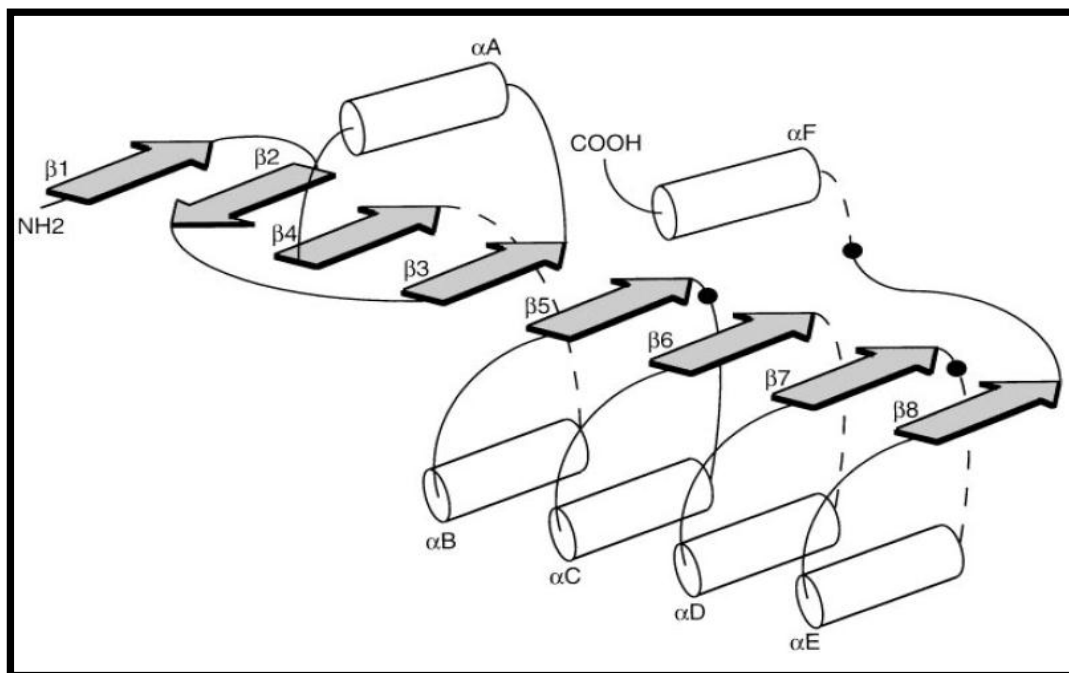


Figura 6: Representação esquemática do modelo estrutural de α/β hidrolases. Filamentos em conformação β (1-8) formando uma estrutura em folha β -pregueada estão indicados pelas setas, estrutura em α -hélices (A-F) indicadas pelos cilindros. A posição topológica do sítio ativo é representada por um círculo sólido, onde o nucleófilo é o resíduo de aminoácido depois de $\beta 5$, o resíduo de Asp/Glu está depois de $\beta 7$ e o resíduo de histidina está entre $\beta 8$ e αF (Jaeger et al, 1999).

Quando a lipase é adicionada em meio aquoso, a exposição do sítio catalítico é desfavorável do ponto de vista termodinâmico, fazendo com que a mesma permaneça em seu estado inativo, ou seja, na conformação fechada. Entretanto, na presença de uma interface, gerada na presença de substratos hidrofóbicos, há uma modificação estrutural na lipase, de modo a gerar uma conformação ativa ou “aberta”, expondo o sítio ativo e tornando-o mais acessível ao substrato, sendo este o fenômeno de ativação interfacial (Costa e Amorim, 1999). Esta abertura nada mais é do que uma reestruturação conformacional da lipase, que cria uma região eletrofílica (“cavidade do oxianion”) em torno do resíduo de serina: neste fenômeno, tampa hidrofóbica é distorcida para trás, encobrendo seu lado hidrofílico em uma cavidade polar, e expondo totalmente seu lado hidrofóbico, expandindo a superfície apolar em torno do sítio catalítico. A cavidade do oxianion é responsável pela estabilização de cargas negativas geradas durante o ataque nucleofílico na ligação carbonila do substrato, portanto estabiliza o estado de transição durante a catálise. (Paiva *et al*, 2000).

Diversos estudos cinéticos têm sido feitos a fim de se propor um mecanismo plausível para descrever a ação catalítica de lipases em suas reações. Deste modo, o mecanismo mais utilizado para descrever a ação catalítica das lipases é o chamado Ping-Pong Bi Bi (Figura 7). Este mecanismo consiste em duas etapas majoritárias (Paiva *et al*, 2000; Jaeger *et al*, 1999):

1. Ataque nucleofílico sobre a ligação éster do substrato pelo átomo de oxigênio do grupamento hidroxila do resíduo serina do sítio catalítico, após a abertura da tampa, resultando na formação de um complexo denominado enzima acilada e liberação de uma porção álcool do substrato original.

2. Hidrólise do complexo enzimático acilado, resultando na regeneração da enzima.

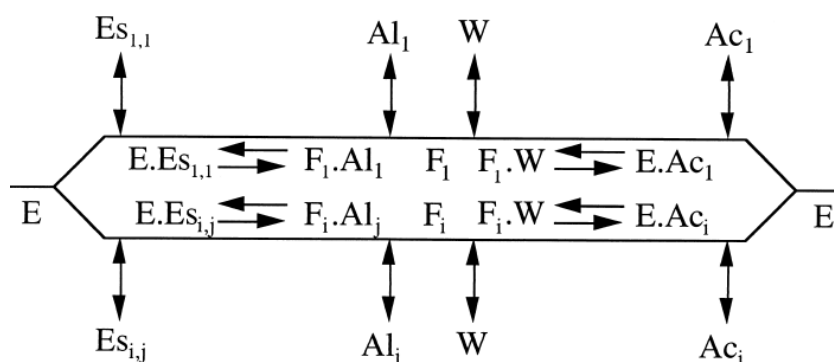


Figura 7: Mecanismo cinético (Ping-Pong Bi Bi) de lipase catalisando reações envolvendo múltiplos substratos e produtos usando a notação de Cleland's (E: enzima; Es: éster; Al: álcool; Ac: ácido, W: água, F: acil enzima, $i = 1, 2, 3, \dots$; $j = 1, 2, 3, \dots, J$). (Paiva *et al*, 2000, citado por Gomes *et al*, 2011).

A figura a seguir (figura 8), proposta por Manoel et al (2013), descreve o mecanismo de catálise e os estados de transição durante a hidrólise do éster acetato de etila (etanoato de etila) catalisada por lipases e esterases.

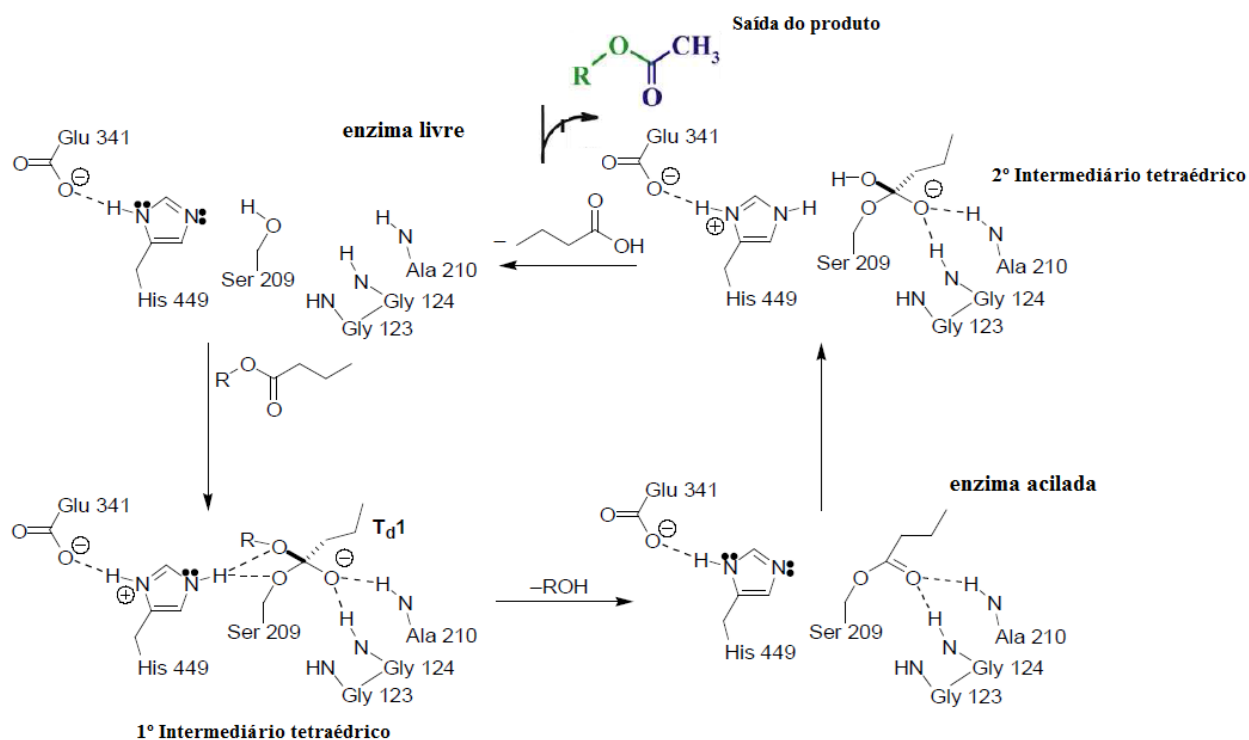


Figura 8: Esquema da reação de hidrólise de ligações éster catalisada por esterases e lipases. Onde T_d1 e T_d2 representam o primeiro e o segundo intermediários tetraédricos. (Figura modificada por Manoel et al 2013 a partir de Bornscheuer e Kazslauskas, 2006 e Simas et al, 2011).

De acordo com a Figura 8 o processo de hidrólise de um éster catalisada por uma lipase ocorre em 4 etapas, descritas a seguir:

Etap 01: Inicialmente o aminoácido histidina presente na tampa hidrofóbica aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina presente no sítio catalítico. Desta forma, ocorre um ataque nucleofílico ao átomo de carbono suscetível da ligação éster do substrato, representado na figura pelo acetato de etila, abrindo a ligação C=O e dando origem ao intermediário tetraédrico. O anel imidazólico da histidina fica protonado e carregado positivamente, sendo estabilizado pela carga negativa do resíduo ácido.

Etap 02: O intermediário tetraédrico formado é estabilizado por ligações de hidrogênio com os grupamentos amidas dos resíduos pertencentes à chamada “cavidade do oxianion”. O intermediário tetraédrico é desfeito, pelo retorno da ligação C=O e consequente clivagem da

ligação éster e liberação da porção álcool, cujo oxigênio recebe um próton proveniente da histidina, que age como ácido gerando-se assim o intermediário denominado enzima acilada;

Etapa 03: Formação do intermediário covalente enzima acilada, onde o componente ácido do substrato encontra-se esterificado com o resíduo serina da enzima. A molécula de água que se aproxima e é ativada pelo resíduo de histidina vizinho, e o íon hidroxila resultante promove o ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do intermediário covalente. Uma molécula de água, que tem seu caráter nucleofílico acentuado pela ação básica da histidina protonada, ataca o carbono suscetível do intermediário acil enzima, abrindo a ligação C=O, gerando um segundo intermediário tetraédrico.

Etapa 04: Retorno da ligação C=O desfaz-se o segundo intermediário tetraédrico com a liberação do ácido carboxílico e da enzima livre.

2.2 - *Tensoativos*

Os tensoativos são substâncias que pela sua estrutura e propriedades têm a capacidade de reduzir as tensões interfaciais e superficiais dos líquidos onde estes se encontram. Fazem parte da família das moléculas anfifílicas, que possuem como característica principal duas regiões de solubilidades distintas e com distância suficiente para se comportarem de maneira independente, apesar de serem ligadas uma a outra. Um exemplo de tensoativo amplamente utilizado é o monoestearato de glicerila (figura 9), um tensoativo não-iônico, objeto de estudo deste trabalho.

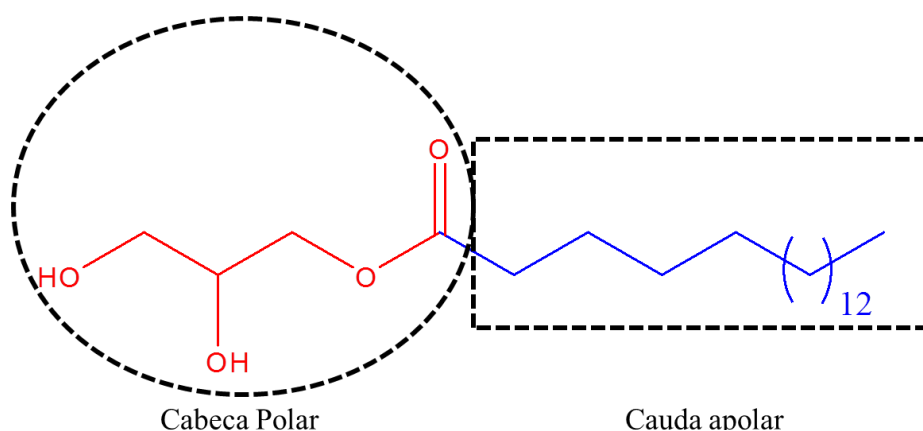


Figura 9: Representação do monoestearato de glicerila, um tensoativo não-iônico, evidenciando as duas regiões de solubilidades distintas.

Os tensoativos possuem intensa aplicabilidade industrial, podendo ser utilizados, por exemplo, como: emulsificantes, agentes molhantes, solubilizantes, anti-espumantes, de emulsificantes, dentre outras aplicações (Nitschke e Pastore, 2002).

Uma das principais propriedades de algumas moléculas tensoativas é a capacidade de emulsionar dois líquidos imiscíveis. Os tensoativos que apresentam estas características são chamados particularmente de agentes emulsificantes e atuam facilitando a emulsificação, bem como estabilizando a emulsão resultante, pois se posicionam entre as duas fases da formulação (aquosa e oleosa), originando a película interfacial que diminui a tensão entre elas (Bognolo, 2012).

A principal função dos emulsificantes no processamento dos alimentos é reduzir a tensão interfacial entre as fases em uma emulsão, geralmente óleo e água. Tensão interfacial pode ser definida como a força necessária para romper uma interface podendo ser determinada pelo grau de coesão entre as moléculas que formam esta superfície. A água forma uma extensa rede através de suas ligações de hidrogênio, o que lhe confere uma grande tensão superficial, e consecutivamente, interfacial. Quando um tensoativo é adicionado à água, as extremidades hidrofílicas que se espalham na superfície competem pelas ligações de hidrogênio que contribuem para a coesividade da superfície. Como resultado, a tensão superficial é diminuída.

Em um sistema de duas fases, como em muitos cosméticos e alimentos, uma fase é dispersa na outra em forma de gotas, e necessitam ser estabilizadas por um tensoativo. A fase em maior quantidade denomina-se fase contínua ou dispersante, e aquela em menor quantidade, denomina-se fase dispersa. Estes sistemas são denominados emulsões, e podem ser classificados em emulsões óleo/água quando a fase contínua é água, como leite ou sorvetes, e emulsões água/óleo quando a fase contínua é óleo, assim como manteigas e margarinas (Fuguete, 2005).

Uma emulsão é considerada termodinamicamente instável. Para ser considerada termodinamicamente estável, a emulsão deveria espontaneamente voltar ao estado de emulsão após uma separação de suas fases através de, por exemplo, uma centrifugação. Entretanto, depois de separadas as fases de uma emulsão, elas permanecem separadas até que sejam misturadas por uma força externa.

Emulsões estáveis apenas retardam o inevitável, agindo de modo a evitar que a separação de fases seja visível, pelo menos dentro do tempo normal de vida do produto (Urban, 2004). Como exemplo, pode-se citar a margarina, onde a mistura apropriada de gordura combinada com proteínas do leite, lecitinas e monoacilgliceróis saturados usados na

produção da margarina aumentam a estabilidade e as propriedades alimentícias. A utilização desses tensoativos na indústria alimentícia, além de estabilizar emulsões, ainda modifica a cristalização da gordura, a consistência, a aderência da massa, além das características de geleificação do amido pela complexação com amido, proteína e açúcares; lubrificam as massas com baixo teor de gordura, entre outras propriedades.

2.2.1 - Classificação dos Tensoativos

Os tensoativos podem ser classificados de diferentes formas. Entretanto, a classificação mais pertinente e comumente utilizada é feita baseando-se na carga (ou ausência de carga) da superfície ativa (parte polar). A seguir, serão apresentadas as classificações:

1. Tensoativos Catiônicos

Esses tensoativos têm uma grande afinidade com a queratina, conferindo maciez e brilho em formulações para cabelos. Estes tensoativos não são muito utilizados e mostram-se incompatíveis com os aniônicos. Como exemplo desta classe tem-se: cloreto de olealcônio, cloreto de diestearildimônio (Figura 10), éter sulfato de isosteariletildimônio.

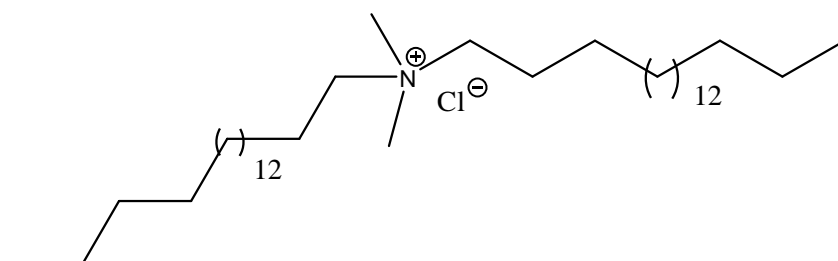


Figura 10: Estrutura química do cloreto de diestearildimônio.

2. Tensoativos aniônicos

Os tensoativos aniônicos são normalmente empregados em xampus. São os mais numerosos, possuem um ou vários grupos ionizáveis em fase aquosa e, uma vez dissociados em água, formam íons na superfície ativa carregada negativamente. São exemplos de tensoativos aniônicos: lauril sulfato de sódio (Figura 11 - 1), laurel éter sulfato de sódio, e a trietanolamina (Figura 11 - 2).

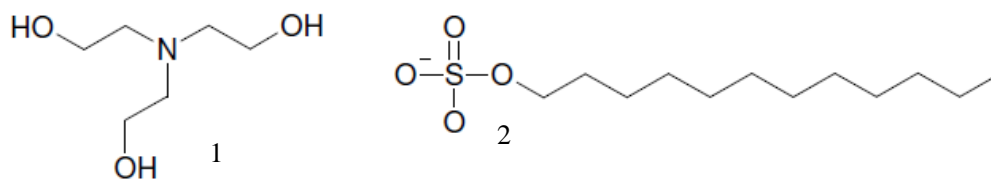


Figura 11: Exemplos de surfactantes aniônicos. Estruturas químicas do 1- trietanolamina; 2- lauril éter sulfato de sódio.

3. Tensoativos anfóteros

Os tensoativos anfóteros apresentam um poder detergente e espumante menor que os aniônicos, mas, em geral, são muito bem tolerados, e por isso, também possuem aplicação alimentícia, além de cosmética. A betaína (ácidos graxos clorados e trimetilamina), a cocoamidopropil betaína (Figura 12) e a cocoamidopropil hidroxisultaína são exemplos de tensoativos anfóteros.

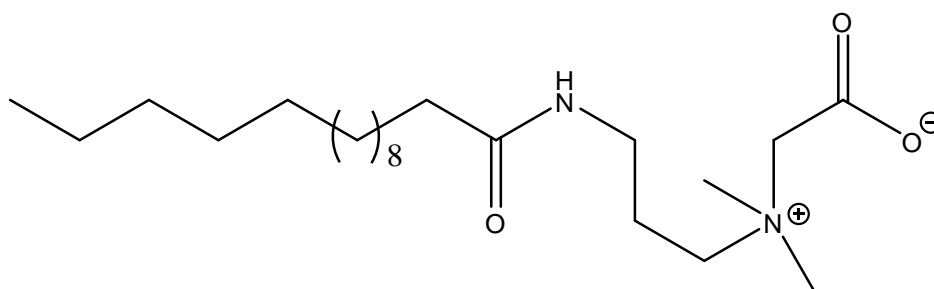


Figura 12: Estrutura química da cocoamido propilbetaína.

4. Tensoativos não iônicos

Estes tensoativos apresentam características bem peculiares, pois são compatíveis quimicamente com a maioria dos outros tensoativos e suas propriedades são pouco afetadas pelo pH (Araújo, 1994). Este fato os torna bem atrativos do ponto de vista industrial.

Existem basicamente três grandes grupos de tensoativos não iônicos: alcanolamidas de ácidos graxos, tensoativos etoxilados e propoxilados, ésteres de ácidos graxos com polióis. Como exemplos de tensoativos não iônicos têm-se os tweens e spans, além dos monoacilgliceróis.

2.2.2 - Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL)

Todos os emulsificantes apresentam uma característica comum, pois são moléculas que possuem uma porção polar, solúvel em água, também chamada de porção hidrofílica e uma porção apolar, insolúvel em água, também chamada de lipofílica ou hidrofóbica (Dos Santos, 2008). O balanço entre essas duas porções moleculares com características opostas é denominado EHL - equilíbrio hidrofílico-lipofílico (do inglês HLB – *hydrophilic-lipophilic balance*). Este representa um sistema de classificação dos tensoativos, tendo como base os parâmetros de solubilidade desses compostos em solventes polares e/ou apolares (Griffin, 1954). É uma tentativa de quantificar os efeitos das contribuições das partes polar e apolar existentes na estrutura da molécula (Tabela 3).

Tabela 3: Faixas de EHL de algumas classes de tensoativos.

Tensoativo (com aplicação industrial)	Faixa de EHL
Antiespumantes	1,5-3,0
Emulsionantes água/óleo	3,0-6,0
Agentes Espumantes	7,0-9,0
Emulsionantes óleo/água	8,0-18,0
Detergentes	13,0-15,0
Solubilizantes	15,0-20,0

Adaptado de Duane, 1987.

A predominância de uma destas partes dotará características específicas à molécula anfifílica e determinará os tipos de aplicação de cada uma (Duane, 1987), envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases.

O valor de EHL de um tensoativo pode ser definido como (Equação I):

$$\mathbf{BHL=7 + \Sigma H_i}$$

Equação I

onde: H_i = contribuição dos grupos (i) hidrófilos e lipófilos.

Na Tabela 4 são apresentados valores de EHL para alguns emulsificantes empregados em panificação.

Tabela 4: Valores de EHL para alguns emulsificantes empregados em panificação. Adaptado de Moura, 2010.

Emulsificante	Nome Comum	EHL	Interação com Amido	Interação com Glutén	Dosagem Usual (%)
Polissorbato 60	PS-60	14 -15	Moderado	Excelente	0,15 – 0,30
Polissorbato 80	PS-80	14-15	Moderado	Excelente	0,15-0,30
Estearoil-2-lactil lactato de sódio	SSL	7 -9	Muito bom	Bom	0,25-0,50
Estearoil-2-lactil lactato de cálcio	CSL	18-21	Bom	Bom	0,25-0,50
Mono e Diacilgliceróis Monoestearato de Glicerila	MAG/DAG	2-5	Excelente	Moderado	0,10-0,50
	Monoestearina	3	Excelente	Moderado	0,30-0,50

Apesar do uso generalizado do método de Griffin, fica aparente que este método não pode levar em consideração muitos efeitos e, assim, faz previsões incorretas frequentemente. (Davies, 1959).

Com respeito à origem dos emulsificantes, estes podem ser naturais, como a lecitina, ou sintéticos, produzidos especialmente a partir de monoacilgliceróis e ésteres de ácido láctico. Os monoacilgliceróis, mais comumente empregados, e o objeto principal deste estudo, pertencem à categoria dos produtos reconhecidos como seguros, apresentando o status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) (Nabeshima et al, 2003; Freitas et al, 2008).

2.3- Monoacilgliceróis

Dentre a classe dos emulsificantes não-iônicos, destacam-se os monoacilgliceróis (MAGs), que são monoésteres anfifílicos, compostos de uma parte hidrofóbica, geralmente constituída por ácidos graxos, e uma parte hidrofílica, representada pelas hidroxilas livres do glicerol (Batte et al, 2007). Os monoacilgliceróis são os compostos mais polares entre os lipídios simples. Sob o ponto de vista nutricional, estes podem ser considerados semelhantes aos triacilgliceróis. Sua digestão é completa e não são estabelecidas restrições quanto à sua ingestão diária. (Grompone, 2010). MAGs contendo ácido oléico demonstraram intenso efeito antioxidante (Waraho et al, 2012), além de atividade antidiabética e antiaterogénica, *in*

vitro e em células, segundo estudos conduzidos por Cho, Hong *et al* (2010). Como mecanismo de ação, tem-se que estes compostos inibem o aumento no nível de triacilgliceróis sanguíneos após as refeições, conforme descrito na patente JP A-1993-310567, mencionada por Takeno, Shimotoyodom *et al* (2009). Estes autores comprovaram que MAGs, tanto *sn*-1(3) quanto *sn*-2, inibem o aumento excessivo do nível de insulina sanguínea após a ingestão de alimentos, mantendo-se sob controle e, conseqüentemente, prevenindo a obesidade e a diabetes (hiperglicemia) (Patente US 2009/0124691 A1).

Dependendo da orientação das moléculas constituintes, os MAGs podem apresentar duas formas isoméricas. O resíduo de ácido graxo pode se posicionar em cada carbono do glicerol, numerados como *sn*-1(3) para a posição no carbono final (α -isômeros) ou *sn*-2 (β -isômeros) para a posição no carbono intermediário (figura 13). Dependendo da origem lipídica, as cadeias carbônicas dos ésteres podem apresentar diferentes estruturas de ácidos graxos: saturados, insaturados, assim como cadeias longas ou curtas (Damstrup, 2008).

Comumente, o isômero de MAG mais encontrado é a forma α -isomérica (1(3)-MAG), na proporção de aproximadamente 9:1 em relação à ocorrência de 2-MAG. Tal razão é explicada pelo fenômeno de acil migração – reações intramoleculares termodinamicamente induzidas. (Laszlo *et al*, 2008).

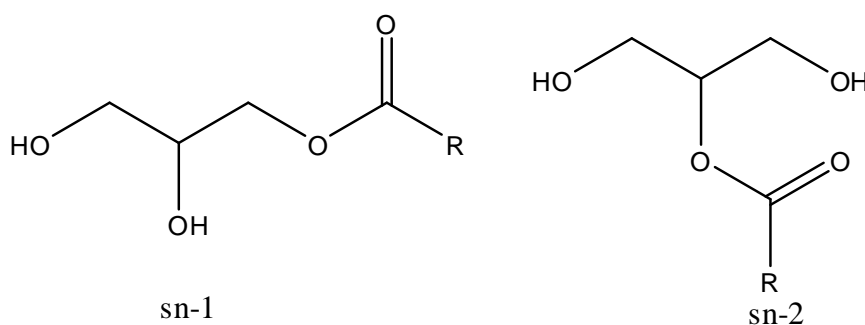


Figura 13: Estruturas químicas dos isômeros de monoacilgliceróis. Adaptada de Mao *et al*, 2013.

Devido às características anfipáticas, os monoacilgliceróis são largamente conhecidos na literatura por serem emulsificantes biodegradáveis, biocompatíveis e não tóxicos (Sjoblom, 2009; Wulff-Pérez *et al*, 2012; Mao *et al*, 2013). Quando em meio aquoso, moléculas anfipáticas tendem a se agrupar formando estruturas esféricas, as micelas, atuando como surfactantes ou emulsificantes, promovendo estabilidade da emulsão por redução da tensão superficial entre as fases aquosa e oleosa.

Tais características permitem que os MAG atuem como emulsificantes, reduzindo a tensão superficial entre as fases oleosa e aquosa de emulsões (Mao *et al*, 2013). Na maioria das

emulsões alimentícias, a fase oleosa é revestida por camadas de materiais adsorvidos (figura 14), que pode ser fosfolipídios, por proteínas, ou emulsificantes e tensoativos, como os MAG. O emulsificante se orienta na interface da emulsão, onde a cauda apolar interage com a fase oleosa, e a cabeça polar, com a fase aquosa (Trivedi & Singh, 2005).

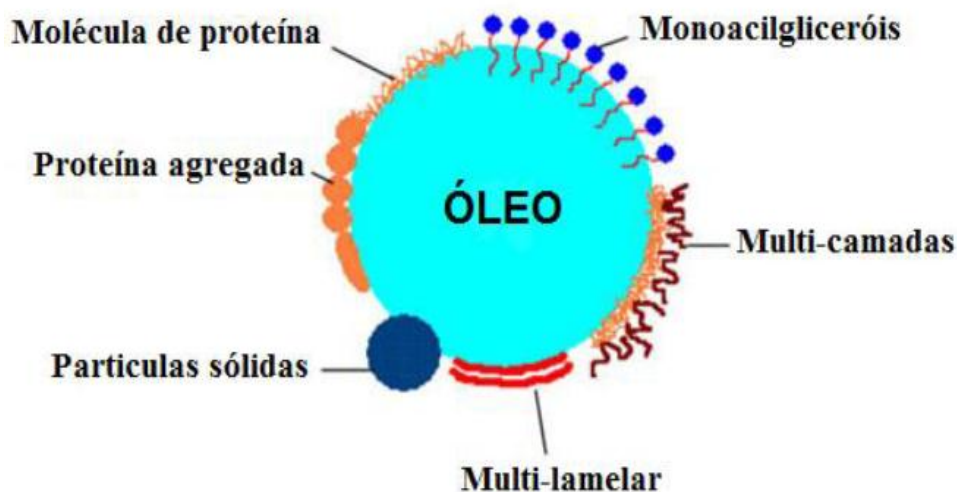


Figura 14: Principais agentes utilizados para a estabilização de emulsões alimentícias. Adaptado de Trivedi & Singh, 2005.

A capacidade de estabilização apresentada pelos MAGs, assim como de qualquer emulgente, depende dos diferentes valores apresentados pelo Equilíbrio hidrofílico e lipofílico (EHL) da molécula (Wulff-Pérez et al, 2012). Quando o emulgente possui EHL entre 4 e 6, possui maior capacidade para estabilizar emulsões água/óleo; aquele de valores médios (8-16) estabilizam emulsões óleo/água. Já emulgente com valores de EHL acima de 15 são bons agentes solubilizantes. Tal propriedade permite que os MAGs possam também ser utilizados com a função de dispersante, espumante, além de agentes molhantes solubilizantes (Mao, 2013).

A capacidade dos MAGs de influenciarem a consistência através da estabilização da emulsão deve-se ao fato destes apresentarem ponto de fusão entre 10 e 20°C acima do ponto de fusão de gorduras e óleos que são compostos dos mesmos ácidos graxos (Wulff-Pérez et al, 2012). Portanto, durante o resfriamento, os MAGs se cristalizam entre a água e o óleo ou gordura.

MAGs possuem diversas aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética, de alimentos, dentre outras, correspondendo a 70% dos emulsificantes utilizados (Camacho et al, 2006), mantendo a textura, umidade e evitando a separação dos ingredientes. Dentre as aplicações do MAG, destaca-se o uso em produtos de panificação, bolos, massas e margarinas, como inibidores da degradação do amido, além de reforçar a estrutura do glúten

em pães e prolongar o frescor do produto. Em massas, permitem a obtenção de uma massa mais firme e menos pegajosa durante o cozimento.

Na indústria de sorvetes podem ser aplicados, principalmente, no controle da cristalização de gorduras (Fregolente et al, 2007). Em bebidas, podem ser aplicados em clarificadores, facilitando a dispersão. Em medicamentos, os MAG facilitam a liberação controlada do ingrediente ativo (Szelag & Zwierzykowski, 2010). Além disso, os MAGs também são utilizados como matéria-prima para a produção de diversos outros tipos de emulsificantes, em que um grupo hidroxila do glicerol é substituído por diferentes tipos de moléculas como ácido acético, láctico, cítrico, tartárico, etc. (Bornscheuer et al, 1998).

Há também o interesse na produção de MAGs mediante alcoólise de triacilgliceróis, para posterior uso como substrato em reação de esterificação para a obtenção de triacilgliceróis estruturados, conforme já investigado na literatura (Bornscheuer et al, 1998).

2.3.1 - Síntese de Monoacilgliceróis

A obtenção de MAG pode ser conduzida via catálise enzimática, geralmente envolvendo lipases, e via catálise química. Neste último caso são descritos na literatura 3 métodos principais, a serem enunciados: I) interesterificação ou glicerólise de triacilgliceróis (TAG) e glicerol; II) esterificação direta entre glicerol e ácidos graxos; III) hidrólise ou alcoólise de TAG (Tüter e Aksoy, 2000).

Desta forma, a utilização de processos enzimáticos pode ajudar a superar problemas como seletividade, e formação de subprodutos, assim como levar a uma abordagem ecológica, através da síntese de MAGs catalisada por lipases, seja por hidrólise seletiva ou alcoólise utilizando lipases 1,3-regioespecíficas, esterificação do glicerol com ácidos graxos e glicerólise de gorduras ou óleos (Pawongrat et al, 2007).

2.3.1.1 - Interesterificação: Glicerólise de TAG e Glicerol (GL)

Normalmente, os MAGs são obtidos por glicerólise (figura 15), um tipo particular de alcoólise, onde moléculas de glicerol reagem com moléculas de triacilgliceróis, sendo conduzida na presença de catalisadores.

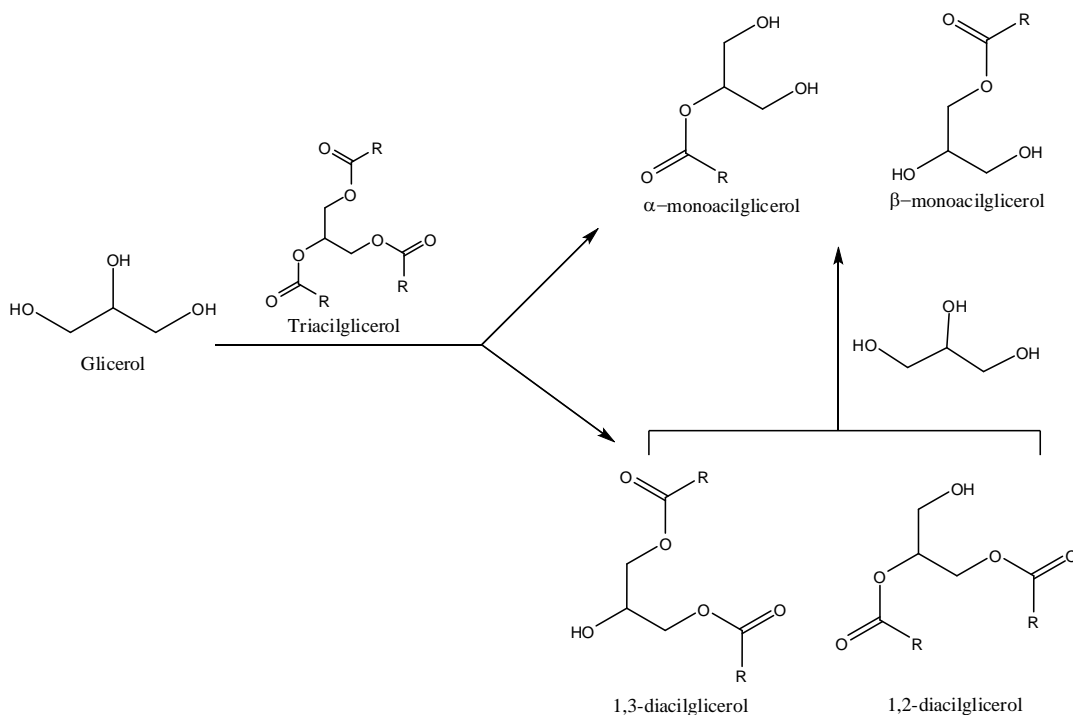


Figura 15: Reações de Glicerólise. Adaptado de Martinez et al, 2005.

Este tipo de reação emprega catalisadores como KOH e NaOH (0,05 – 0,2%), em temperaturas entre 220°C a 250°C, com excesso de glicerol (Tüter & Aksoy, 2000). Além do elevado consumo de energia, as intensas temperaturas aplicadas geram reações de polimerização (Shimizu et al, 2004), responsáveis pela baixa produtividade (muitas vezes com rendimentos inferiores a 50% em MAG) e má qualidade dos produtos levando a colorações escuras e sabor queimado, o que requer etapas posteriores de purificação complexas e onerosas (Martinez et al, 2005; Berger & Schneider, 1992). Dependendo da relação GL/TAG, o conteúdo de MAG após glicerólise pode variar de 10% a 60%. Geralmente, o produto comercial contém 45-55% de MAG, 38-45% de DAG e 8-12% de TAG (Krog, 1997).

O processo químico não é adequado para a obtenção de acilgliceróis parciais contendo ácidos graxos poliinsaturados, já que as altas temperaturas aplicadas na reação prejudicam estes ácidos graxos, os quais são sensíveis ao calor (Damstrup, Jensen *et al*, 2005). Uma opção é realizar a glicerólise química sob baixas temperaturas, com irradiação ultrassônica de baixa frequência, com a possibilidade de introdução de solventes no meio reacional, segundo investigado por Zhong, Li et al (2010).

Atualmente, diversos estudos para a obtenção de MAGs por meio da glicerólise empregam catalisadores enzimáticos. Esta metodologia é caracterizada pelo uso de temperaturas mais brandas e tempo mais longo de reação para atingir bons rendimentos (Maneerat, 2005).

2.3.1.3 - *Catálise Enzimática*

Sistemas livres de solventes para produção de MAG e DAG a partir de reações catalisadas por enzimas têm despertado interesse no intuito de explorar as vantagens desta metodologia alternativa às reações químicas para síntese desses emulsificantes (Fregolente, 2010). Fatores técnicos e regulatórios da FDA e da União Européia têm procurado incentivar o desenvolvimento de processos menos poluentes para a síntese de emulsificantes, especialmente para aqueles usados em aplicações farmacêuticas ou de alimentos (Otero et al, 2001). Do ponto de vista ambiental, o processo enzimático é tecnicamente mais limpo e seguro (Börjesson e Härröd, 1999). Embora o custo das enzimas ainda seja um fator limitante que dificulta a produção industrial em larga escala de MAG e DAG por vias enzimáticas, por outro lado este método traz vantagens.

Os estudos de reações enzimáticas para produção de MAG e DAG se dividem em dois tipos de sistemas: livres ou com presença de solventes orgânicos. Um sistema livre de solventes apresenta longos tempos de reação e baixa conversão dos reagentes (30 – 50%), geralmente atribuídos à baixa miscibilidade do glicerol hidrofílico com o óleo lipofílico a baixas temperaturas (40 a 50 °C) (Fregolente, 2010). Entretanto, um sistema com solvente melhora a miscibilidade do meio reacional, proporcionando um sistema completamente homogêneo, propiciando uma melhor interação enzima/glicerol/óleo e, conseqüentemente, aumentando o rendimento da reação. Verificou-se que a adição de terc-butanol/terc-pentanol em uma reação de glicerólise enzimática com óleo de girassol e lipase de *Cândida antártica* propiciou uma conversão de MAG de 72% em apenas 2 horas de reação, a 50 °C (Damstrup et al, 2005). Do mesmo modo, utilizando terc-butanol, Yang et al (2005) obtiveram 75% de MAG a partir da glicerólise enzimática.

No entanto, quando se trata da obtenção de MAG e DAG para fins alimentícios são raras as utilizações de solventes na mistura óleo e glicerol, especialmente devido às etapas de separação deste solvente e quanto à segurança devido à toxicidade do produto (Yang et al, 2005, citado por Fregolente et 2007). É desejável que a produção de aditivos destinados às

indústrias alimentícias e farmacêuticas siga as recomendações de segurança. Apenas n-hexano, acetona e etanol são permitidos nas indústrias de processamento de alimentos. Além da preocupação em obter produtos alimentícios seguros e livres de solventes, sob o aspecto ambiental, a não utilização de solventes em processos é desejável, uma vez que evita etapas subsequentes para eliminação do solvente do produto como também evita a geração de resíduos tóxicos.

Dentro das reações enzimáticas que têm sido exploradas estão:

- 1) hidrólise ou alcoólise de triacilgliceróis;
- 2) glicerólise de triacilglicerol
- 3) esterificação ou transesterificação de glicerol com ácidos graxos livres ou ésteres.

O primeiro método produz preferencialmente 2-MAG enquanto que os outros geralmente produzem predominantemente 1(3)-MAG (Bornscheuer, 1999).

A hidrólise enzimática usando lipases oferece um processo alternativo para a produção de MAG e DAG em condições moderadas, requerendo, entretanto, um controle rígido da reação para evitar uma hidrólise completa. A hidrólise ou alcoólise de triacilgliceróis catalisada pela lipase 1,3 específica produz 2-MAG, com rendimentos de até 78%.

Migrações de grupos acila provavelmente limitam o rendimento da reação, uma vez que 1(3)-MAG formados podem sofrer reações adicionais de hidrólise. Por outro lado, a alcoólise pode ser conduzida em solventes não-polares onde a migração de grupos acil é mais lenta. Por esta razão, a alcoólise de triacilgliceróis apresenta maiores rendimentos, cerca de 75 a 97% em relação à hidrólise (Fregolente, 2007).

Reações de alcoólise são, geralmente, mais rápidas por não apresentarem alteração no pH durante a reação e, assim, há uma menor inibição das lipases pelos ácidos graxos. A adição de álcool em excesso desloca o equilíbrio da reação na direção da formação de monoacilgliceróis (Bornscheuer, 1999).

2.3.1.3.1 - Esterificação de glicerol com ácidos graxos livres ou ésteres para produção de 1(3)-MAG.

Neste método, a mistura reacional contém compostos polares que promovem a migração de grupos acil, onde, no equilíbrio químico, há formação predominante de 1(3)-MAG.

Quando lipases não específicas são empregadas, o glicerol pode ser esterificado na posição 1 ou 3, podendo formar 1(3) MAG e 2 MAG; 1,3 e 1,2 DAG e TAG. Para deslocar a reação em direção à formação de MAGs, pode-se remover a água ou o álcool do sistema utilizando vácuo. A baixa solubilidade do glicerol em solventes orgânicos não-polares prejudica o rendimento da reação. Assim, para minimizar este problema, pode-se utilizar a formação de micelas ou adicionar solventes polares ao sistema reacional (Bornscheuer, 1999).

Na tese de doutorado de Fregolente (2010), além do trabalho publicado por Kaewthong (2007), há referências do trabalho de Pereira et al (2004), que utilizaram um planejamento experimental para determinar quais as condições ótimas para produção de monolaurina a partir de esterificação direta de ácido láurico e glicerol, num sistema livre de solventes utilizando como biocatalizador a enzima imobilizada *Rhizomucor miehei*. As condições ótimas foram 55 °C, razão molar de ácidos graxos livres e glicerol de 1:1 e 3% em massa de enzima, obtendo-se, após 6 horas de reação 45,5% (p/p) de monolaurina; 26,8% (p/p) de dilaurina; 3,1% (p/p) de trilaurina e 24,6% (p/p) de ácido láurico. Da mesma forma, Silva et al (2007) obtiveram 61,5% (p/p) de monocaprina a partir da esterificação direta de ácido cáprico e glicerol.

2.3.1.3.2 - *Interesterificação enzimática de TAGs*

MAG e DAG não são produzidos pela rota de interesterificação; são observadas apenas transformações de óleos e gorduras. Trata-se da substituição de ácidos graxos esterificados ao glicerol pela reação química entre um triacilglicerol (TAG) e ácidos graxos. Nessa reação, seja ela química ou enzimática, há a formação de um novo triacilglicerol estruturado, que adquire novas propriedades organolépticas, físicas e químicas. A interesterificação é usada como método alternativo à hidrogenação de óleos vegetais para a produção de margarinas e similares, como alternativa às gorduras *trans* (Adhikari e Adhikari, 1992).

2.3.1.3.3 - Glicerólise de triacilgliceróis para produção de 1(3)-MAG.

Na glicerólise enzimática são obtidos MAG e DAG, a partir da esterificação do glicerol com TAG. Neste método, utiliza-se o glicerol como álcool, e, deste modo, os três ácidos graxos podem ser aproveitados.

Como a glicerólise de TAG apresenta baixo rendimento, geralmente de 30 a 50% de monoacilgliceróis no equilíbrio químico (Fregolente, 2010 ao citar Harmeier, 1997), devido ao equilíbrio desfavorável da reação, diversas estratégias são adotadas para deslocar o equilíbrio no sentido desejável da reação, entre as quais são destacadas: presença ou ausência de solventes orgânicos, sistemas em estado sólido e micelas reversas (Bornscheuer, 1999). Nouredini e Harmeier (1997) testaram sete enzimas na glicerólise enzimática de óleo de soja. Dentre essas, a *Pseudomonas sp.* e *Rhizopus oryzae* apresentaram maior rendimento de MAG, cerca de 30 a 35% molar a 40°C e 1 hora de reação.

Kaewthong et al (2005) utilizaram um reator do tipo CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactors*) para produção contínua de MAG pela glicerólise do óleo de palma utilizando enzimas imobilizadas. *Pseudomonas sp.* e *Cândida rugosa* apresentaram produção de MAG de 50% em 6 horas de reação contínua a 30°C.

Quando se utiliza gordura animal para obter MAG a partir da glicerólise enzimática, é possível utilizar o processo de cristalização dos MAG, aumentando, assim, a conversão, uma vez que a temperatura de cristalização (TC) de MAG obtidos a partir de gordura animal é cerca de 30 a 45 °C, enquanto que a TC para MAG obtidos a partir de óleos vegetais está em torno de 5 a 10°C. Segundo Mc Neil et al (1990), a glicerólise foi conduzida em uma emulsão de glicerol e triglicerídeo e, então, resfriada para a cristalização dos MAGs. Com este método o rendimento da reação aumentou de 30% nas primeiras 25 horas de reação e 50°C, para 70% após 50 horas à 40°C. Esta cristalização também aumenta as quantidades relativas de 1(3)-MAG sobre 2-MAG. Além da cristalização, pesquisadores têm utilizado membranas para retirada dos MAG do meio reacional e assim aumentar a produção de MAG.

2.3.2 - Patentes para a produção de monoacilgliceróis por catálise enzimática

A modificação de lipídios por processo enzimático é uma tecnologia nova em relação à modificação química de óleos e gorduras. O crescente número de pesquisas na área de biotransformação de lipídios permitiu o aumento do conhecimento sobre a ação das lipases, embora a aplicação desta tecnologia ainda seja limitada nas indústrias (Xu, 2004). Este autor cita que a catálise enzimática está sendo utilizada já há alguns anos para a obtenção industrial de monoacilgliceróis. Entretanto, de 2004 a 2013, não houve aumentos significativos de patentes envolvendo tal produção.

Um processo para a produção de monoacilgliceróis mediante a glicerólise enzimática de óleos foi descrito em uma patente publicada por McNeill, Yamane *et al* (1991). Nesta invenção, a glicerólise é conduzida em uma emulsão líquido-líquido e a separação do produto de interesse é feita no estado sólido.

Na patente US 5935828 da *Opta Food Ingredients, Inc.*, é denotada a produção de MAGs obtidas majoritariamente com ácidos graxos ômega-3. O processo envolve duas etapas, sendo a primeira, uma alcoólise de triacilgliceróis provenientes de um óleo de origem marinha rico em ácidos graxos ômega-3. Esta reação é catalisada pela lipase de *Pseudomonas fluorescens*. (Feltres 2012). Nas condições descritas no processo, a transesterificação gera no mínimo 90% de 2-monoacilgliceróis. Após a reação, adiciona-se acetona à mistura acetona, a qual é capaz de solubilizar os monoacilgliceróis insaturados e, com a redução da temperatura do sistema, ocorre cristalização da fração contendo os monoacilgliceróis saturados. Separa-se em seguida o sobrenadante, do qual o solvente é removido, obtendo-se finalmente um alto teor de 2-monoacilgliceróis contendo no mínimo 60% de ácidos graxos ômega-3. Na sequência, os monoacilgliceróis obtidos podem ser utilizados como substrato para a obtenção de triacilgliceróis ricos em ômega-3 (Zaks e Gross, 1999, citado por Feltres, 2012).

O trabalho de Feltres (2011) descreve também uma patente publicada pela Danisco descreve a produção de monoacilgliceróis mediante a glicerólise em fase sólida de uma mistura de gordura hidrogenada, glicerol, lipase e, opcionalmente, lecitina (Danisco, 2005).

Schorder e Oba (1992) desenvolveram uma patente (US5153126), a qual descreve um método para a preparação de monoacilgliceróis de alta pureza, com separação dos monoacilgliceróis por resfriamento e precipitação.

Já a empresa Procter & Gamble, segundo Hiler *et al* (1992), também produziu uma patente, onde há a descrição de um processo de hidrólise seletiva de triacilgliceróis para a

obtenção de 2-monoacilgliceróis, propícios para a produção de 1,2-diacilgliceróis ou 2,3-diacilgliceróis, via esterificação.

2.3.3- A Monoestearina

Dentre os MAGs, a monoestearina (MONOEST), ou monoestearato de glicerila (figura 16) se destaca devido a sua ampla aplicação geralmente como aditivo em doces, bolos, cremes, e pães, pois além de sua função emulgente, apresenta características dispersantes, anti-espumante, anti-mofo, melhorando a preservação e a proteção contra a degradação lipídica (Batte et al, 2007).

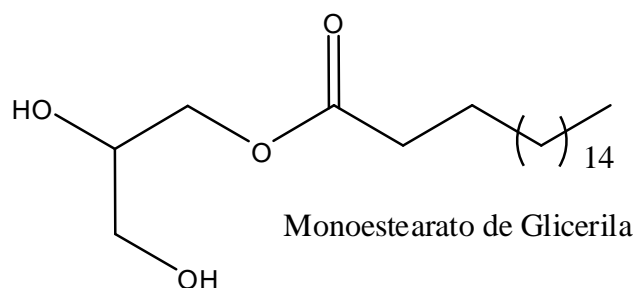


Figura 16: Estrutura química do monoestearato de glicerila.

É também utilizado em doces e chocolates, a fim de evitar a cristalização de açúcares e evitar separações entre óleo e água. Pode aumentar o brilho e aspecto requintado do produto final (Gustone, 1999). Por suas características anfifílicas e consistência sólida a temperatura ambiente, a monoestearina é largamente utilizada pela indústria cosmética como agente de consistência em cremes e loções. Por ser um surfactante não-iônico e de considerável hidrofobicidade, tem sido o surfactante de primeira escolha em sistemas para liberação controlada de drogas. Muller et al (2002a; 2002b) ressaltam a importância da monoestearina como revestimento em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), a fim de superar as limitações das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) convencionais, para a veiculação de fármacos. Tais limitações incluem a carga limitada de fármacos e a expulsão destes durante o armazenamento. De Souza et al (2007) avaliaram a viabilidade da utilização de partículas lipídicas sólidas de monoestearato de glicerila, produzido por fluido supercrítico, como transportadores de cafeína. As partículas produzidas foram investigadas quanto ao tamanho e distribuição através de analisadas por difração de laser, além de microscopia eletrônica de varredura para a avaliação da morfologia. Os melhores resultados foram obtidos a 13 mPa e 335 K. As partículas apresentaram tamanho médio de 5,49 nm. Nesta mesma linha, Fredrick

et al (2013) estudaram diversos surfactantes para a preparação de nanopartículas de gentamicina para veiculação oral, onde a monoestearina apresentou maior ação tensoativa, conferindo maior estabilidade aos produtos. Batte et al (2007) estudaram o efeito das condições de processamento na formação e estabilidade de um gel composto por óleo, água, monoestearina e ácido esteárico. A monoestearina teve importante papel na formação e distribuição uniforme da formulação, ressaltando suas propriedades emulsionantes. Além disto, com a presença de monoestearina, a temperatura de geleificação foi inferior. Shen et al (2008) descreveram maior estabilidade em cremes e loções quando a monoestearina foi empregada como surfactante, em comparação a outros tensoativos não-iônicos.

A monoestearina, assim como grande parte dos MAGs, também é de grande importância na química orgânica sintética uma vez que são utilizados como intermediários sintéticos e como blocos de construção quiral. Além disso, o monoestearato de glicerila é considerado seguro pelo *Food and Drug Administration* (FDA), aumentando o interesse no seu uso e no desenvolvimento de novos métodos sintéticos (Saadi et al, 2011).

Adicionalmente, as propriedades plastificantes e lubrificantes da monoestearina permitem o seu uso em processos têxteis e de formulação de óleos para diferentes tipos de máquinas.

2.3.3.1 - Síntese de Monoestearina

Na literatura, são escassos os trabalhos onde a síntese de monoestearato de glicerila é produzida. Mais especificamente, somente dois trabalhos envolvem este processo.

Hess e colaboradores (1995) estudaram a transesterificação do IPG com o estearato de etila, para a formação direta do monoacilglicerol protegido correspondente. Esta reação foi catalisada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* (LPS AP 08530; 30,000 Ug⁻¹). Dentre os solventes testados, as maiores velocidades iniciais de reação foram encontradas em n-heptano e n-dodecano, sendo a maior conversão encontrada em n-heptano (84%). A atividade residual da lipase foi 85% da atividade inicial após 600h de reação, tempo para a obtenção dos melhores resultados. Os acetais do produto foram clivados, e a monoestearina obtida, confirmada por elucidção estrutural via ¹H-RMN e ¹³C-RMN, além das técnicas bidimensionais, tais como HMBC, COSY, APT.

Já Pouilloux et al (2000) estudaram a esterificação do ácido esteárico diretamente com o glicerol, através da comparação catalisadores básicos, como MgO, ZnO, e Na₂CO₃, objetivando a produção de monoestearina. Como resultado, o ZnO foi capaz de fornecer conversões de até 85% em MAG, seguido do MgO. O Na₂CO₃ provocou a formação de

sabão. Além disto, foi investigada a influência de quatro solventes diferentes, sendo eles o tolueno, o dimetilsulfóxido, a N, N-dimetil-formamida e o bis (2-metoxietil) éter. Como resultado, os dois últimos resultaram em 100% de seletividade para monoacilgliceróis em 16h.

Tendo-se em vista a escassez de dados na literatura que reportem a produção específica de monoestearato de glicerila, aliadas às novas tecnologias existentes para a catálise enzimática, o presente trabalho faz-se de extrema importância, como forma de estudo de novas rotas para a produção deste importante insumo comercial.

2.4 - Sistemas Microemulsionados

As microemulsões (MEs) podem ser definidas como sistemas transparentes, formados pela mistura entre as fases aquosa e orgânica (também dita oleosa), termodinamicamente estabilizadas pela presença de tensoativos, e em alguns casos, co-tensoativos. A fase em maior quantidade é denominada de fase contínua, dispersante ou externa, e a outra fase é chamada de fase descontínua, interna ou dispersa. Estes sistemas são geralmente caracterizados como sistemas coloidais, cujas gotículas da fase dispersa formam agregados esféricos com diâmetros variando de 5 a 120 nm, enquanto que o diâmetro das gotículas de uma macroemulsão é da ordem de 0,1 μm a 100 μm . Estes tamanhos de partícula representam aproximadamente a quarta parte do comprimento de onda da luz incidente e, portanto, as ME não são capazes de espalhar luz, sendo opticamente transparentes (Lawrence & Rees, 2000). As principais diferenças entre as emulsões (EM) e as MEs são que as primeiras devem apresentar excelente estabilidade física do ponto de vista farmacêutico, mas são fundamentalmente instáveis termodinamicamente, estando mais propensas a efeitos de floculação, cremeação e separação das fases. Além disso, quanto à aparência, as emulsões são turvas ou opacas, enquanto que MEs são transparentes ou semitransparentes (Lawrence et al, 2000).

Dois tipos de MEs podem ser formados, O/A (fase aquosa em maior quantidade) e A/O (fase orgânica ou oleosa em maior quantidade), além de estruturas bi contínuas em que água e óleo estão separados por uma monocamada de tensoativo (Figura 17, por Correa et al, 2005).

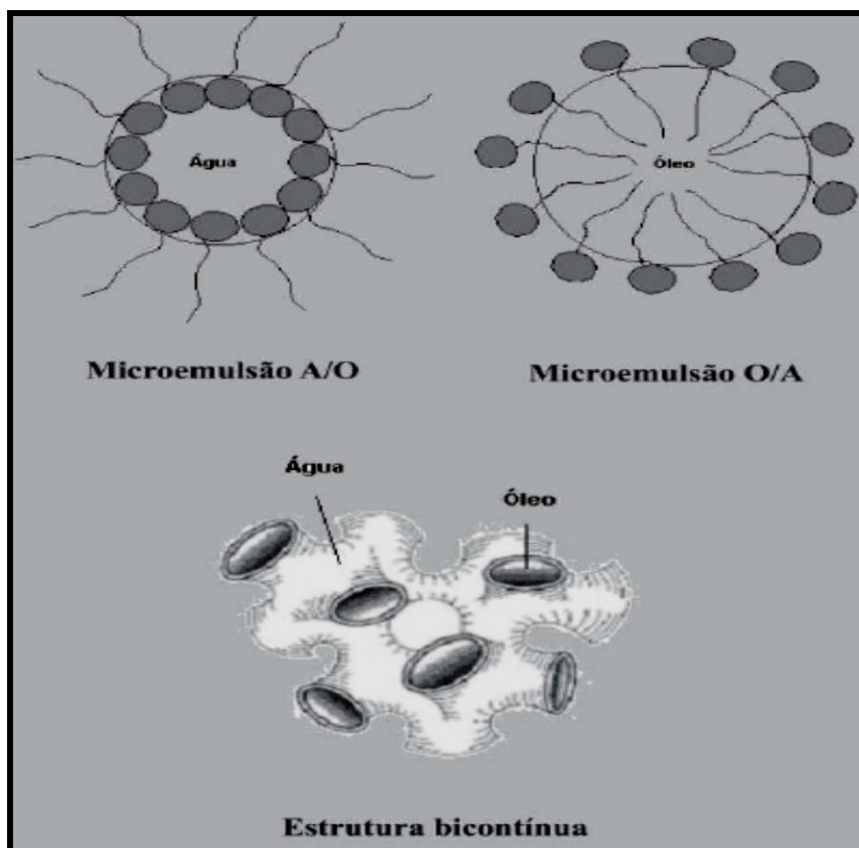


Figura 17: Estrutura das Microemulsões. Correa et al, 2005.

Segundo Franzini (2010), A possibilidade de formar microemulsão depende do balanço entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas do tensoativo, determinada não somente pela sua estrutura química, mas também por outros fatores como temperatura, força iônica e a presença de co-tensoativos. A mistura de tensoativos com equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) adequado proporciona a condição máxima de solubilização das fases orgânica e aquosa. Assim, a formação da microemulsão geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como tensoativo, água, óleo e, quando necessário, o co-tensoativo sendo que a orientação para sistemas O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo e do óleo, da relação entre as proporções tensoativo/co-tensoativo e entre as proporções água/óleo (Formariz et al, 2005). Dentre as microemulsões A/O, destacam-se as micelas reversas, as quais apresentam grande interesse biotecnológico, com a possibilidade de dissolver e solubilizar biocatalisadores, proporcionando reações químicas *in-situ*.

2.4.1- Micelas Reversas.

Micelas reversas (figura 18) consistem de microemulsões A/O onde o micro-domínio aquoso é retido através de interação com as cabeças polares de uma molécula anfipática, a qual rodeia este cerne, interagindo com o solvente orgânico (fase dispersante) através de suas caudas hidrofóbicas (Roche et al, 2013), diferentemente das micelas comuns, onde as moléculas de origem lipídica ou orgânica se organizam no interior destas estruturas, organizadas em ambientes majoritariamente aquosos.

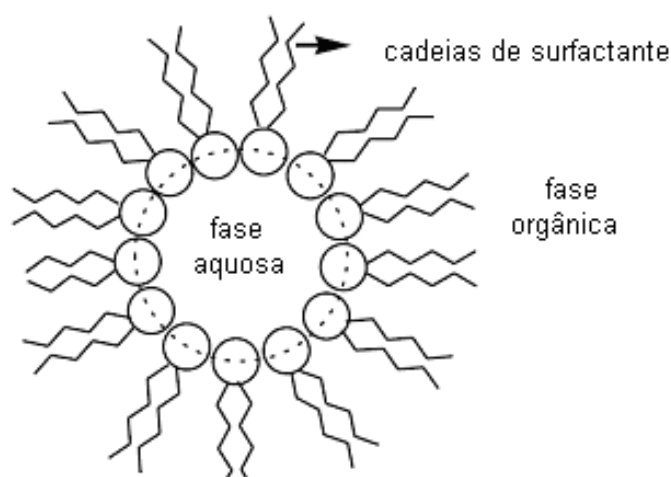


Figura 18: Representação esquemática de uma micela reversa. Fonte Fernandes et al, 2004.

O uso de micelas reversas como alternativa para solubilizar enzimas e substratos tem atraído diversos autores nas últimas décadas, pois fornecem uma fase aquosa para as enzimas hidrófilas, uma interface para a ativação de enzimas de superfície, como lipases, e uma fase orgânica para substratos ou produtos hidrofóbicos. Neste sistema, as enzimas podem ser ativas na conversão de compostos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos, com posterior dissolução dos produtos finais. Uma grande variedade de enzimas, incluindo aquelas dependentes de cofatores, têm sido utilizadas com sucesso em diversas reações enzimáticas, principalmente aquelas onde os substratos ou produtos são de baixa polaridade, ou ainda, quando se necessita de baixo teor de água para um bom desempenho reacional (Klibanov, 2001; Kundu & Paul, 2013). Além disso, a formação de uma extensa área interfacial faz com que as micelas reversas sejam amplamente utilizadas em biocatálise envolvendo lipases, já que estas são ativadas na presença de uma interface óleo/água (Lu et al, 2013). A grande área interfacial formada nestas microemulsões resulta em um maior número de moléculas de substrato disponível para reagir, além de grande superfície de contato com o biocatalisador.

Os núcleos polares das micelas reversas possuem a capacidade de acomodar uma quantidade significativa, e ao mesmo tempo, limitada, de água, o que depende das propriedades do sistema micelar formado (Lu et al, 2013). Desta forma, enzimas em micelas reversas podem ser protegidas de efeitos deletérios dos solventes orgânicos, pois estas tendem a se localizar preferencialmente no microambiente aquoso, a qual oferece água suficiente para manutenção de sua estrutura catalítica ativa, e reagem com o substrato presente na fase orgânica, embora o grau de interação com a interface do surfactante seja variável e de considerável importância. Esta localização é preferível, visando proteger a enzima de efeitos adversos do solvente orgânico (Hart et al, 2013).

No que tange reações enzimáticas, os sistemas micro-heterogêneos, como as micelas reversas, apresentam uma série de vantagens sobre os sistemas de duas fases convencionais: Uma vez que a enzima é espacialmente separada da fase orgânica a nível molecular, esta é protegida contra os efeitos nocivos conhecidos dos solventes orgânicos, como a desnaturação e desidratação (Formariz, 2005). A enzima localizada em um microambiente essencialmente aquoso apresenta uma melhor atividade se comparada com os microambientes orgânicos; Devido a suas pequenas dimensões (na escala 2-20Å), as microemulsões finais são opticamente transparentes e passíveis de estudos físicos e químicos através de técnicas diversas; A quantidade de água em micelas reversas pode ser controlada com precisão, regulando-se o volume de fase aquosa necessária para comportar de forma ideal um biocatalisador; A natureza ideal da interface óleo-água pode ser alcançada através da seleção das moléculas de surfactante, sozinhas ou em combinação com co-surfactantes, já que uma grande variedade destes são comercialmente disponíveis (Xenakis et al, 1993; Xenakis et al, 1997; Das et al, 2013). Micelas reversas com reproduzíveis propriedades estruturais podem, portanto, ser preparadas manipulando-se as moléculas constituintes, e a polaridade da interface (Dukhin & Parlia, 2013). Tais variações podem influenciar a atividade enzimática, sua seletividade ou até mesmo o acesso ao substrato. Finalmente, o sistema de micelas reversas é passível de aumentos de escala em processos de biossíntese.

2.4.1.1 – Surfactantes

Micelas reversas podem ser formadas pelo uso de surfactantes neutros (Das et al, 2013), como as séries de Brij e Tween, catiônicos (sais de amônio quaternário de cadeias longas) ou até mesmo aqueles aniônicos, como o bis-(2-etilexil)-sulfocinato de sódio, AOT (Lu et al, 2013). Todos eles em solventes apolares contendo pequenas quantidades de água. Estes surfactantes podem ser usados isoladamente ou combinados a co-surfactantes (Lu et al,

2013). Embora haja uma grande disponibilidade comercial de surfactantes, não há um consenso na literatura acerca da melhor classe a ser aplicada, visto que a formação e estabilidade deste nanossistema depende das características físicas e químicas de ambas as fases componentes, da concentração de surfactante, do pH do tampão utilizado e da razão água/surfactante (W0) entre outras (Ruckenstein & Karpe, 1991).

Um dos surfactantes mais comumente usados no preparo de micelas reversas é o bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio (Aerossol OT ou AOT – figura 19), ou docusato de sódio. Um mínimo de sete moléculas de água são necessárias para hidratar cada molécula de AOT em um solvente orgânico, enquanto que em micelas reversas em equilíbrio com uma fase aquosa, há cerca de 55 moléculas de água por molécula de AOT. Sua grande utilização em micelas reversas é devido às suas diversas vantagens como agregação espontânea, estabilidade termodinâmica, a não necessidade de co-surfactantes adicionais, além da ampla possibilidade de concentrações utilizadas (figura 20).

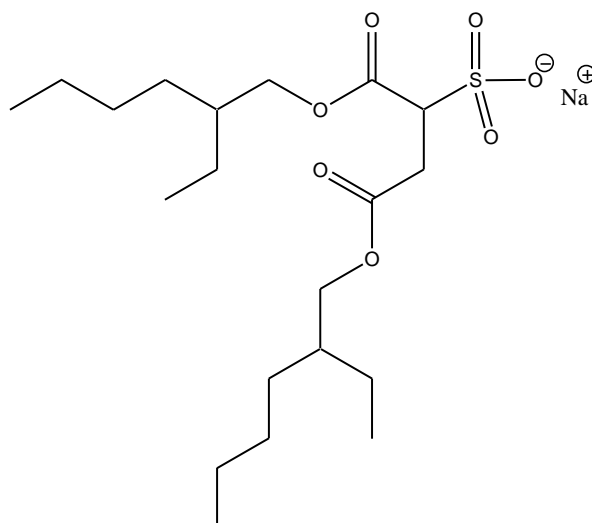


Figura 19: Estrutura química do bis (2-etilhexil)sulfosuccinato de sódio (AOT).

O tipo de surfactante utilizado para formar a micela reversa pode influenciar intensamente a medida a atividade da enzima (Uskoković et al, 2007). Yahmada et al (2003) estudaram atividade hidrolítica em sistema micelar em AOT/Isooctano com a lipase de *Chromobacterium viscosum*, e constataram significativo aumento na atividade lipásica quando surfactantes não-iônicos, como Triton e alguns Tweens foram adicionados às microemulsões.

Sabe-se também que a combinação de surfactantes neutros a catiônicos aumenta a atividade enzimática na interface da micela reversa. Shome, Roy & Das (2007) estudaram a influência de diferentes surfactantes não-iônicos na interface de microemulsões água/óleo e

as possíveis alterações na atividade enzimática. Como resultados, verificou-se um grande aumento da atividade da lipase de *Chromobacterium viscosum* em micelas reversas preparadas por CTAB e surfactantes não-iônicos tais como Brij-92, Brij-30, Tween-20 e Tween-80.

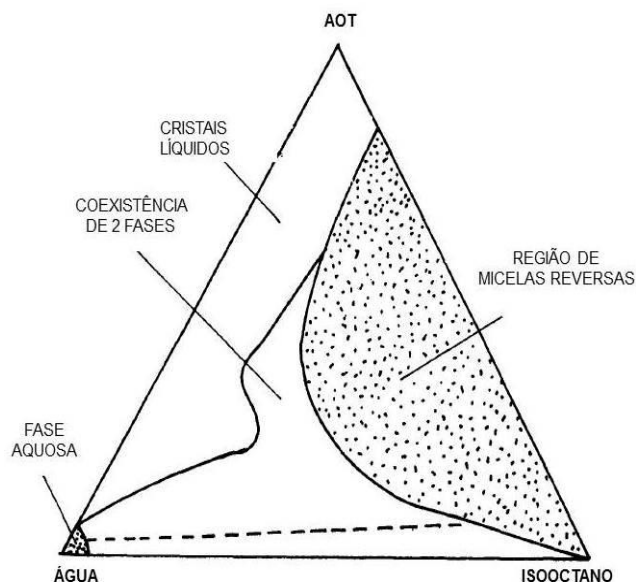


Figura 20: Diagrama de fases do sistema micelar em AOT/Isooctano/água. Adaptado de Tapas e Maitra, 1995)

Surfactantes sujeitos a decomposição podem afetar a qualidade de microemulsão. O AOT, por exemplo, além de adsorver grandes quantidades de água do ar, é um diéster e pode facilmente sofrer hidrólise. O processo de hidrólise é acelerado quando o armazenamento ocorre durante longos períodos de tempo e especialmente em altas temperaturas.

2.4.1.2 - Lipases em Micelas Reversas

Reações enzimáticas em micelas reversas têm ganhado grande importância atualmente devido às suas vantagens sobre sistemas enzimáticos em fase orgânica e aquosa, especialmente em reações de hidrólise, esterificação, assim como em sínteses e transesterificações de glicérides. A característica principal das lipases reside no fato delas atuarem na interface lipídio/água (ou na interface solvente apolar, como isooctano/água) e de não atuarem no interior da fase orgânica (Zoumpantoti et al, 2006). Desta forma, atividade lipásica pode ser melhorada pela sua incorporação em micelas reversas, já que estes sistemas possibilitam o biocatalisador se localizar em um microambiente compatível com sua conformação original. Além disto, os sistemas de micelas reversas fornecem uma interface de

grande porte para as lipases (Das et al, 2013), e desta forma, estas podem atuar em seu potencial catalítico máximo (Stamatis, Xenakis & Kolisis, 1999; Xue et al, 2013). Diversas teorias têm sido desenvolvidas para explicar o aumento observado de atividade na presença de uma interface (Kundu & Paul, 2013).

É importante ressaltar que pouco são os estudos onde se investigam o tamanho (e o peso molecular) médio das nanopartículas formadas e sua relação com a atividade e estabilidade de lipases em micelas reversas. Estudos de absorção por fluorescência em sistemas contendo surfactantes (Del-Val & Otero, 1998) e outros com medidas de viscosidade e dispersão dinâmica de luz (do inglês “Dynamic Light Scattering” – DLS) têm sido publicados. Algumas diferenças observadas no comportamento de vários tipos de lipases sobre a sua especificidade com o substrato foram atribuídas a vários sítios de solubilização destas na micela reversa. A lipase de *Penicillium simplicissimum* mostrou-se perto da camada de surfactante, enquanto lipases de espécies do gênero *Rhizopus* sp. estiveram mais próximas do domínio aquoso. Alguns estudos estruturais utilizando espalhamento dinâmico de luz (Hayes, D. G., 1993) ou de fluorescência (Xenakis et al, 1993) indicaram que a presença de lipase ou dos substratos envolvidos não alterou significativamente a estrutura das micelas reversa. Estudos realizados por Stamatis et al (1993) demonstraram que lipases em micelas reversas podem apresentar diferentes graus de especificidade para diversos substratos, as quais diferem de reações catalisadas pelas mesmas lipases em outros sistemas. A localização da enzima no âmbito dos diferentes microcompartimentos do sistema de microemulsão água/óleo foi tida como a principal causa desta diferença (Hayes & Gulari, 1993; Xenakis et al, 1993).

Naoe et al (2001) investigaram a esterificação do ácido oléico em álcool octílico catalisada pela lipase de *Rhizopus delemar* em sistema de micelas reversas. Neste trabalho, uma alta taxa de reação inicial foi obtida através da preparação da fase orgânica micelar com baixo teor de água ($W_0 = 2,5$). A temperatura ideal para a atividade da lipase foi de 40° C. A energia de ativação aparente da esterificação do sistema foi de 43,7kJ/mol. Já em 2007, o mesmo grupo investigou as possíveis modificações estruturais da lipase de *Rizhomucor miehei* e o tamanho das micelas reversas catiônicas formadas a partir do brometo de cetiltrimetilamônio catiônico (CTAB). Análises em dicroísmo circular revelaram que a lipase foi de fato encapsulada pelo sistema micelar reverso. Neste caso, nenhuma alteração na estrutura enzimática foi observada com os solventes orgânicos utilizados. A elipticidade da lipase solubilizada, analisada em UV, diminui acentuadamente com o aumento do teor de água (quantidade de água (W_0) = razão molar de água para CTAB), indicando que a estrutura secundária de lipase é alterada com o teor de água. A correlação linear entre o W_0 e o

tamanho da micela foi obtido por medidas de espalhamento dinâmico de luz. A partir da correlação linear entre o tamanho das micelas e W_0 , a estrutura de ordem superior da lipase solubilizados parece ser afetada diretamente pela a interface micelar. O tipo e concentração do álcool como co-solvente teve um efeito sobre a estrutura inferior da lipase. Especialmente, em razão de 1-pentanol a CTAB de menos de 8, as estruturas secundárias e terciárias da lipase foram preservados nas micelas reversas. A concentração de CTAB teve pouco efeito sobre a estrutura da lipase nas micelas.

Yahmada et al (2003) estudaram a modificação do sistema micelar reverso composto por AOT/água/isooctano, por diversos aditivos a fim de melhorar a atividade e estabilidade da lipase de *Chromobacterium viscosum*. Polipropilenoglicol, polipropilenotriol, propoxilato de glicerina e polietilenoglicol de alto e baixo peso molecular, aumentaram significativamente a atividade da lipase. O polietilenoglicol de baixa densidade (PEG 400) foi considerado o mais eficaz. Análises realizadas em espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) sugeriram que as moléculas de PEG 400 participariam da redistribuição de água no interior das micelas reversas, através de forte interação com os grupos de polares (SO_3) de surfactante aniônico AOT. Dados de desativação cinética a 25°C indicaram que a lipase de *C. viscosum* foi aprisionada de modo bastante estável em micelas reversas contendo preso AOT/PEG 400, pois mantiveram mais de 75% de sua atividade inicial após 60 dias, enquanto o tempo de semivida de forma micelas reversas simples em AOT foi de 38 dias.

Moniruzzaman et al (2006) estudaram a modificação de micelas reversas compostas por AOT, isooctano, e água, através da adição de solventes apróticos. Além disso, avaliou-se o impacto dessas sobre a atividade, estabilidade e cinética da lipase de *Chromobacterium viscosum* solubilizada nesse sistema. Dos sete solventes apróticos testados, o dimetilsulfóxido (DMSO) foi o mais eficaz: Apurou-se que a atividade da lipase foi reforçada pela otimização de alguns parâmetros relevantes, tais como razão molar água/AOT (W_0), pH e concentração de surfactante. Uma maior estabilidade da lipase foi encontrada em micelas reversas de AOT com DMSO em comparação com o AOT em sistemas simples, com meia-vida de 125 e 33 dias, respectivamente. Yao et al (2002) estudaram a estabilidade da lipase de *Cândida rugosa* em micelas reversas formadas por AOT / isooctano. Observou-se que a lipase foi desativada para um estado estável, porém, não por completo. A atividade residual da lipase, após atingir o estado estável nas micelas a 30°C, pH 7.0, $W_0 = 8,0$ foi de apenas 15% da atividade inicial. A estabilidade da lipase foi maior quando o ácido oléico foi adicionado. Acredita-se que há uma proteção da enzima pelo ácido, devido ao fato de o complexo de ácido oléico–lipase não ter sofrido decaimento. O modelo cinético de desativação lipase na solução micelar AOT /

isooctano, incluindo a influência do ácido oleico foi estabelecido, mostrando que o aumento da estabilidade da enzima pelo ácido oléico pode ser medida quantitativamente pela constante de dissociação do complexo ácido oléico-lipase, que foi determinada por experimentos de inibição do produto. Fernandes et al (2004) estudaram a cinética de hidrólise da tributirina e trioleína e da síntese de laurato de etila a partir da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em micelas reversas de AOT/Isooctano. Esta enzima está contida em uma preparação comercial (Lipolase®). A atividade lipolítica contra trioleína dependia fortemente do conteúdo de água no sistema ($W0 = [H_2O] / [AOT]$). As melhores condições para atividade enzimática foram pH 8.0 e 37°C. A enzima não foi estável em temperaturas de 37-60°C, perdendo cerca de 50% de sua atividade após 30 min. As variáveis mais importantes foram o pH e temperatura e seus efeitos combinados. As melhores condições para a síntese de ésteres foram um W0 de 10, um pH de 5,6, relação molar do álcool com o ácido de 5,0 e uma temperatura de 30°C. A atividade enzimática específica, nestas condições, foi 220 Umg-1, além de uma taxa de formação do éster de 92%.

Lee, Poppenborg & Stuckey (1998) estudaram a síntese de ésteres terpênicos utilizando-se lipases de *Cândida rugosa* encapsulada em micelas reversas de AOT/água/isooctano. Os substratos foram os álcoois terpênicos geraniol, citronelol e mentol, além dos triacilgliceróis tributirina, tricaprilina e triacetina. O geraniol e a tributirina foram considerados os melhores substratos. Para obter maior rendimento de conversão do geraniol, os parâmetros de reação, tais como: tipo de solvente, enzima e concentração de surfactante, pH, e a concentração do substrato foram investigados. Foi-se demonstrado que a desativação da enzima na micela reversa foi o principal fator para conversões subótima. Utilizando-se geraniol na concentração de 100 mM, pH 7 e 30°C, a taxa máxima de conversão foi de cerca de 70%. Porém, a estabilidade das lipases encapsuladas foi baixa nesta faixa de temperatura. Em 24h, a atividade lipásica decaiu drasticamente para apenas 10%.

Como pôde ser observado, são escassos os trabalhos atuais onde sejam exploradas reações de esterificação catalisadas por lipase em sistemas microemulsionados, tornando-se este um importante campo de estudo para a síntese da monoestearina.

2.4.1.2.1 – Incorporação da Enzima

Diferentes enzimas têm sido incorporadas em micelas reversas por três metodologias principais, de modo a formar soluções opticamente transparentes. A primeira técnica, e mais utilizada, é denominada Técnica de Injeção, e consiste na injeção de solução de enzima, geralmente em tampão fosfato ou Tris HCl, em solução previamente preparada de surfactante, solvente orgânico e substratos. A incorporação da enzima no microambiente aquoso é praticamente instantânea e requer suave agitação por alguns segundos (Moulik & Paul, 1998). Esta técnica além de grande simplicidade e baixo tempo requerido para execução, proporciona grande controle de água no sistema micelar.

Menger & Yahmada (1979) relataram pela primeira vez a técnica da adição, que consiste na adição de enzima em sua forma liofilizada e o surfactante, no solvente orgânico apropriado com o grau de hidratação desejado, onde a quantidade de água nestes sistemas é inversamente proporcional ao tempo de incorporação da enzima. Esta técnica tornou-se obsoleta nos últimos anos, devido à rápida desnaturação da enzima durante o processo, além do fato de a maioria das enzimas não encontrarem-se disponíveis na forma liofilizada, ou perder parte de sua atividade durante o processo de liofilização.

Uma terceira técnica descrita é a transferência de fase, que envolve a passagem de uma solução aquosa de enzima, a uma solução de surfactante-solvente de mesmo volume (Luisi et al, 1979). Porém, o tempo inesperado de duração, para se atingir o equilíbrio e a impossibilidade de controle do grau de hidratação da solução micelar final são os principais desafios da técnica.

A solubilização de uma enzima em micelas reversas é dependente da temperatura, do grau de hidratação do sistema, da concentração, natureza e propriedade do surfactante utilizado, além do ponto isoelétrico da enzima (Xenakis et al, 2009).

Enzimas solúveis em água tendem a se localizar nos cerne das micelas reversas. Alguns biocatalisadores, como certas lipases, podem também interagir com as camadas mais externas das micelas, ou serem parcialmente ou totalmente ancoradas nas mesmas (Carlson & Nagarajan, 1992 – figura 21).

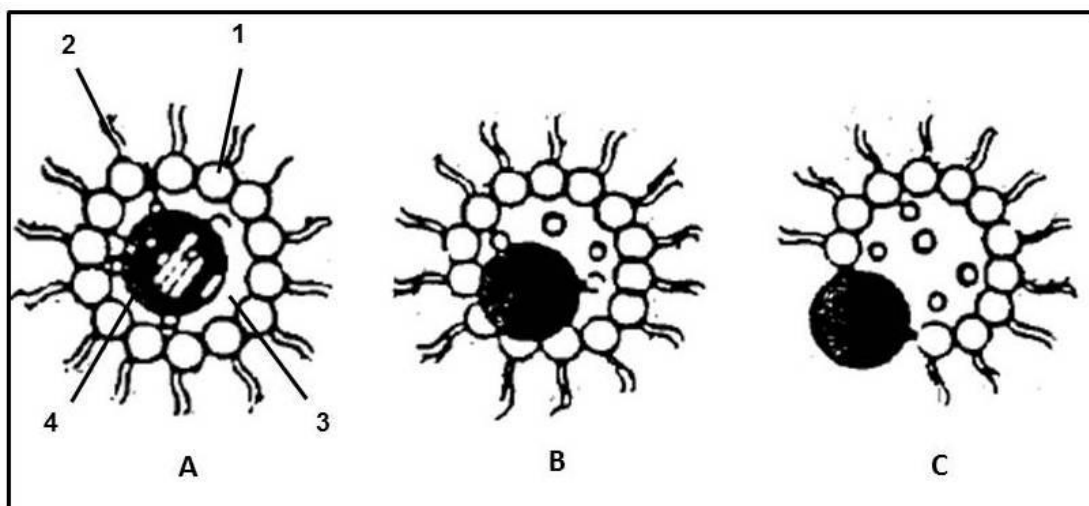


Figura 21: Possíveis localizações de uma enzima em micelas reversas. (A) enzima solúvel em água; (B) Enzima ativa na superfície; (C) Enzima ancorada na membrana. (1) cabeça polar do surfactante; (2) cauda apolar do surfactante; (3) molécula de água ou contra-íons e (4) enzima. Adaptado de Carlson & Nagarajan, 1992.

A localização da enzima na micela reversa pode interferir em sua atividade catalítica, assim como no tamanho final da microemulsão formada (Pileni et al, 1985).

2.4.1.2 - Imobilização de Enzimas em Organogel

As aplicações práticas de micelas reversas podem ser dificultadas pela necessidade de separar o tensoativo dos produtos de reação (Dave & Madamwar, 2008). Técnicas clássicas aplicadas para essa finalidade, não geram uma separação eficaz, devido a formação de emulsões e de formação de espuma (Zoumpanioti et al, 2008).

Interessantemente, muitas microemulsões A/O podem ser geleificadas pela adição de agentes geleificantes de gelatina ou de outros, tais como os derivados de celulose ou ágar, obtendo-se uma matriz apropriada para imobilização de enzimas. O termo "gel" é usado para caracterizar os sistemas sólidos ou semissólidos consistindo em pelo menos dois componentes. São sistemas condensados consistindo-se de um líquido, enquanto que no seu interior, outro solvente orgânico ou moléculas podem ser transferidos (por exemplo, por difusão). Quando o líquido é a água, estes sistemas são denominados hidrogéis, e quando é formado por solventes hidrofóbicos, organogéles (Dave & Madamwar, 2008).

A preparação de organogéles de microemulsão foi relatada primeiramente em 1986 (Haering Luisi, 1986), onde foi realizada a gelificação de microemulsões A/O de AOT e

Lecitina, acima da temperatura de geleificação. O arrefecimento até à temperatura ambiente produz um gel transparente que possui propriedades físicas reprodutíveis.

As características estruturais e morfológicas dos organogéis já foram examinadas por diversos autores (Burova et al, 2007.; John et al, 2006), utilizando principalmente dispersão dinâmica de luz (Quellet Eicke, 1991), RMN (Capitani et al, 1988) ou a condutividade elétrica (Quellet e Eicke, 1991). De acordo com os resultados, três modelos principais têm sido propostos:

1. Moléculas de gel agregadas que formam uma rede rígida cercado por canais de água que se entrelaçam com os canais e são separados pela zona de surfactante (Capitani et al, 1988).
2. Uma rede de gel, tal como no primeiro modelo, que coexiste com água e gotículas de óleo, que são estabilizadas pelo agente tensoativo, ou seja, AOT (Atkinson et al, 1989).
3. Micelas reversas contendo água e uma parte da quantidade total de gel. As micelas estão ligados ao resto do gel formando hélices (Petit et al, 1991)

2.4.1.3- Lipases em Organogel

O uso de organogéis como matrizes para a imobilização de enzimas apresenta como vantagem uma dupla imobilização do biocatalisador, pois há a formação da microemulsão, seguida a imobilização na rede de polímero (Lopez et al, 2006).

As lipases imobilizadas nestes suportes conseguem manter a sua atividade catalítica e estabilidade durante longos intervalos de tempo. Além disso, na maioria das condições a matriz de gel retém completamente o surfactante, gelatina, água e enzima de componentes de micelas reversas, o que permite a difusão de substratos não-polares ou produtos entre as fases oleosa e o gel (Rees et al, 1991). Tem sido demonstrado que as enzimas imobilizadas em hidroxipropilmetil celulose (HPMC), quando transformado em gel, após hidratação, mantêm sua atividade sua atividade catalítica mesmo a 50°C. Além disto, o organogel é estável, mesmo em altas temperaturas (Zoumpantioti et al, 2008). Até agora, vários estudos têm sido alcançados em biotransformações utilizando enzimas imobilizadas em MBGs, sendo relatadas reações de esterificação (Soni et al, 2001; Lopez et al, 2006) , resolução cinética (Song et al, 2008; Mishra et al, 2011).

2.4.1.4 - *Influência dos surfactantes*

Assim como nas microemulsões, no sistema de organogel a interação eletrostática entre as moléculas anfifílicas e moléculas de enzima na interface podem desempenhar um papel importante na atividade da enzima (Uskokovic e Drofenik, 2007). Trabalhos anteriores, como o de Maria et al (2004), demonstraram que a natureza do tensoativo utilizado para a preparação de organogel de HPMC teve uma influência drástica nas conversões finais, além nas velocidades de reação na síntese de laurato de propila. Del Val e Otero (1998) já demonstravam que os organogeles preparados a base de AOT. Estes resultados foram atribuídos ao efeito tóxico que AOT teria para as lipases, tais como as de *C. rugosa* e *R. miehei*. Alguns autores demonstraram que a lipase *C. rugosa*, quando revestida com tensoativos não-iônicos funcionam melhor do que surfactantes catiônicos ou aniônicos para a síntese de ésteres (Thakar e Madamwar, 2005; Dandavate e Madamwar, 2007). Não somente a natureza, mas também a concentração do surfactante influencia a atividade catalítica de lipases imobilizadas em Organogeles. Nagayama et al (2008) demonstraram que a velocidade inicial de formação de laurato de butila catalisada pela lipase de *Cândida rugosa* imobilizada em organogel aumentou com o aumento da concentração de surfactante, neste caso, o CTAB, que foi superior aos resultados encontrados com o AOT. Num sistema diferente, onde a síntese de dodecanoato de butila catalisada pela lipase de *Mucor javanicus* foi analisada, aplicou-se dois tensoativos diferentes, sendo o Tween 85 e o AOT, onde as velocidades de reação foram maiores se comparadas com os sistemas realizados com o AOT sozinho (Nagayama e Imai, 2005).

2.4.1.5 - *Efeito da difusão e da temperatura sobre a taxa inicial da síntese*

Como o processo de biocatálise em organogel é heterogêneo, a difusão dos substratos e produtos pela matriz é crucial. A difusividade dos substratos dentro das partículas de gel é um parâmetro importante na concepção de processos que utilizam enzimas imobilizadas. Zoumpantioti et al (2008) estudaram a difusão de substratos e produtos em organogeles feitos a partir de microemulsões de AOT e lecitina, gelificados em HPMC, onde concluíram que a estrutura do gel formado não forma barreiras físicas ou osmóticas para proporciona uma

barreira para a difusão de substratos e produtos. Desta forma, sugeriram que lipases imobilizadas nestes sistemas são eficientes para a esterificação de ácidos graxos e álcoois alifáticos.

O coeficiente de difusão do ácido láurico nas partículas de gel em AOT foi medido por Nagayama et al (1998). Com o aumento da concentração de gel, houve o aumento do coeficiente de difusão (para um teor em gel de 10% p / v). Este perfil é diferente do observado em outros sistemas, onde, geralmente, com concentrações mais elevadas de gel, a difusibilidade tende a diminuir, como consequência da interação entre as substâncias e a rede de gel, além do impedimento estérico (Zoumpantioti et al, 2008). Os resultados obtidos por Nagayama et al (1998) foram atribuídos à estrutura heterogênea dentro das partículas de gel, em concentrações mais elevadas, já que a estrutura do sistema é modificada de acordo com a concentração do agente gelificante (Zoumpantioti et al, 2010).

Tem sido proposto que organogéis de lecitina são compostos por uma rede rígida de gel, rodeada por canais entrelaçados com canais de água e de óleo, separadas por uma película de lecitina (Backlund et al, 1996). Dados de dicroísmo circular revelaram que a lecitina não participa efetivamente na estrutura do gel (Backlund et al, 1995; Backlund et al, 1996) em toda a sua extensão. Sobre os substratos, tem-se que aqueles mais hidrofóbicos tendem a se difundir pelo canal de fase oleosa do organogel, enquanto que aqueles mais hidrofílicos tendem, por afinidade, a se difundir pelos canais mais hidrofílicos. No entanto, a intensidade e velocidade de difusão é dependente da composição do organogel. Como exemplo, o coeficiente de difusão do álcool butílico permaneceu constante porque a difusão no canal com fase aquosa em organogel preparado a base de lecitina era dominante (Nagayama et al, 2008).

2.4.1.6 - Estabilidade de armazenagem

A estabilidade operacional e de armazenamento de uma lipase imobilizada são parâmetros importantes a partir dos quais se pode determinar a viabilidade econômica de um processo de biossíntese. A estabilidade de lipases imobilizadas em organogel tem sido relatada como elevada e superior a alguns sistemas reacionais aos quais são comparados. As lipases de *Humicola lanoso* e *C. viscosum* permaneceram estáveis durante uma semana em organogéis oriundos de microemulsões em AOT (Stamatis et al, 1999). Em géis de gelatina-AOT a lipase imobilizada *C. lipolytica* também exibiu uma boa estabilidade durante períodos de

armazenagem 10 meses (Zhou et al, 2001). Além disso, a lipase B de *C. antarctica* não apresentou perda significativa de atividade, quando imobilizada em organogéis de HPMC livres de surfactantes por um período de 8 meses de armazenagem, enquanto que a atividade residual da lipase de *R. miehei* no mesmo sistema foi reduzida em 50% para o mesmo período de armazenagem (Zoumpantioti et al, 2006). No entanto, a atividade residual de ambas as lipases imobilizadas nos sistemas livres de surfactantes foi superior daquela observada em microemulsões em AOT gelificadas.

2.5 – Reatores Utilizados em Biocatálise

Nos últimos anos, grande parte das pesquisas envolvendo biocatálise, mais especificamente, aquelas envolvendo biocatalisadores imobilizados, têm concentrado seus estudos acerca da aplicação destes em processos industriais. Desta forma, a morfologia e o desempenho dos reatores utilizados têm se tornado fundamental para uma melhor performance dos biocatalisadores, além do ajuste das condições reacionais (Bornscheuer, 2003). A escolha do reator a ser utilizado, bem como do suporte para o biocatalisador, depende de diversos fatores, como exemplificado na figura 22:

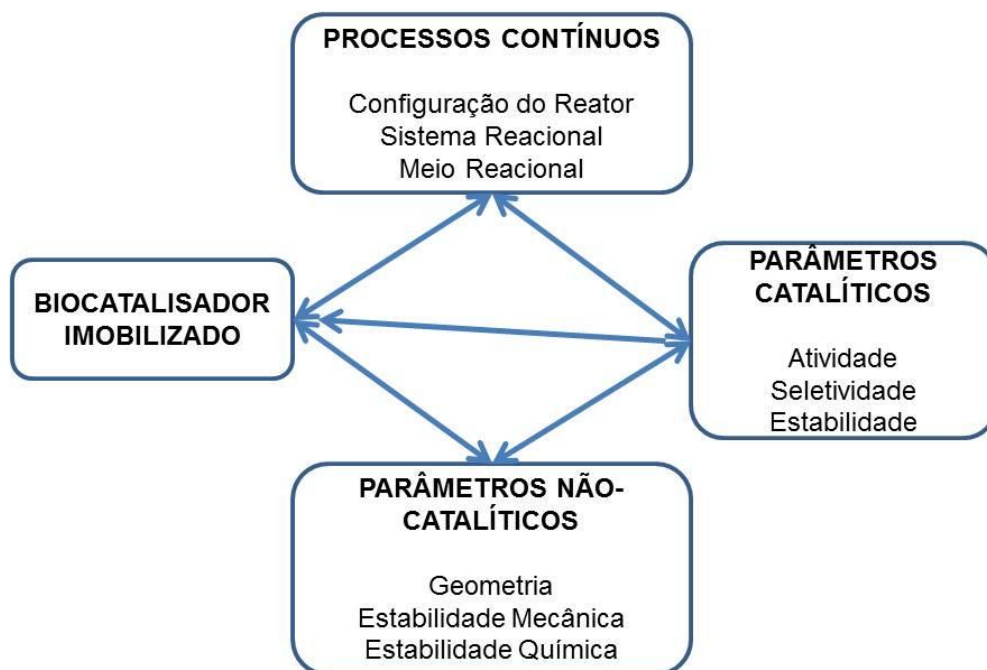


Figura 22: Fatores que influenciam o desenvolvimento de processos catalíticos com o uso de biocatalisadores imobilizados.

Dentre os reatores utilizados em biocatálise, podemos destacar os reatores em tanque sagitados (CSTR – Continuous Stirred tank reactor), bastante utilizado em reações que envolvem processos de batelada, além dos reatores de membrana, de leito fluidizado e de leito fixo, os quais foram desenvolvidos para aplicações em processos contínuos (Cao, 2005).

2.5.1 - Reatores de Fluxo Contínuo

Nos últimos anos, maior atenção tem sido dada aos processos biocatalíticos envolvendo fluxo contínuo em alternativa aos processos em batelada (Itabaiana Junior *et al*, 2013), principalmente devido a melhor fácil automatização e operação, assim como elevadas produtividade, reprodutibilidade, segurança e controle de processo. (Kirchning *et al*, 2006). Entretanto, para se certificar se há vantagens em aplicar ou substituir processos antigos por fluxo contínuo, é necessária uma avaliação criteriosa acerca da produtividade gerada pelo sistema e do custo final do processo (Lütz *et al*, 2009).

A tecnologia de reações em fluxo contínuo pode ser caracterizada por uma gama de diferentes reatores tubulares (de Souza e Miranda, 2013), com volumes de trabalho que podem variar de 15 nL a 1 L, sendo cada escala com suas designações (figura 23):

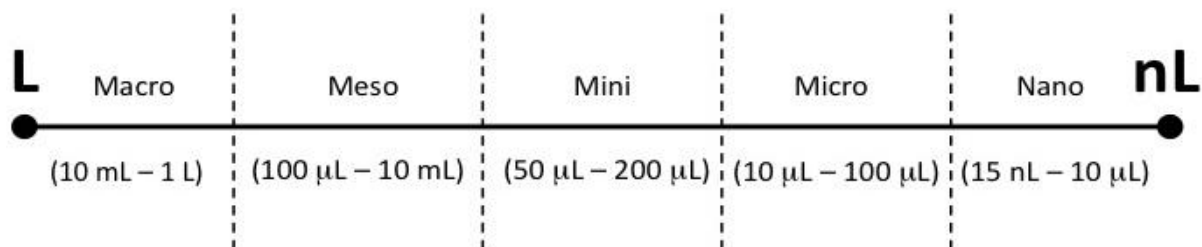


Figura 23: Designações de reatores de fluxo contínuo de acordo com o volume operacional (Souza e Miranda, 2013).

Nestes reatores, o meio reacional é bombeado para o interior dos reatores em fluxos ajustáveis, e as reações químicas ocorrem de maneira contínua. Neste caso, o tempo de reação é determinado pelo fluxo e o volume do reator, sendo chamado de tempo de residência (figura 24).

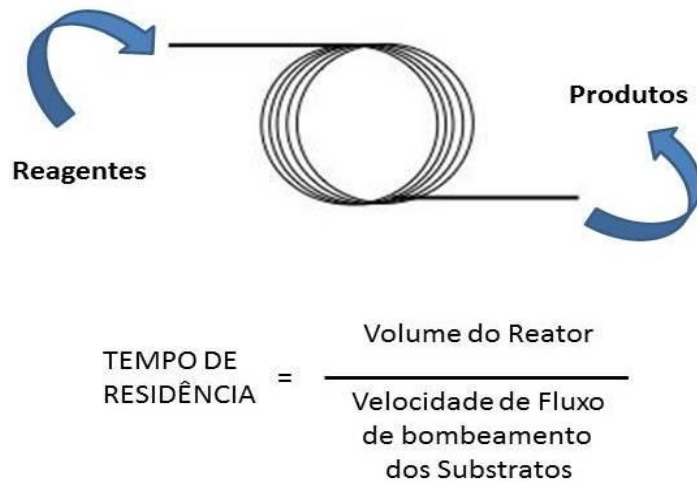


Figura 24: Direção da reação em um reator de fluxo contínuo (Adaptado de Souza e Miranda, 2013).

Atualmente, a maioria dos reatores em estudos com biocatalisadores imobilizados tem sido sistemas contínuos em coluna, tais com os de leito fixo e de leito fluidizado (figura 25). Nestas condições, o uso de biocatalisadores imobilizados, assim como a escolha do solvente ideal são essenciais para prevenir ou retardar a lixiviação de enzimas, ou microrganismos acondicionados nestes suportes, sob altas taxas de diluição impostas a estes processos (Frost & Mutton, 2010).

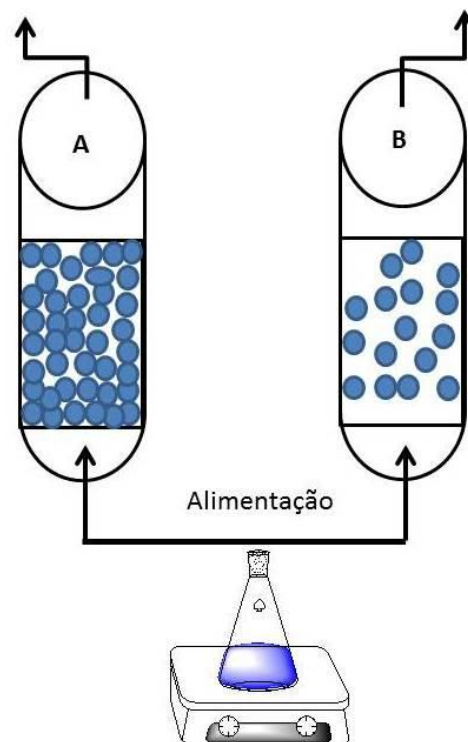


Figura 25: Reatores de Leito fixo (A) e reator de leito fluidizado (B).

Ao compararmos os reatores em batelada com aqueles em fluxo contínuo, este último apresenta algumas vantagens (Machado et al, 2011; Itabaiana Junior et al, 2013; Souza e Miranda, 2013), tais como:

- Maior eficiência energética;
- Menor custo na otimização das condições de reação;
- Menor número de operações no isolamento do produto.
- Menor número de etapas para o escalonamento;
- Maior eficiência no controle de parâmetros de reação e na mistura dos reagentes;

2.5.1 - Reatores de Leito Fixo (“Packed-Bed reactors”)

Os reatores de leito fixo são os mais populares devido à sua alta eficiência, baixo custo e facilidade de operação, construção e manutenção. (Watts & Wiles, 2008; Kirschning et al, 2011; Whitesides, 2006; Heidt, Bornscheuer & Schmid, 1996 e Machado et al, 2011). O reator, de uma maneira geral, consiste em um tubo cilíndrico, geralmente vertical, preenchido com as partículas do biocatalisador. O meio pode ser alimentado tanto pela parte superior, ou inferior da coluna, formando-se então, uma fase líquida entre as partículas. Nestes sistemas, enzimas imobilizadas, por exemplo, sofrem menos danos, se comparadas aos sistemas comuns de batelada, com sistemas de agitação. Porém, um dos problemas normalmente enfrentados em reatores de leito fixo é a dificuldade de difusão do substrato, o que pode levar a formação de caminhos preferenciais através do recheio, o que não é desejável, pois nem todo o biocatalisador entra em contato com os substratos. Desta maneira, a escolha do fluxo com que os reagentes são bombeados para o sistema é de vital importância, além de controlar o tempo de contato entre enzima-substrato.

2.5.2 - Aplicações de Reatores de Leito Fixo

Reações de hidrólise de óleos vegetais na busca de MAGs e DAGs tem sido uma importante aplicação dos reatores de leito fixo. No início da década de 90, Rhee et al (1991 e 1992) publicaram dois trabalhos consecutivos no desenvolvimento de um método para a hidrólise contínua de azeite utilizando lipases imobilizadas em solventes orgânicos. A lipase de *Cândida rugosa* foi imobilizada em diversos suportes, e cada biocatalisador foi testado sob condições de fluxo contínuo. A conversão obtida foi de 90%, independentemente da escolha do solvente (hexano ou isooctano) mas em presença de hexano a meia-vida do biocatalisador imobilizado reduziu para a metade se comparada com isooctano. H-Kittikun et al (2000) mostraram que diferentes lípases (Lipase PS de *Burkholderia cepacia*, a lipase L de *Cândida lipolytica*, lipase FAP-15 de *Rhizopus oryzae*, a lipase AK de *Pseudomonas fluorescens* e Lipase OF-360 da *Cândida rugosa*) podem ser usadas para a hidrólise de óleo de palma condições de fluxo contínuo em um sistema de duas fases. Autores utilizaram uma coluna jaquetada de vidro (20 cm de comprimento x 62 milímetros de diâmetro) com um volume de 6 mL e preenchido com 0,8 g de enzima imobilizada (Accurel PE-100). A hidrólise parcial do óleo de palma foi também realizada por nosso grupo de pesquisa (De Souza et al, 2011). Na ocasião, utilizou-se um reator de fluxo X-cube dedicado (Thales Nano), com reator de leito fixo (0,6 mL volume) contendo a lipase Amano PSIM. Com uma vazão de $0,1 \text{ mL}^{-1}$, foi-se possível enriquecer o óleo com 57% de DAG. Reações de esterificação também foram realizadas por nosso grupo (Ruela et al, 2013; Sutili et al, 2013), demonstrando maiores rendimentos e tempos reacionais reduzidos quando comparados em sistemas de batelada, gerando uma maior produtividade do sistema em leito fixo. Além disto algumas reações de resolução cinética (de Miranda et al, 2011; Manoel et al, 2013) procedidas, demonstraram grande influência do tempo de residência na seletividade ao enantiômero.

CAPÍTULO 3

Materiais e Metodologia

3.1 - Materiais

3.1.1 - Enzimas

Neste trabalho foram utilizadas diversas lipases comerciais, a saber:

- Novozym 435 (*Cândida antarctica*) imobilizada em resina de troca iônica do tipo acrílica macroporosa, adquirida da Novozymes S/A;
- Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus*) imobilizada em cerâmica, adquirida da Novozymes S/A;
- Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) imobilizada em resina de troca iônica, adquirida da Novozymes S/A;
- Amano PS IM (*Burkholderia cepacia*), imobilizada em terra diatomácea, adquirida pela Amano Enzyme S/A
- Lipozyme[®] Cal B (Lipase B livre de *Cândida antarctica*), adquirida pela Novozymes S/A;
- Lipozyme TL (lipase livre de *Thermomyces lanuginosus*), adquirida pela Novozymes S/A;
- Lipozyme RM (Lipase livre de *Rhizomucor miehei*), adquirida pela Novozymes S/A;
- PS Amano (Lipase livre de *Burkholderia cepacia*) adquirida pela Amano Enzyme S/A (PS Amano);

3.1.2 - Reagentes:

Foram utilizados neste estudo, os seguintes reagentes:

- n-heptano (Tedia);
- n-hexano (Vetec Química);
- Iso-octano (Tedia);
- Ciclohexano (Vetec Química);
- Acetona (Vetec Química);
- Clorofórmio (Vetec Química);

- Acetato de cobre II (Vetec Química);
- Fosfato de Sódio monobásico;
- Fosfato de sódio dibásico;
- Triton X-100;
- Tributirina;
- N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) (Sigma-Aldrich);
- Butanol (Vetec);
- Ácido Oleico (Fluka);
- Silicagel;
- Ácido Sulfúrico.

Todos os reagentes, exceto o agente derivatizante MSTFA, que foi destilado, foram utilizados sem nenhuma etapa prévia de tratamento ou purificação.

3.1.3 – *Substratos*

Como Substratos, foram utilizados:

- Ácido esteárico (AE) (>95% - Sigma Aldrich)
- Ácido esteárico (AE) Puríssimo (Vetec);
- R,S-1,2-O-isopropilideno glicerol (IPG) (Fluka);
- Glicerol Puríssimo (Accross)

Além dos substratos comerciais, foram utilizados como substratos, uma amostra de glicerol, oriunda da indústria de Biodiesel, da marca Fertibom, assim como, uma amostra de resíduo de ácidos graxos (RAG) oriunda da indústria de refino de óleo de palma, gentilmente cedida pela Agropalma®.

3.1.4 - *Equipamentos*

Este trabalho foi realizado com o auxílio dos seguintes equipamentos:

- Balança analítica Mettler Toledo;
- Sistema Ásia 110 de Fluxo Contínuo – Syrris;
- Fluxo Contínuo Thales nano;
- Incubadora orbital shaker Marconi;

- Reator STR Easy Max Mettler Toledo;
- Bureta automática Titrex, de 250mL;
- Potenciômetro Digital Mettler Toledo;
- CG-EM Shimadzu CG2010;
- CG-FID Hewlett–Packard (HP) Modelo GC-6890C;
- Coluna cromatográfica DB 5–HT (Agilent, J & W. Scientific®) capilar (10m × 0.32mm × 0.1 µm);
- Coluna cromatográfica capilar HP Innowax (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.32 µm)

3.2- Métodos:

3.2.1 - Análise da Pureza dos Reagentes de Partida

A fim de se avaliar a pureza cromatográfica dos reagentes de partida, 1mL de uma solução a 50mM dos dois lotes de AE, assim como o IPG foram preparados em clorofórmio. Em seguida, cada amostra foi submetida a um processo de derivatização com MSTFA, a fim de serem transformados em seus derivados mais voláteis, como descrito a seguir:

- Em criotubos de 3mL, foram adicionados 50uL de cada solução, seguida da adição de 100uL do referido reagente derivatizante;
- Cada amostra foi acondicionada em shaker sob agitação de 150rpm e 60°C, durante 30 min. Em seguida, adicionou-se 1mL de CHCl₃ a cada amostra, sendo estas carreadas para vials de 2mL, e submetidas a análise por CG-MS.

A técnica de cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massa foi realizada em aparelho Shimadzu 2010 com interface GCMS-QP2010 e impacto eletrônico. A coluna utilizada para análise foi RTx-5Ms (L=30m; d=0.25µm), o gás de arraste utilizado foi o hélio e as condições para a corrida cromatográfica estão descritas na tabela abaixo (tabela 5). As substâncias foram identificadas através de comparação com os espectros de massas da biblioteca NIST05s.LIB.

Tabela 5: Metodologia de CG-MS utilizada na análise dos perfis reacionais e reagentes.

Velocidade (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
-	60°C	1.00
10°C/min	290°C	16.00

3.2.2 - Teste de Solubilidade dos Reagentes de Partida

O lote de AE de maior pureza, assim como o IPG foram submetidos a ensaios de solubilidade. 5 mL de soluções variando de 50 a 300mM de cada reagente nos solventes orgânicos testados foram adicionados em frascos de vidro de 10mL com tampa e incubados em shaker a 150 rpm. As temperaturas testadas foram 25°C e 60°C. Como solventes, foram utilizados: n-hexano, n-heptano, Ciclohexano, isooctano.

Para uma melhor visualização dos resultados experimentais no quadro abaixo, números foram atribuídos em relação a solubilidade dos substratos, onde:

- 1 – Totalmente solúvel: Solução límpida;
- 2 – Parcialmente solúvel: Solução turva;
- 3 – Insolúvel: Solução turva e corpo de fundo.

3.2.3- Seleção de Lipases

As lipases descritas no item 4.2 foram investigadas quanto a capacidade de esterificação o AE e o IPG. Inicialmente, uma razão molar de 2:1 de IPG e AE foi adotada (75mM e 150mM). O solvente escolhido foi o n-heptano. Em criotubos de 2 mL, verteu-se 1 ml de solução dos substratos, seguido da adição de 1% (p/v) de cada lipase. Os criotubos foram então incubadas em Incubadora orbital a 250 rpm a 60°C. As conversões apresentadas por cada enzima foram monitorados em intervalos de tempo 5, 10, 15, 30, 45 e 60 min, através do método de Lowry-Tinsley (Lowry & Tinsley, 1979) modificado, explicado a seguir. As melhores condições foram analisadas via CG-MS, segundo metodologia descrita na seção 3.5.1.

Após o término do tempo reacional, o meio reacional foi filtrado em papel de filtro, para a retirada do biocatalisador imobilizado. Para as reações catalisadas por enzimas livres, os sistemas foram submetidos a banho de gelo por 30 seg., sendo em seguida, aquecidos a 70°C, para a desnaturação da enzima, e separação de fases. A fase superior foi utilizada para o cálculo das conversões.

3.2.4 - Verificação do Percentual de Conversão

Os percentuais de conversão demonstrados pelas lipases nas condições estudadas, foram monitorados através do método de Lowry-Tinsley (Lowry & Tinsley, 1979) modificado:

- 300µL ml dos meios reacionais, nos tempos determinados foram adicionados a criotubos contendo 600 µL do solvente estudado e 300 µL de solução aquosa de acetato de cobre II a 5% p/v e pH 6,0 ajustado previamente com piridina;
- As misturas finais foram vigorosamente agitadas em vortex por 30 segundos. O complexo verde formado entre o ácido residual e o acetato de cobre, residente na fase superior, foi analisado a 715nm em espectrofotômetro UV/visível. Utilizou-se como branco os solventes reacionais, e cada reação foi investigada em triplicata. A concentração residual de ácidos graxos presentes na amostra foi calculada com base na equação gerada pela curva padrão realizada de acordo com o procedimento descrito a seguir, comparando-se com a concentração inicial demonstrada pela solução-estoque. Cada reação foi analisada em triplicata, e a conversão foi calculada pela diferença da absorvância da solução antes e após a reação (figura 20) e calculada segundo a equação III:



Figura 26: Ensaio de Lowry-Tinsley antes e depois da reação. A) Ensaio em branco, com n-heptano; B) Solução inicial de AE e IPG; C) Reação de esterificação, evidenciando a redução de intensidade do complexo formado na fase superior.

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

Onde:

- C (%) = conversão (em porcentagem)
- Aa = Absorbância da amostra antes da reação
- Ad = Absorbância da amostra depois da reação

3.2.5 - Curva Padrão do Ácido Esteárico e Resíduo de Ácidos Graxos

Amostras contendo 0-18 μ moles de ácido esteárico (figura 21 A), assim como de resíduo de ácidos graxos (Figura 21 B) aplicado neste trabalho, expressos em ácido palmítico, foram preparadas em criotubos contendo 300 μ L de solução de acetato de cobre II e a solução foi avolumada para 1,5 mL com o solvente apropriado. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e após o descanso por 10 segundos, ocorreu a separação das fases. A fase superior foi analisada em espectrofotômetro a 715nm. A curva padrão foi construída através da relação entre a concentração de ácidos graxos na amostra, expressa em μ moles, e sua absorvância. O controle foi feito sem o ácido graxo.

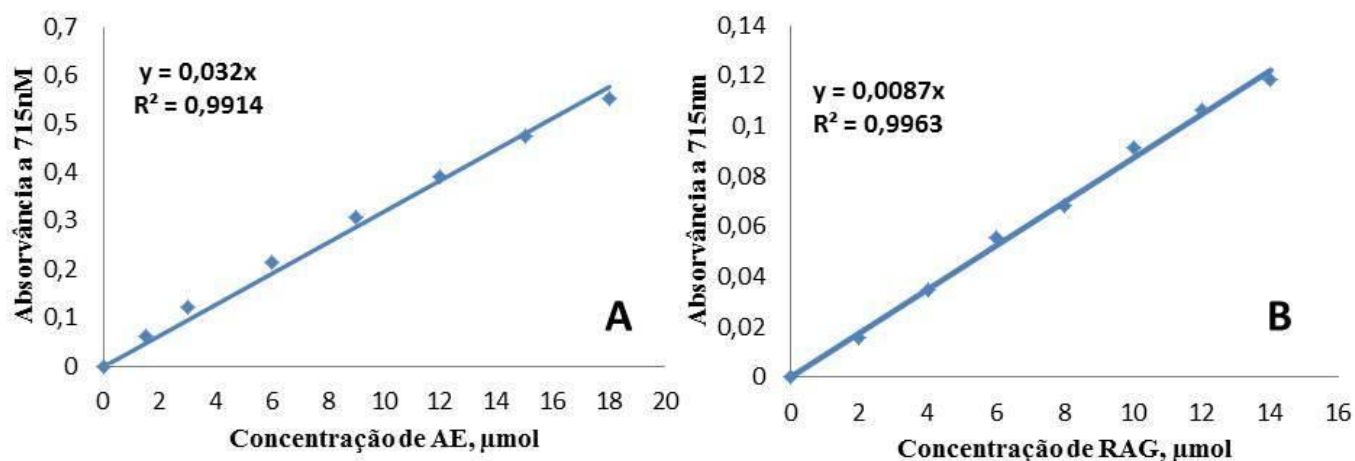


Figura 27: Curvas-padrão dos ácidos graxos utilizados como reagentes de partida. A: Curva-padrão do AE; B: curva-padrão do RAG.

3.2.6 - *Determinação do Tempo Reacional*

Para se determinar o melhor tempo reacional para a síntese da monoestearina protegida (MEP), foram realizados estudos cinéticos com as lipases imobilizadas de *Rhizomucor miehei* (RM IM) e *Thermomyces lanuginosus* (TL IM). Amostras reacionais foram retiradas de minuto a minuto até 15 minutos, e depois nos tempo 30, 45, 60, 120, 180, 240 e 360 minutos. As condições reacionais foram: razão molar AE:IPG 1:2 (75mM/150mM em n-heptano), 60°C de temperatura, 250rpm de agitação e quantidade de enzima 1% p/v. Foram preparados tubos independentes para cada tempo reacional, de modo que não houvesse efeito de concentração de enzima ao longo da reação.

Antes do início da reação, a atividade de esterificação da enzima foi medida conforme procedimento descrito a seguir. Cessado o tempo reacional, a enzima foi filtrada em papel de filtro, lavada 3 vezes com 5 mL de n-heptano e acondicionada em estufa a 45°C por 6h para a secagem do solvente. Após este procedimento, a atividade residual foi medida. Reações independentes nos tempo 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180 e 240 minutos foram realizadas, e o biocatalisador filtrado e recuperado, como descrito anteriormente, para finalmente, medir-se a atividade de esterificação nestes estágios reacionais.

3.2.7 - *Determinação da atividade de esterificação*

A atividade de esterificação das enzimas RM IM e TL IM foram determinadas pela velocidade inicial da reação de esterificação do ácido oleico com butanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes (0,03 mol de ácido oleico e 0,03 mol de butanol) e 3 % (m/m) de lipase, a 40 °C, de acordo com a metodologia proposta por Souza et al (2009). A reação foi conduzida em frascos de vidro de 20mL, incubados em shaker sob agitação orbital. Alíquotas dos meios reacionais (100 µL) foram retiradas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 e 30 minutos de reação, que foram analisadas por titulometria de neutralização. As amostras foram dissolvidas em 40 mL de acetona/etanol 1:1 e tituladas contra uma solução de NaOH a 0,02mol.L⁻¹, em bureta automática. Uma unidade de atividade de esterificação (U) foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido oleico por minuto, nas condições experimentais descritas. A Equação IV descreve o cálculo empregado para determinação da atividade enzimática de esterificação.

$$\text{Atividade de esterificação (U / g)} = \frac{(V_i - V_f) \times M}{t \times m} \times 1000 \times \frac{V_m}{V_a}$$

Equação IV

onde:

A = atividade (U.mg⁻¹)

V_i = volume de NaOH consumido na titulação da amostra retirada no tempo zero de reação (mL);

V_f = volume de NaOH consumido na titulação da amostra retirada no tempo t de reação (mL);

M = concentração da solução de NaOH (mol.L⁻¹);

3.2.8 - Avaliação do Efeito do Solvente

A fim de se avaliar a influência dos solventes orgânicos na reação de formação do MEP, foram realizadas cinéticas de esterificação do AE com o IPG, catalisadas pelas lipases RM IM e TL IM, do mesmo modo descrito na seção X, na presença dos solventes n-heptano, Ciclohexano, isooctano e n-hexano. Foi utilizada uma razão molar de AE:IPG 1:2, 60°C e 250 rpm. As reações foram realizadas em criotubos de 2mL, tendo-se 1mL de meio reacional. Do mesmo modo descrito anteriormente, para cada tempo reacional, foram preparados frascos diferentes. Para se avaliar o efeito de cada solvente, as velocidades iniciais de cada cinética realizada foi medida, de acordo com a equação abaixo:

3.2.9 - Determinação das Velocidades Iniciais de Reação

Para a avaliação de parâmetros cinéticos reacionais, faz-se necessário o cálculo das velocidades iniciais. Deste modo, em casa de etapa dos estudos cinéticos realizados, tais como efeito do solvente, razão molar, temperatura, as velocidades iniciais de reação foram calculadas. Este parâmetro pode ser calculado dividindo-se a variação de conversão num determinado tempo pela variação do tempo na faixa linear demonstrada na curva da cinética realizada. Esta variável foi calculada pela fórmula I:

$$r = \left. \frac{dC}{dt} \right|_{t=0}$$

Fórmula II

Onde:

r= velocidade inicial de reação (min^{-1});

C= conversão de MEP ou MRAG no tempo t (%);

C₀= conversão de MEP ou MRAG no tempo 0 (%);

t= tempo (min);

t₀= tempo do início da reação (min).

3.2.10 - Efeito da Razão Molar de IPG e AE na Cinética de produção do MEP em n-heptano

Tendo-se confirmado ser o n-heptano o melhor solvente reacional, avaliou-se a razão molar entre IPG e AE na reação de formação de MEP. Razões molares de 1:1 e 3:1 foram comparadas cineticamente com a razão molar 2:1, a qual foi iniciada este trabalho. As velocidades iniciais de cada cinética foi calculada, de acordo com o procedimento 4.1. As reações foram realizadas em criotubos de 2mL, com 1mL de meio reacional, a 60°C, 1% p/v de cada lipase sob 250rpm de agitação.

3.2.11 - Otimização das Condições Reacionais:

A fim de se otimizar as condições reacionais para a esterificação do AE, assim como o RAG, com o IPG, um planejamento fatorial fracionário (FFD) de experimentos foi proposto, objetivando comparar as performances das lipases RM IM e TL IM em etapa de batelada. Desta forma, para um estudo preliminar, foi adotado um planejamento fatorial de 2 níveis. Primeiro, realizou-se um planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹ para cada biocatalisador, para determinar as variáveis de maior influência para cada enzima nas reações citadas. As variáveis com os respectivos níveis utilizados de planejamento fatorial fracionário (FFD) para as lipases TL IM e RM IM lipase são apresentados na tabela 06:

Tabela 6: Planejamento fatorial fracionado proposto para as lipases RM IM e TL IM com valores reais e codificados (+ nível superior, 0 intermediário, - nível inferior) para as variáveis independentes.

Variáveis	-1	0	+1
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	40	50	60
[E] (%)	0,1	0,55	1
[S] (mM)	50	75	100
Agitação (rpm) (Ag)	50	75	250

Os desenhos experimentais e a análise dos resultados foram realizadas utilizando o software Statistica 6,0 (Statsoft, Inc, EUA), de acordo com o nível de significância estabelecido para se obter o modelo matemático. A significância dos coeficientes de regressão e as probabilidades associadas, $p(t)$, foram determinadas pelo teste t de Student. O significado da equação do modelo foi determinado pelo teste F de Fisher. A variância é dada pelos coeficientes múltiplos de determinação, R^2 .

Após o primeiro planejamento fatorial fracionário, um delineamento do composto central rotacional (DCCR) foi empregado para obter as condições ótimas para a esterificação em questão com a Lipase RM IM, que demonstrou melhor desempenho. As variáveis, juntamente com os seus valores codificados e não codificados encontram-se na Tabela 7:

Tabela 7: Valores reais e codificados (+nível superior, 0 intermediário, - nível inferior) para as variáveis independentes, 22 .

Variáveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	50	51.4	55	58.5	60
Concentração de Substrato (mM)	50	53.6	62.5	71.3	75

3.2.12 - Aumento de Escala e Estudo da Influência de um Reator de Tanque agitado na síntese da MEP

A reação de formação de MEP, previamente otimizada em sistema de batelada com agitação orbital foi analisada em reator de batelada de tanque agitado (CSTR) Easy Max (Mettler Toledo). Nesta etapa, foram preparados 100mL de meio reacional, seguindo as concentrações de AE e IPG preconizadas no planejamento de experimentos anteriormente realizado, assim como agitação (250rpm) e ajustando-se proporcionalmente a quantidade de enzima (0,1% p/v).

3.2.13 - Avaliação da Capacidade de Reusos da lipase RM IM

A enzima RM IM, que apresentou melhores resultados nos sistemas em batelada e em fluxo contínuo estudadas, foi avaliada quanto a sua capacidade de reusos em cada reator aplicado. Nos reatores com agitação orbital e STR, após as reações para a formação de MEP, o referido biocatalisador foi filtrado em papel de filtro, sendo o sobrenadante separado e reservado. A enzima, então, foi lavada 3 vezes com 30mL de n-heptano, e levado a estufa durante 2 horas a 40°C. Após esta etapa de recuperação, a massa de biocatalisador foi aplicada em novas reações.

Na etapa em fluxo contínuo, após o tempo de residência estabelecido, e coleta das amostras, o sistema foi lavado 3 vezes com n-heptano pelo mesmo tempo de residência reacional.

3.2.14 - Quantificação de Proteínas Lixiviadas do Suporte (Lipase RM IM)

As amostras obtidas nas etapas anteriormente citadas foram submetidas a quantificação de possíveis concentrações de proteínas lixiviadas do suporte. Para tal, 2mL de cada amostra foi transferido para funil de separação de 10mL, seguido da adição de 2mL de Tampão Tris HCl 0,2M pH 7,5. O sistema foi suavemente agitado, aguardando-se a posterior

separação de fases. A fase orgânica foi descartada, sendo a fase aquosa submetida a quantificação proteica pelo método estabelecido por Bradford (Bradford 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.2.15- Análise do Suporte da Enzima RMIM por Microscopia Eletrônica de Varredura

A fim de se confrontar os resultados obtidos com os sucessivos ciclos da lipase RMIM nos reatores em STR e sob agitação orbital, na síntese de MEP, realizou-se uma análise de cada suporte através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio Shimadzu SuperScan SS-550 no laboratório de microscopia do GMPC-UEM, sob a responsabilidade da doutoranda Andreia Fátima Zanetti. Todas as micrografias foram obtidas das superfícies de fratura recobertas com ouro, preparadas previamente em um metalizador marca Shimadzu. Para isso, as amostras foram colocadas sobre o porta-amostra em fitas de carbono e sob vácuo, foram metalizadas. Depois do preparo, as amostras foram posicionadas no microscópio e bombardeadas por feixes de elétrons que interagem com os átomos da amostra. A partir da interação entre o feixe de elétrons e a amostra foram produzidas partículas e radiação que foram usadas para formar uma imagem ampliada da amostra.

*3.2.16 - Estudo da Dessorção da Lipase de *Rhizomucor miehei* de seu suporte*

A lipase de *Rhizomucor miehei* foi retirada de seu suporte através de metodologia modificada para este trabalho, anteriormente descrita por Cabrera et al (2008), para a enzima Novozym 435 e reproduzida por Costa et al (2011): 1g de RMIM foi vertida em 50mL de tampão fosfato 25mM, pH 7,0, contendo 2,5% (v/v) de Triton X-100. O sistema foi submetido a agitação orbital de 100rpm durante 4h. A suspensão foi filtrada a vácuo, sendo o sobrenadante submetido a ensaio de quantificação de proteínas através do método de Lowry (Lowry et al, 1951).

O método consiste da adição em tubos de ensaio de 0,4 mL da amostra (ou da solução padrão) adequadamente diluída, mais 2,0 mL da solução A (1,0 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio 2% p/v; 1,0 mL de solução de CuSO₄ 1% p/v , 98,0 mL de solução

de N_2CO_3 2% p/v em NaOH 0,1 N). Em seguida a solução é homogeneizada e, após 10 minutos, adiciona-se 0,2 mL da solução de Folin-Ciocalteu (diluída 1:2 em água destilada) e homogeneiza-se. Trinta minutos depois, é feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro em 660 nm.

A concentração de proteínas é calculada a partir da curva de calibração construída empregando solução padrão de albumina de soro bovino (BSA, 0,1 mg/mL) diluída para atingir concentrações entre (0,01 e 0,1 mg PTN/mL).

3.2.17 - Síntese de MEP e MRAG em condições de Fluxo Contínuo.

Síntese da MEP, assim como do MRAG foi investigada em etapa de fluxo contínuo, e posteriormente submetidas a otimização dos parâmetros reacionais. Foram adotados os seguintes procedimentos:

- Os meios reacionais contendo AE ou RAG com IPG, em n-heptano, nas concentrações desejadas, foram acondicionados em um frasco de HPLC com capacidade de 1L, com agitador magnético;
- A mistura de partida foi agitada durante 5 minutos, enquanto o equipamento X-Cube (Thales Nano – figura 28) foi equipado com o reator de leito fixo (0,6 ml de volume, 70 x 4mm) contendo a enzima RM IM.



Figura 28: Reator de Leito Fixo X-Cube (Thales Nano). Fonte: <http://www.thalesnano.com/products/x-cube>.

- Temperaturas entre 40 – 60°C, fluxos variando de 0,1 a 3,0 mL/min e pressão de 10 bar foram os parâmetros reacionais avaliados. A cada combinação de parâmetros selecionada, deu-se início ao processamento, bombeando-se apenas solvente puro (n-heptano), até que o sistema tenha atingido o equilíbrio nas condições desejadas;
- Transferiu-se o tubo de entrada do balão de solvente para o frasco contendo o meio reacional previamente preparado. Procedeu-se a reação até ser possível a coleta de um volume final de 3mL. As conversões foram analisadas pelo Método de Lowry-Tinsley, descrito anteriormente. Após o processamento através do reator de fluxo, o tubo de entrada foi inserido de volta para o frasco contendo n-heptano e o sistema foi lavado durante 10 minutos, a fim de se remover as possíveis impurezas da reação anterior. O excesso de heptano foi removido sob vácuo.

3.2.18 - Otimização das variáveis Reacionais:

Para otimizar as condições encontradas para a síntese tanto de MEP quanto de MRAG, foi aplicado um planejamento experimental fatorial fracionário 2^{3-1} (tabela 8). As variáveis independentes analisadas foram temperatura (T), o fluxo (Q) e a concentração de substrato (S), variando em dois níveis, com três repetições do ponto central. Cada experimento foi realizado em triplicata. Esta otimização foi seguida da proposição de um planejamento experimental fatorial 2^2 completo (tabela 9).

Tabela 8: Valores reais e codificados (+ alto nível, 0 intermediário, -baixo nível) para as variáveis independentes, 2^{3-1} .

Variáveis	-1	0	+1
T (°C)	40	50	60
S (mM)	35	67,5	100
Q (ml/min)	0,2	1,6	3

Tabela 9: Valores reais e codificados para as variáveis analisadas (+ nível superior, 0 intermediário – nível inferior) na reação de esterificação entre IPG e RAG catalisada pela lipase RM IM sob condições de fluxo contínuo.

Variáveis	-1.41	-1	0	+1	+1.41
[S] (mM)	67.5	71.9	83.7	95.3	100
Q (ml/min)	0.3	0.4	0.6	0.8	0.9

3.2.19 - Adaptação para outro Equipamento

Para se calcular os valores de produtividade, as reações previamente otimizadas em condições de fluxo foram analisadas em outro equipamento com leito fixo, entretanto, permitindo a utilização de quantidade conhecida de biocatalisador. Em frasco de HPLC de 1L foi acondicionada a mistura de reação desejada em heptano e uma barra de agitação. A mistura de partida foi agitada durante 5 min enquanto o instrumento (Sistema Asia 110 – figura 29) foi equipado com uma coluna de leito fixo Omnifit (2,4 ml) contendo a lipase imobilizada (420 mg). Foram utilizadas em cada caso, as temperaturas e fluxos previamente. Inicialmente, apenas solvente puro (n-heptano) foi bombeada através até que o instrumento tivesse atingido as condições pretendidas. Após os tempos de residência, as conversões foram analisadas pela mesma metodologia citada anteriormente. Concentrações de substratos variando de 0,1 a 2,5M também foram testadas em cada sistema, além da capacidade de reciclabilidade do sistema, como descrito anteriormente.



Figura 29: Sistema Asia de Fluxo Contínuo

3.2.20 - Estudo da Síntese de Monoacilgliceróis catalisada pela Lipase RM IM em sistemas livres de solventes

A síntese de MEP e MRAG catalisadas pela lipase RM IM foi analisada em sistemas livres de solventes. Tendo-se em vista as condições previamente otimizadas de temperatura, agitação, e quantidade de enzima, em sistema de batelada para a formação de ambos os produtos, avaliou-se a cinética de formação dos mesmos neste tipo de sistema. Concentrações de enzima variando de 0,5 a 3% foram analisadas, e as velocidades iniciais, calculadas. A reciclabilidade do biocatalisador foi também investigada. As reações foram realizadas em frascos erlenmeyer de 125mL contendo 1mmol de cada reagente, respeitando-se a razão molar otimizada de cada um.

3.3 – Síntese de MONOEST e MONORES via Reação Químio-Enzimática em Cascata

3.3.1 – Produção de Silicagel Funcionalizada (SGF)

As etapas de acetalização e posterior quebra do acetal da monoestearina protegida (MEP) e MAG proveniente do resíduo de ácidos graxos (MRAG) do sistema em cascata foram catalisadas por um catalisador heterogêneo, composto por silicagel funcionalizada (SGF). Para tal, 100mL de uma suspensão a 20% p/v de gel de sílica (60-100 mesh) em éter etílico foi preparada em um frasco erlenmeyer de 250mL. Sob banho de gelo, diversos volumes de ácido sulfúrico foram adicionados, até serem completadas as proporções de 1, 2,5, 5 e 10% p/v de ácido e suspensão. Cada sistema foi mantido sob agitação vigorosa por 30 minutos. Em seguida, cada suspensão foi transferida para bécheres de 250mL, onde o excesso de éter foi evaporado à temperatura ambiente.

3.3.2 – *Acetalização do Glicerol*

Em frasco de HPLC de 0,5L, 200mL de uma mistura de acetona e glicerol, em suas devidas proporções (1:1 – 1:6) foi acondicionada e submetida a agitação vigorosa, sob aquecimento a 50°C, enquanto o reator de fluxo contínuo foi equipado com uma coluna Omnifit (5,49 mL de volume total), previamente enchido com SGF (580 mg). Diferentes fluxos (de 0,1 - 3,0 mL / min), e as razões molares citadas acima foram estudadas, sendo os produtos finais analisados via CG-EM, como explicado na seção 3.5.1.

3.3.3 – *Reação de Esterificação*

Para a formação de MEP e MRAG, a etapa de esterificação foi realizada através da reprodução das condições reacionais previamente otimizadas para ambos os produtos através de planejamento de experimentos. Ambas as reações foram catalisadas pela enzima RM IM, em reator de leito fixo de 2,41mL de volume, preenchidos com 420mg de suporte.

3.3.4 – *Clivagem do Acetal Presente no MEP e no MRAG*

A solução de n-heptano contendo o éster desejado (MEP ou MRAG) e possíveis materiais de partida obtidos na etapa de esterificação foi bombeada através de uma coluna Omnifit (8,83 mL de volume total), preenchida com SGF (720mg). Diferentes fluxos (0,05-0,5 mL / min) foram investigados a 55° C. A seletividade para os possíveis produtos foi determinada via CG-MS, cuja metodologia foi descrita na seção 3.5.1.

3.3.5 - *Reação em Cascata*

Com o intuito de integrar as etapas de formação de MEP e MRAG e seus produtos desprotegidos, todas as reações foram realizadas em conjunto com a mesma temperatura e fluxo, seguindo as condições ideais encontradas no processo de clivagem do acetal. Primeiro, a solução final oriunda da etapa de acetalização do glicerol foi concentrada e o resíduo foi dissolvido em n-heptano. A solução resultante foi, em seguida, acoplada à coluna com RM IM com um conector de borracha no lado de baixo da coluna. A parte superior da mesma coluna foi conectada ao lado de baixo da terceira coluna Omnifit contendo SGF. Finalmente,

a parte superior do aparelho foi conectado a um frasco erlenmeyer para recolher o produto final.

3.4 – Biocatálise em sistemas microemulsionados: Micelas Reversas e Organogel

3.4.1 - Reações em microemulsões AOT/Isooctano

Antes da preparação das microemulsões, um estoque de enzima em solução tampão foi preparado. Para tal, a quantidade apropriada das lipases livres de *Rhizomucor miehei* e *Cândida antarctica* B foram dissolvidas em tampão Tris/HCl 0,2 M pH 7,5 de forma a atingir uma concentração final de 30mg/ml. Para a preparação de microemulsões AOT, uma solução estoque de AE e IPG (1: 1/100 mM) em AOT / isooctano 0,2 M foi preparado. 970µL desta solução estoque e 30µL da solução de enzima foram adicionados em criotubos de 3mL. O sistema foi cuidadosamente homogeneizado até ser obtida uma solução límpida, sendo posteriormente incubados a temperaturas entre 35-60° C sem agitação. A quantidade de água no sistema foi calculada de acordo com a expressão:

$$W_0 = [H_2O]/[AOT]$$

Inicialmente, foi utilizado um $W_0 = 8,35$, de acordo com Zoumpantioti et al (2006).

3.4.2- Reações em Microemulsões em Lecitina

Uma solução de estoque de 3,5% (p/p), contendo lecitina em isooctano 5% (v/v) em 1-propanol foi preparado. AE e IPG foram adicionados até a obtenção de uma concentração final de 100 mM de cada um. 970µL solução de substratos e 30µL de solução de enzima foram adicionados em criotubos de 3mL. O W_0 destes sistemas também foi 8 inicialmente. Os tubos foram incubados a 40°C, sem agitação.

3.4.3 – Análise das Conversões

As conversões obtidas neste sistema foram também analisadas através do método de Lowry-Tinsley, como explicado anteriormente. As melhores conversões encontradas foram confirmadas via análise em CG. Para isto, utilizou-se um cromatógrafo gasoso HP modelo CG-6890, equipado com coluna HP Innowax (30m x 0,25 mm de diâmetro x 0,32 mm de espessura de filme). A temperatura do injetor, assim como a do detector foi de 270°C. A rampa de aquecimento da coluna cromatográfica utilizada está explicitada na tabela 6.

Tabela 10: Tabela 6: Rampa de aquecimento utilizada na confirmação de conversão nas microemulsões estudadas

Velocidade (°C/min)	Temperatura(°C)	Tempo
	120°C	1 min
15	225°C	8 min
5	260°C	17 min

3.4.4 – Determinação dos Parâmetros Reacionais

A identificação de parâmetros cinéticos, como a velocidade máxima, as constantes de Michaelis-Menten, constante de inibição e a constante de dissociação foi usada a partir da equação para a velocidade de reação inicial. Valores das constantes cinéticas foram calculadas graficamente usando gráficos de *Lineweaver-Burk*.

Para sistemas com um único substrato (S) e um único produto, onde enzima e do substrato reage rapidamente para formar um complexo enzima-substrato (sistemas de equilíbrio rápidos) a velocidade inicial v é dada pela equação de Michaelis-Menten:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

Equação III

Para um sistema de 2 reagentes (substratos A e B), com um único produto (sistema uni bi aleatório) a equação (III) torna-se:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{aK_A K_{B_B} + aK_A [B] + aK_B [A] + [A][B]}$$

Equação IV

Onde a é o fator pelo qual a ligação de um substrato altera a constante de dissociação para o outro substrato. Esta equação, para um sistema bi uni ordenados, onde substratos combinam com a enzima livre, em uma ordem obrigatória (A combina-se com a enzima livre, B combina apenas ao complexo EA), torna-se:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_A K_{B_B} + K_B [A] + [A][B]}$$

(Equação V)

Para um sistema bi –bi ordenado, onde dois substratos (A e B) levam a dois produtos, a velocidade inicial, na ausência de produtos é dada pela equação:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_{ia} K_{m_B} + K_{m_A} [B] + K_{m_B} [A] + [A][B]}$$

(Equação VI)

Onde v é a velocidade inicial de reação; V_{\max} é a velocidade máxima; $[A]$ e $[B]$ são as concentrações iniciais de substratos; K_{m_A} é a constante de Michaelis para o substrato A; K_{m_B} é a constante de Michaelis para o substrato B e K_{ia} é a constante de dissociação para A.

3.4.5 - Preparação de Organogel

Os organogeles foram preparados através da introdução de quantidades adequadas de microemulsões em AOT previamente estudadas, contendo a lipase de *Cândida antarctica* B (sem substratos) em uma segunda solução de HPMC em água. Deste modo, 2 mL de microemulsão em AOT contendo 1,2 mg de lipase foram gelificados com 2,0 g de HPMC e 4,0 ml de água à temperatura ambiente. As reações de esterificação do AE e IPG foram estudadas tanto em batelada quanto sob fluxo contínuo. Para a etapa em batelada, 7 g de organogel (OG), contendo 1,2 mg de lipase, foram colocados num frasco com 10 mL de

solução dos substratos no solvente determinado (Isooctano, n-heptano, tolueno ou Ciclohexano). Os frascos foram incubados em temperaturas variando de 40-60°C sem agitação.

Para a etapa em fluxo contínuo, foi preparado previamente uma solução-estoque de AE e IPG nas mesmas proporções utilizadas na etapa em batelada, sendo esta mantida sob agitação, e bombeadas para uma coluna de leito fixo Omnifit (1,7671cm de diâmetro e 5 cm de altura = 8,83 ml de volume de reação), contendo 7 g da MBG desejado (1,2 mg de lipase). Parâmetros de reação (temperatura entre 40-60°C; fluxos variando de 0,1-3,0 ml/min) foram selecionados no reator de fluxo. Inicialmente, apenas solventes puros foram bombeados através do instrumento até que fossem atingidos os parâmetros de reação. As conversões nestas etapas também foram analisadas pelo método de Lowry-Tinsley (1976) modificado.

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussão

Parte 1: Biocatálise com Enzimas Comerciais

4.1 - Considerações Iniciais:

Neste capítulo, serão apresentados os resultados de esterificação obtidos com lipases comerciais imobilizadas. Esta etapa envolveu a otimização de variáveis reacionais em condições de batelada e fluxo contínuo, além da investigação do potencial de esterificação dos biocatalisadores em sistemas livres de solventes orgânicos.

4.2 - Análise de pureza dos Materiais de Partida.

Com o objetivo de analisar a pureza e conhecer os tempos de retenção dos reagentes de partida no método cromatográfico utilizado, iniciamos este trabalho analisando amostras de dois lotes de AE (AE), sendo um da marca Vetec Química[®], e outro da marca Sigma Aldrich[®], assim como de um lote de R,S-1,2-O-isopropilideno glicerol (IPG), da marca Fluka[®]. Estas foram derivatizadas com MSTFA, de modo a serem transformadas em seus derivados mais voláteis, conforme descrito na seção experimental, e analisados por Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a espectrometria de Massas (CG-EM). Os resultados são mostrados na figura 30:

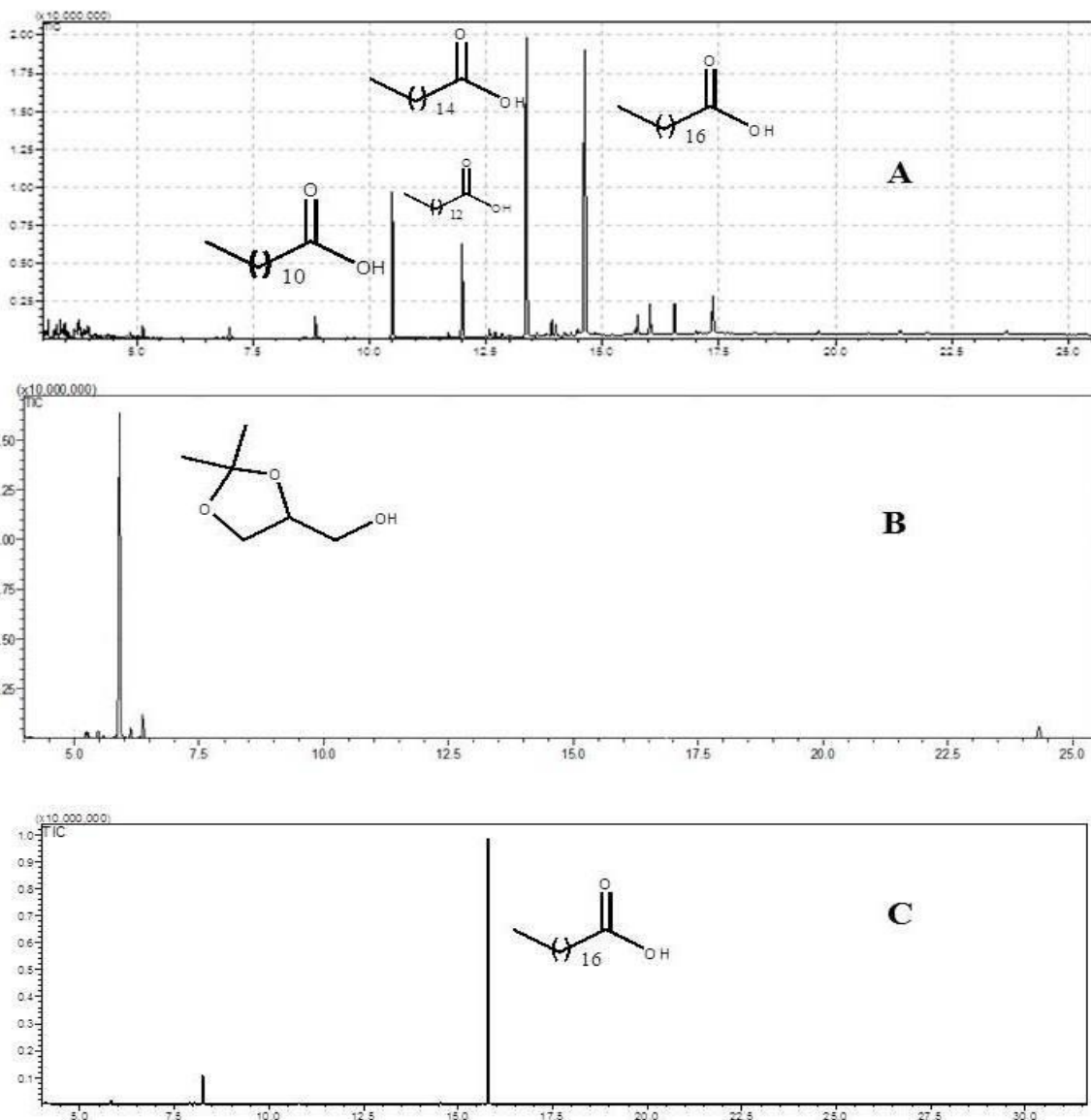


Figura 30: Cromatogramas dos Reagentes de Partida. A – AE puríssimo, marca Vetec®; B- IPG, marca Fluka®; C- AE 99,5% Sigma Aldrich®.

Como observado, o cromatograma do AE marca Vetec® (A) demonstrou a presença de 4 picos majoritários, que de acordo com as fragmentações decorrentes do espectrômetro de massas, são relativos aos os ácidos láurico (C_{12}), mirístico (C_{14}), palmítico (C_{16}), sendo o ultimo pico, com tempo de retenção de 14,7 minutos, o AE. Tal resultado demonstra uma má procedência do lote, ou resultado de reações de β -oxidação, catalisada por elevadas temperaturas e umidade, revelando más condições de armazenamento, já que o produto encontrava-se dentro do prazo de validade. Portanto, este lote foi descartado, sendo o trabalho iniciado com o AE Sigma-Aldrich (cromatograma C), que apresentou pureza aceitável. O reagente IPG (Cromatograma B) apresentou elevada pureza cromatográfica, pôde ser utilizado corretamente.

4.3 - Teste de solubilidade dos Reagentes

A fim de se obter a melhor concentração inicial de reagentes de partida, assim como o melhor solvente reacional, o AE e o IPG, foram submetidos isoladamente a ensaios de solubilidade em diferentes solventes orgânicos. Neste ensaio, concentrações molares variando de 50 a 300mM dos reagentes de partida foram testadas a 25°C e 60°C sob 150 rpm de agitação, de modo a obter o limite de solubilidade máxima dos mesmos. Para uma melhor visualização dos resultados experimentais no quadro abaixo (tabela 11), números foram atribuídos em relação a solubilidade dos substratos, onde:

- 1 – Totalmente solúvel: Solução límpida;
- 2 – Parcialmente solúvel: Solução turva;
- 3 – Insolúvel: Solução turva e corpo de fundo.

Tabela 11: Ensaio de solubilidade do AE e o do IPG

Solvente	AE								IPG							
	50mM		100mM		150mM		300mM		50mM		100mM		150mM		300mM	
	25°C	60°C	25°C	60°C	25°C	60°C	25°C	60°C	25°C	60°C	25°C	60°C	25°C	60°C	25°C	60°C
n-heptano	1	1	2	1	2	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
n-hexano	1	1	2	1	2	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
isooctano	1	1	2	1	2	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ciclohexano	1	1	2	1	2	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Como observado na tabela 11, o IPG não apresentou problemas quanto a solubilidade nos solventes orgânicos testados, podendo ser aplicado nas maiores concentrações. Tal dado é importante, pois comumente aplicam-se razões molares superiores de álcoois a ácidos em reações de esterificação catalisadas por lipases, no intuito de se acelerar a velocidade inicial do processo (Lafuente et al, 2011). Já o AE apresentou uma solubilidade dependente da concentração molar aplicada. Como a 25°C o AE é parcialmente solúvel a 100mM nos solventes testados, e a 50mM o mesmo é totalmente solúvel, decidimos utilizar a inicialmente uma concentração intermediária deste reagente de partida, (75mM), já que o método colorimétrico preconizado por Lowry & Tinsley (1976) e modificado por nosso grupo de pesquisa, aplicado neste estudo para a medição das conversões em éster nas reações

estudadas, é realizado nestas condições. Ácidos graxos insolúveis no meio levariam a formação de precipitados durante a leitura do complexo colorimétrico formado por estes e a solução de acetato de cobre II (Solução de Lowry-Tinsley), a 715nm. Pelo fato de o solvente n-heptano apresentar temperatura normal de ebulição de 98°C, facilitando, desta forma, a execução de experimentos a temperaturas mais elevadas, o mesmo foi escolhido para ser utilizado nos experimentos na presença de solventes orgânicos, além de já serem descritas na literatura algumas reações de esterificação tendo o n-heptano como solvente (Sutili et al, 2013; Campillo-alvarado et al, 2013).

4.4 - Seleção de Lipases

A fim de se encontrar um biocatalisador para as reações de esterificação realizadas neste estudo, foi feita uma triagem dentre lipases disponíveis em laboratório, as quais estão descritas na seção experimental. Nesta ocasião, investigou-se a capacidade de esterificação do AE e o IPG em n-heptano (figura 31), solvente anteriormente escolhido.

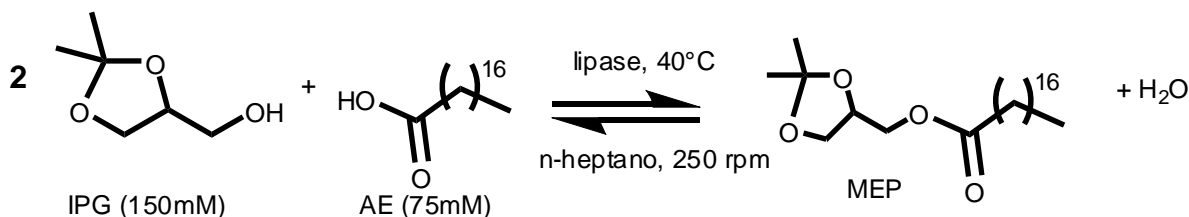


Figura 31: Reação de esterificação do AE e o IPG, realizada a 60°C, 250rpm e razão molar AE:IPG 1:2, e volume reacional de 1mL.

O produto final de esterificação deste álcool com o AE, gera o MAG correspondente (monoestearato de 1,2-o-isopropilideno glicerol (MEP)), cujas hidroxilas ainda apresentam-se protegidas por um acetal, clivado em etapas posteriores. Pelo fato de a metodologia de Lowry-Tinsley, empregada para o monitoramento conversões dadas por cada enzima, ser baseada na depleção da concentração de ácidos graxos livres, tomamos o AE como o reagente limitante da reação, e deste modo, foi proposta neste ensaio inicial, uma estequiometria 2:1 entre IPG e AE álcool, aumentando-se assim, na reação, a oferta de álcool no sistema.

Na literatura não há estudos realizados envolvendo a síntese de monoestearato de glicerila através de esterificação direta do AE com o IPG. Entretanto, Hess e colaboradores (1995) publicaram a síntese e purificação deste produto através de transesterificação do IPG com derivados ésteres de AE, dentre eles o estearato de etila, catalisada pela lipase de *Pseudomonas cepaceae*. Neste estudo, as maiores conversões foram encontradas após 50h, e

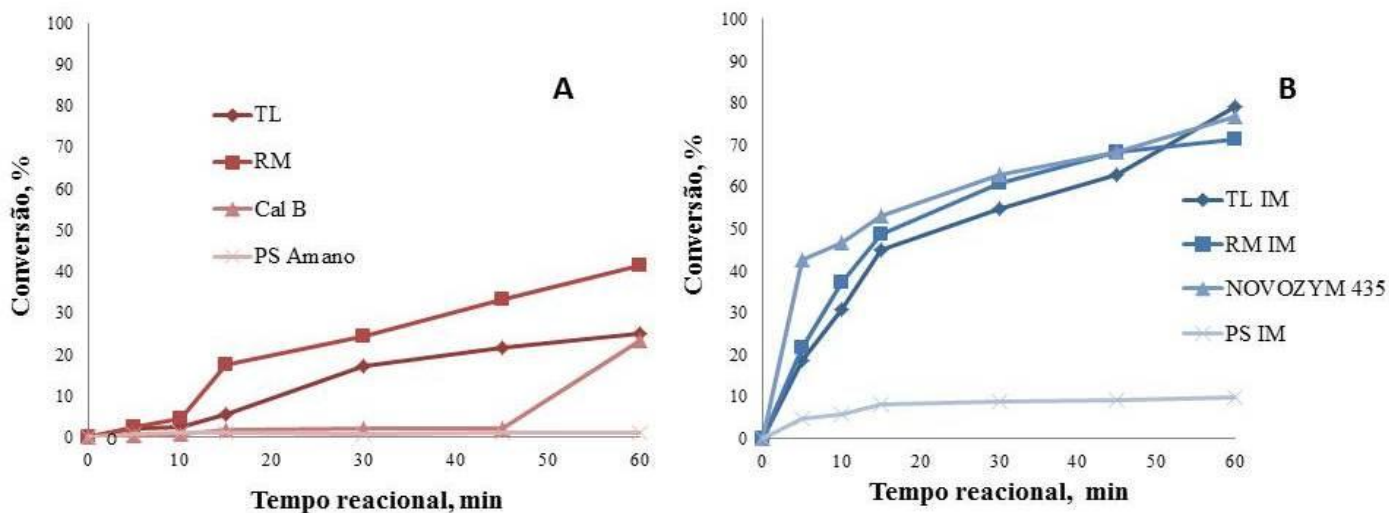


Figura 32: Investigação inicial de lipases na reação de esterificação do AE com o IPG. A- resultados obtidos pelas lipases em suas formas livres; B- resultados obtidos pelas lipases imobilizadas. Condições: AE (75mM) e IPG (150mM) 2:1 em n-heptano, 250 rpm, 60°C, lipases 1% p/p ou p/v.

com quantidades relativamente altas de biocatalisador (50mg/mL de meio reacional), a 40°C. quantidade de enzima utilizada por estes autores foi relativamente alta e a reação procedida em 50h, demonstrando algumas limitações reacionais, como por exemplo, o acesso do sítio catalítico da enzima ao IPG, que apresenta impedimento estérico causado pelo grupamento 1,2-dioxolano. Este efeito pode ser atenuado aplicando-se temperaturas mais elevadas, causando maior vibração das moléculas, proporcionando maiores encontros entre enzima e substrato. Pelo fato de existirem trabalhos na literatura onde as melhores conversões em ésteres foram obtidas em elevadas temperaturas utilizando os mesmos biocatalisadores propostos em nosso estudo (Raita et al, 2011; Bhandari et al, 2013), aliadas às dificuldades anteriormente citadas, optamos por iniciar este trabalho aplicando uma temperatura de 60°C, durante 1h sob 250rpm de agitação (figura 32). A quantidade de enzima também foi reduzida para 1% p/v ou p/p, dependendo do biocatalisador.

De acordo com os resultados obtidos, as enzimas imobilizadas demonstraram melhor desempenho do que as enzimas livres, gerando maiores conversões nos tempos testados. Isto pode ser explicado por algumas vantagens fornecidas pela imobilização de enzimas, afirmadas por diversos autores (Guisan *et al*, 2001; Mateo *et al*, 2007, Cunha et al, 2008) como por exemplo, a formação de uma camada de solvatação no micro-ambiente em torno do biocatalisador, capaz de manter uma dinâmica molecular mínima, essencial à atividade enzimática em ambientes orgânicos. As enzimas livres, quando suspensas em um solvente orgânico, tendem a se agregar e aderir às paredes do reator. Enzimas imobilizadas em suportes sólidos podem contornar esse problema, refletindo em melhores conversões. A

imobilização de enzimas pode ainda, otimizar a rigidez da estrutura molecular, minimizando a desnaturação causada por temperatura, pH ou solvente. Além disto, a interação entre a enzima e o suporte pode proporcionar mudanças conformacionais na enzima, provocando alterações desejadas nas propriedades catalíticas, como o aumento da atividade e estereoespecificidade.

As lipases imobilizadas de *Thermomyces lanuginosus* (TL IM) e *Rhizomucor miehei* (RM IM) apresentaram excelentes resultados, com 71 e 79% de conversão, respectivamente, em 1h de reação. A enzima Novozym 435, lipase B imobilizada, de *Cândida antarctica*, demonstrou resultados semelhantes, com 77% de conversão. Entretanto, como as duas primeiras lipases são menos estudadas na síntese de MAG de uma maneira geral, decidimos por continuar este estudo com estes biocatalisadores.

4.5– Escolha do melhor Tempo Reacional

Visando avaliar a reação de formação de MEP, uma cinética com o tempo máximo de 8h foi realizada com as lipases TL e RM IM, em busca do melhor tempo reacional. Cada ensaio foi conduzido em n-heptano, mantendo-se a relação 2:1 entre IPG e AE (150mM e 75mM). A cinética realizada foi destrutiva, com medição das conversões minuto a minuto até 15 minutos, e depois nos tempo 30, 45, 60, 120, 180, 240 e 360 minutos. Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados na Figura 33. Os pontos estão unidos por uma linha contínua para melhor visualização. Devido a semelhança entre os perfis cinéticos apresentados por ambas as enzimas, os resultados para cada biocatalisador foi separado em gráficos diferentes.

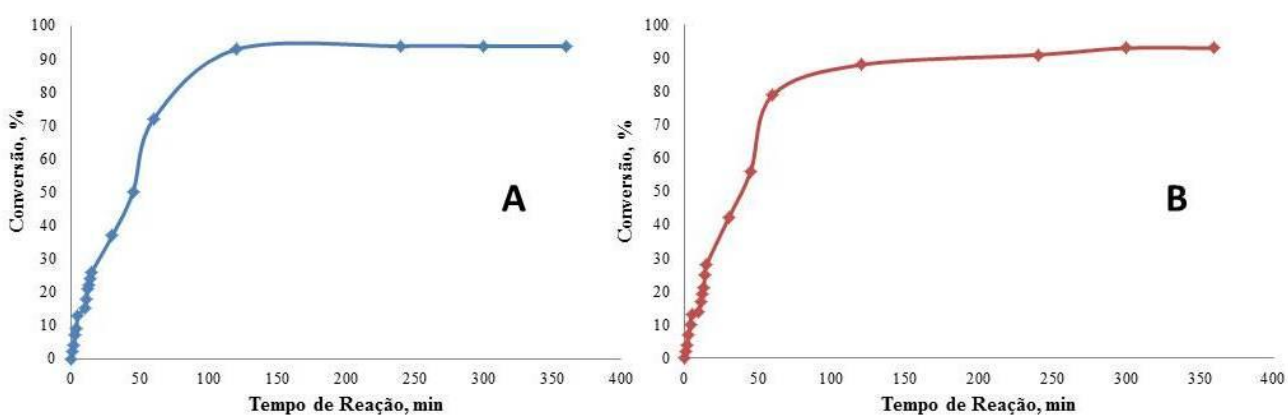


Figura 33: Cinética de produção enzimática do MEP em n-heptano. A- cinética da lipase RM IM; B- cinética da lipase TL IM. Condições: AE (75mM) e IPG (150mM) 2:1 em n-heptano, 150 rpm, 60°C, lipases 1% ou p/v.

Como observado, o aumento do tempo reacional, para ambas as enzimas, levou a um aumento significativo dos rendimentos, e atingiu o equilíbrio em 4 horas. Como entre 1 e 4h de reação, o aumento na formação de produtos é claramente visível, decidiu-se adotar 4h como tempo-padrão de reação para as etapas futuras. As lipases RM IM e TL IM foram selecionadas, devido a seus resultados promissores, e custos bem inferiores, se comparado com a lipase Novozym[®] 435, o que é um fator preponderante a ser considerado na reação (Gume et al, 2011), ainda mais quando se há a intenção de atingir aumentos de escala.

As atividade de esterificação nos tempos inicial, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180 e 240 min foi investigada, a fim de se identificar a atividade residual de cada enzima (tabela 12).

Tabela 12: Resultados experimentais da atividade de esterificação e atividade residual nas reações de determinação da tempo reacional de síntese enzimática do monoestearato de IPG utilizando as enzimas Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM, em n-heptano.

Tempo (min)	RM IM		TL IM	
	esterificação (U/g)Atividade de	Atividade Residual (%)Atividade Residual (%)	Atividade de Esterificação (U/g)	Atividade Residual (%)
0	65,56	100	59,34	100
5	65,28	99,91	58,35	98,33
10	64,45	98,64	59,12	99,63
15	65,23	99,83	57,31	96,58
30	64,73	99,06	58,18	98,04
45	65,27	99,89	56,12	94,57
60	65,12	99,66	57,14	96,29
120	64,27	98,36	56,94	95,95
180	63,34	96,39	56,75	95,63
240	65,12	99,63	57,29	96,54

De posse dos resultados demonstrados na tabela 12, pode-se afirmar que ambas as lipases foram capazes de manter suas atividades residuais após um ciclo de reação, sendo, portanto, passíveis de reusos posteriores. A enzima RM IM demonstrou uma maior retenção de atividade do que a lipase TL IM, que apresentou cerca de 95% de sua atividade inicial, ao fim do ciclo de 4h de reação, podendo ocasionar menores eficiências em reciclos futuros.

4.6 – Efeito do Solvente

A fim de se investigar a influência de outros solventes na formação do MEP, além de se certificar de que o n-heptano, era, de fato o melhor solvente reacional, a referida reação foi analisada com as enzimas RM IM e TL IM, nas mesmas condições anteriores (Figura 34), com os solventes onde o AE foi solúvel, de acordo com a tabela 11.

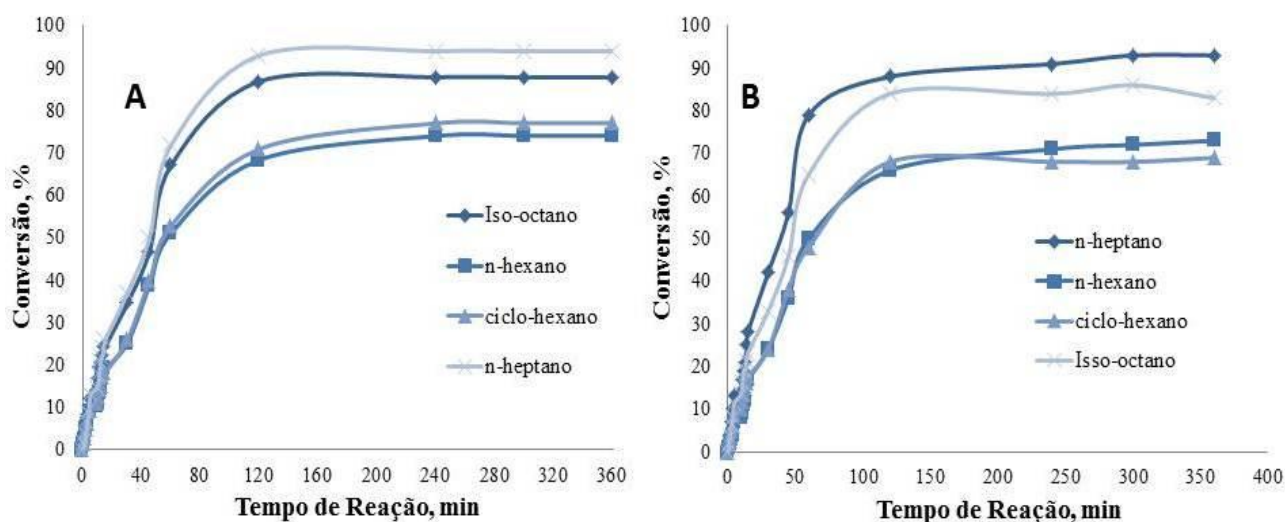


Figura 34: Figura 33: Resultado experimental da cinética de reação de formação do MEP em diferentes solventes. A- Resultados obtidos com a enzima RM IM; B- Resultados obtidos com a enzima TL IM. Condições: AE:IPG 1:2, 60°C, 250 rpm.

A figura 34 mostra que o n-heptano foi o solvente que menos interferiu na ação catalítica das enzimas testadas, gerando maiores conversões. Este resultado está relacionado com o Log P deste solvente, que é 4,0, caracterizando-o como altamente hidrofóbico. Em solventes orgânicos anidros, as enzimas permanecem cineticamente aprisionadas a sua conformação nativa (Cetina et al, 2011; He et al, 2012). A baixa constante dielétrica dos solventes faz com que haja aumento nas interações eletrostáticas dos resíduos carregados das proteínas o que causa diminuição da flexibilidade interna tornando as enzimas menos ativas, embora preserve a integridade estrutural da proteína (Zaks, 1996).

As propriedades dos solventes como polaridade, hidrofobicidade (determinada como log P), geometria molecular e habilidade de solvatação são essenciais à biocatálise em meio orgânico. No entanto, não existem correlações de caráter geral entre essas propriedades e a atividade e estabilidade enzimática. O efeito dos solventes é distinto para cada enzima. Enquanto lipases são mais estáveis em solventes hidrofóbicos ($\log P > 2$), a quimotripsina, por exemplo, é mais estável em solventes relativamente hidrofílicos e não foi notada nenhuma

correlação entre a atividade da polifenol oxidase e a hidrofobicidade de solventes desde que a atividade de água no meio fosse controlada (Yang & Russel, 1996, citado por Machado et al, 2011). A fim de se avaliar a influência do solvente orgânico na reação de estudo, as velocidades iniciais de cada sistema, assim como as atividades residuais de cada biocatalisador nos determinados solventes foram calculadas. As velocidades iniciais foram calculadas baseando-se nos resultados presentes na figura 34, e utilizando-se e utilizando-se a fórmula II, do item 4.4 da seção experimental. Os valores de atividade residual foram calculados a partir da diferença entre as atividades das enzimas no início da reação, e ao final do ciclo (item 4.4.1 – seção experimental). Os resultados obtidos para cada enzima e solvente, além dos valores de Log P dos mesmos, encontram-se na tabela a seguir:

Tabela 13: Velocidade Inicial de reação, Atividade residual e valores de Log P dos solventes orgânicos utilizados na síntese do MEP catalisada pelas lipases RM IM e TL IM.

Solvente	Velocidade inicial (min ⁻¹)		Atividade Residual (%)		Log P
	RM IM	TL IM	RM IM	TL IM	
Isooctano	6,2	5,9	94	90	4,3
n-Heptano	7,1	6,8	97	95	4,0
n-hexano	4,2	3,5	89	84	3,5
Ciclo-hexano	2,1	1,4	85	79	3,2

Neste estudo, pôde ser observada uma íntima relação entre os valores de Log P dos solventes utilizados e os valores de velocidade inicial apresentados pelas enzimas, onde o n-heptano, e o Isooctano, solventes de maiores Log P, expressaram maiores valores de velocidade inicial, corroborando os trabalhos de He (2011) e Cetina (2012), demonstrando, de fato, maior estabilidade dos biocatalisadores durante a reação, que foi confirmada através dos valores de atividade residual, onde ambas as lipases foram capazes de manter praticamente toda a atividade inicial após o ciclo reacional em ambos os solventes, sendo mais preservada em n-heptano.

Silva e Jesus (2003) investigaram a síntese de n-pentil laurato catalisada pela lipase de *Mucor javanicus* em diferentes solventes orgânicos. A enzima não apresentou atividade catalítica nas reações realizadas com solvente relativamente hidrofílico (log P < 2), apresentou eficiência catalítica moderada em solvente com log P entre 2 e 4; e alta eficiência em

solventes fortemente apolares ($\log P > 4$). Os rendimentos em n-pentil laurato foram 82% em hexano ($\log P = 3,5$), 70% em ciclohexano ($\log P = 3,2$), 68% em tolueno ($\log P = 2,5$) e em diclorometano ($\log P = 0,93$), acetona ($\log P = -0,23$) e acetonitrila ($\log P = -0,33$) não foi observada a formação do éster.

Apesar das numerosas exceções, o parâmetro Log P é o que apresenta melhor correlação com a atividade de enzimas e, geralmente, as enzimas são mais estáveis em solventes com caráter hidrofóbico. Entretanto, aumentos nesta constante apresentam limites para que se tenha um sistema ideal. Analisando-se os valores de velocidade inicial obtidos pelas lipases TL IM e RM IM, nos sistemas em isooctano e em n-heptano da tabela 12, observa-se que em n-heptano, a catálise ocorreu de forma mais acelerada, e estável, mesmo sendo o Log P do n-heptano menor do que o do isooctano. Este resultado pode ser explicado pelos valores de viscosidade de cada um dos solventes, onde a do n-heptano é 0,386 cP, enquanto que o do isooctano é de 0,542cP, ambos a 25°C. Em solventes mais viscosos, há uma menor superfície de contato entre enzima e substratos, interferindo nas conversões finais.

A forma como os solventes afetam a atividade enzimática e a enantiosseletividade ainda não é bem compreendida e as hipóteses apresentadas para explicar esse fenômeno apresentam discrepâncias entre si (Costa e Amorim 1999).

Hess e colaboradores (1995) investigaram anteriormente o efeito do solvente orgânico na esterificação do IPG com ésteres de ácidos graxos, dentre eles, o estearato de etila (tabela 10). Nesta ocasião, os melhores resultados foram encontrados em n-heptano e em n-dodecano, solventes de maiores Log P (4 e 6,6, respectivamente), sendo os maiores valores de conversão (84% em 580h) e velocidade inicial descritos para o n-heptano (tabela 14 e figura 35), reforçando a escolha deste solvente para as reações de nosso estudo.

Tabela 14: Velocidade inicial de reação, atividade residual e valores de Log P dos solventes orgânicos utilizados na transesterificação do IPG e o estearato de etila para a síntese do de monoestearato de IPG, catalisada pela lipase de *Pseudomonas cepaceae*. Adaptado de Hess et al, 1995.)

Solvente	Velocidade Inicial ($\mu\text{mol mg} \cdot \text{h}$)	Atividade Residual (%)	Log P	Tempo Reacional (h)
n-dodecano	0,43	46	6,6	450
n-heptano	1,43	64	4,0	580
n-hexano	0,48	57	3,5	240
Clorofórmio	0,005	37	2,0	400
DMF	0	0	1,0	200

A lipase de *Pseudomonas cepaceae* apresentou forte influência reacional dentre os solventes testados neste trabalho, apresentando equilíbrios em tempos distintos, de acordo com cada solvente, refletindo nos diferentes valores de velocidades iniciais encontradas (tabela 10).

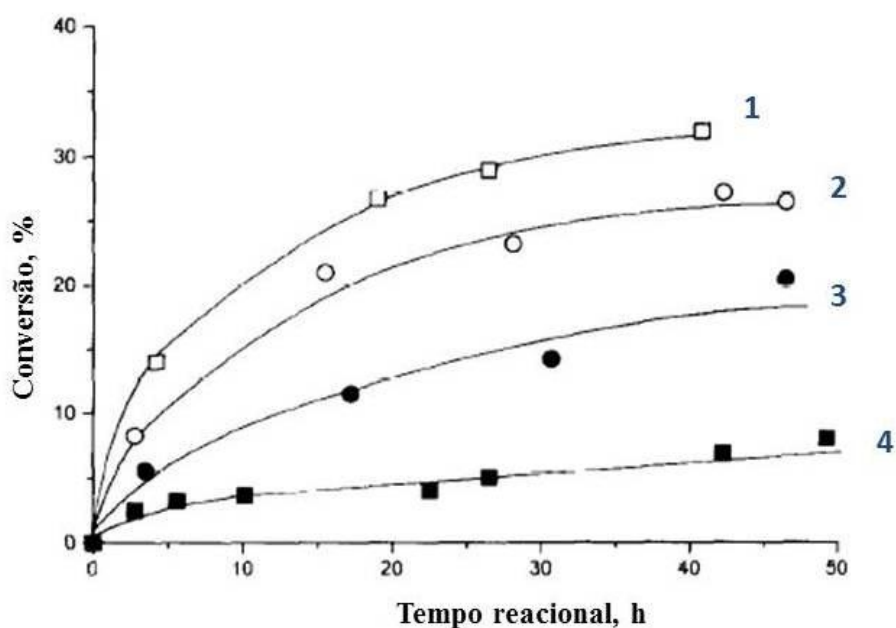


Figura 35: Tempo de reação para a transesterificação do IPG e o estearato de etila em diferentes solventes. 1- n-heptano; 2- n-dodecano; 3- n-hexano; 4 – clorofórmio; 5 – dimetilformamida. Fonte: Hess et al, 1995

4.7 - Efeito da Razão Molar de IPG e AE na Cinética de produção do MEP em *n*-heptano

Considerando os MAGs como importantes aditivos alimentares, além de apresentarem grandes aplicações em processos industriais, reduzir custos com materiais de partida, como por exemplo, o reagente IPG, em excesso na reação, representa crucial relevância. Deste modo, a próxima etapa deste trabalho consistiu na avaliação do efeito da razão molar entre os reagentes, na cinética de formação do MEP. Os experimentos para as enzimas TL e RM IM foram realizados nas mesmas condições de temperatura, agitação e quantidade de enzima aplicadas anteriormente, variando-se as razões molares de AE:IPG em 1:1; 1:2 e 1:3 (figura 36). As velocidades iniciais de reação em cada sistema também foram calculadas (tabela 15).

A partir da Figura 35, pode-se verificar que nos dois biocatalisadores estudados, as conversões são próximas nos 15 primeiros minutos de reação. Nas razões molares de 2:1, e 3:1, de fato, são atingidas menores conversões do que na razão 1:1 entre substratos, onde, com a enzima TL IM 81% de conversão são alcançados, e 83% com a RM IM.

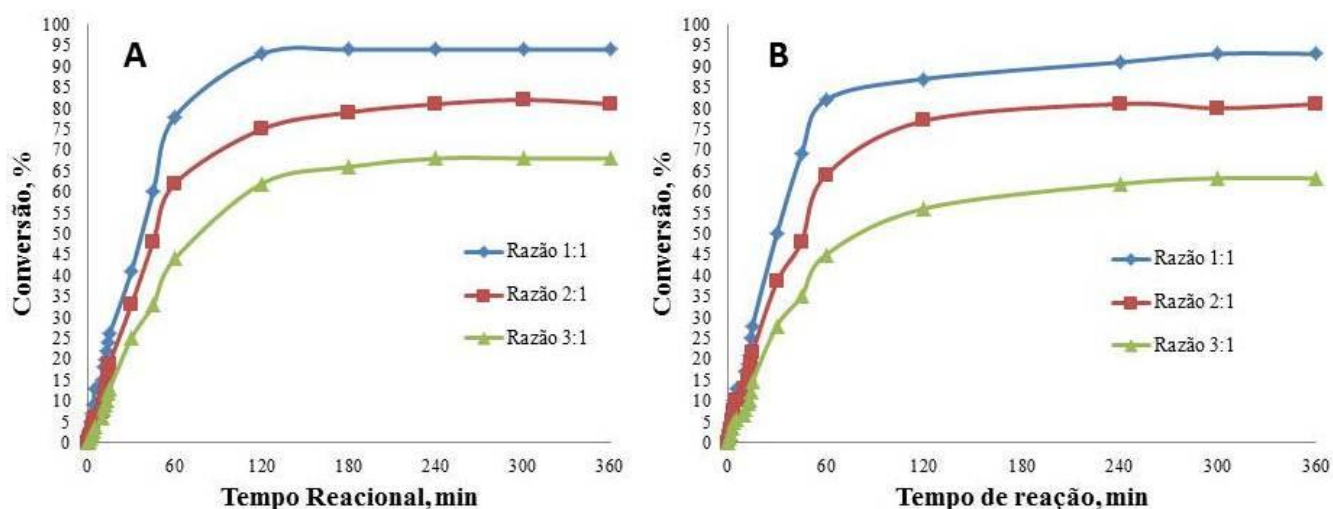


Figura 36: Efeito da razão molar sobre a conversão de monoestearato de IPG à temperatura de 60°C, concentração de enzima de 1% (p/v) e agitação de 250 rpm.

Tabela 15: Velocidade inicial de reação em função da razão molar de substratos na cinética de formação da MEP em n-heptano, utilizando as enzimas RM IM e TL IM.

Razão Molar AE: IPG	r (min ⁻¹)	
	Lipozyme TL IM	Lipozyme RM IM
1:1	2,92	3,28
1:2	2,5	1,9
1:3	1,81	1,65

A razão molar entre álcool e ácido é um dos parâmetros mais importantes no que diz respeito às esterificações enzimáticas. Uma vez que a reação é reversível, um aumento na quantidade de um dos reagentes poderá resultar em mais altas conversões, e como esperado, deslocará o equilíbrio químico na direção do produto. Um caminho de deslocamento da reação na direção da síntese é o aumento da concentração de álcool (Richete, 2009). Contudo, altas concentrações de álcool podem reduzir a velocidade inicial de reação, como na presente reação em estudo, onde a explicação pode vir a partir da inibição da enzima pelo álcool nestas concentrações testadas. Dörmo et al (2004) analisaram o efeito da razão molar de ácido:álcool (1:1, 1:2, 1:5 e 2:1) na esterificação de oleato de isoamila na temperatura de 40°C, 0,5% de enzima (N 435), agitação de 150rpm e 7 horas de reação, obtendo as mais altas conversões em 4 horas de reação (70-80%) com as razões molares de 1:2 e 1:5. Entretanto, há exemplos na literatura onde a razão equimolar de reagentes leva a melhores conversões. Em um sistema reacional utilizando heptano como solvente Krishna et al (2000), citado por Richete (2009), obtiveram 95% de conversão de acetato de isoamila, utilizando 3g/L de Lipozyme IM-20 (34% p/p substratos), com concentração equimolar dos substratos (0,06M) a 40°C em 72 horas. Neste ano, Zhong et al (2013), obtiveram as melhores condições para a síntese de oleatos de alquila catalisada pela lipase de *Cândida* sp. 99-125 (5% p/p) em razões equimolares de ácido oleico e álcool em temperatura ambiente, com sistema livre de solvente.

Embora com uma razão molar de 1:1 entre os substratos, ainda foi-se possível obter em nosso trabalho boas taxas de conversão em produto com as lipases TL IM e RM IM, mesmo um pouco inferiores às conversões apresentadas em razão de 2:1 entre álcool e ácido. Entretanto, trabalhar com proporções equimolares de reagentes é vantajoso em termos de desenvolvimento industrial e econômico, pois desta forma, bons rendimentos podem ser obtidos, evitando-se aumento de resíduos, além de diminuir custos com matérias-primas em excesso. Deste modo, optamos por utilizar razões equimolares entre os referidos reagentes

nas próximas etapas, que consistiram na otimização das condições reacionais avaliação das interferências de algumas variáveis no processo.

4.8 - Otimização dos Parâmetros Reacionais

A fim de se otimizar as condições reacionais exploradas inicialmente, um planejamento fatorial fracionado (FFD) de experimentos foi proposto, objetivando comparar as performances das lipases RM IM e TL IM como biocatalisadores na síntese MEP. Desta forma, para um estudo preliminar, adotamos um planejamento fatorial de 2 níveis. Primeiro, realizou-se um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para cada biocatalisador, a fim de se determinar as variáveis de maior influência para cada enzima nesta reação. Esta primeira parte do estudo gerou 22 experimentos, onze ensaios para cada lipase, que foram realizados em triplicata, gerando um total de 66 experimentos. As variáveis estudadas neste primeiro planejamento foram temperatura (T), quantidade de lipase (E), concentração do substrato (S) e agitação (Ag). O tempo de reação foi mantido em 4h, seguindo a cinética anteriormente realizada, com o intuito de não gerar detrimento dos dados estatísticos. Os resultados observados para ambas as enzimas encontram-se na tabela 16:

Tabela 16: Resultados do planejamento experimental fatorial completo obtido para apresentados pelas enzimas estudadas.

Entrada	Níveis de Variáveis				Conversão (%) ^a	
	T (°C)	E (%)	S (mM)	Ag (rpm)	RMIM	TL IM
1	-1 (40)	-1 (0.1)	-1 (50)	-1 (50)	70	70
2	+1 (60)	-1 (0.1)	-1 (50)	+1 (250)	85	78
3	-1 (40)	+1 (1)	-1 (50)	+1 (250)	90	91
4	+1 (60)	+1 (1)	-1 (50)	-1 (50)	88	84
5	-1 (40)	-1 (0.1)	+1 (100)	+1 (250)	43	48
6	+1 (60)	-1 (0.1)	+1 (100)	-1 (50)	64	65
7	-1 (40)	+1 (1)	+1 (100)	-1 (50)	80	86
8	+1 (60)	+1 (1)	+1 (100)	+1 (250)	79	80
9	0 (50)	0 (0.55)	0 (75)	0 (150)	72	72

10	0 (50)	0 (0.55)	0 (75)	0 (150)	72	73
11	0 (50)	0 (0.55)	0 (75)	0 (150)	73	72

^a Medidos pelo método de Lowry-Tinsley modificado

Em grande parte dos experimentos realizados, as lipases RM IM e TL IM, apresentaram resultados semelhantes, independentemente das variáveis estudadas, sendo observadas diferenças consideráveis de conversão entre ambas as enzimas apenas nos experimentos 2 e 7. Os melhores resultados foram obtidos quando utilizou-se 50mM de substratos, 1% (p/v) de enzima a 40°C e 250 rpm, proporcionando 90% de conversão (experimento 3). Todavia, é importante observar que, em uma concentração mais baixa de biocatalisador (0,1% p/v), ótimas conversões (85%) também puderam ser obtidas com a lipase RM IM, demonstrando alta eficiência em baixas concentrações (experimento 2). Os efeitos estimados e os valores de p encontrados para as variáveis estudadas são mostrados na Tabela 17:

Tabela 17: Efeitos estimados para cada enzima estudada no FFD 2⁴⁻¹

Variável	Efeito		Valor de p	
	RMIM	TLIM	RMIM	TLIM
Média	80.2625	78.6625	<0.0001*	<0.0001*
Curvatura	-12.6917	-11.8983	0.0197*	0.0050*
Temperatura (T)	7.6450	1.6150	0.0149*	0.0676
Quantidade de Enzima (E)	17.8600	20.3150	0.0027*	<0.0001*
Concentração de Substrato (S)	-17.3850	-10.4650	0.0029*	0.0017*
Agitação (Ag)	-1.8400	-0.6350	0.1912	0.2880

*Estatisticamente significativa a um intervalo de confiança de 95%.

A temperatura apresentou um efeito positivo (7,64) dentro da faixa estudada: elevações na temperatura provocaram aumentos significativos na conversão do produto, como pode ser visto nos experimentos 1 e 2, da tabela 16 - Quando a temperatura aumenta de 40°C (experimento 1) para 60°C (experimento 2), sob a mesma concentração de substrato (50 mM), é gerado um aumento de conversão de 70% para 85% com a lipase RM IM, e de 70% para

78% com a lipase TL IM. A variável agitação (Ag) não foi significativa no processo, já que apresentou um valor de $p > 0,05$. Ainda na tabela 17, podemos observar que a quantidade de enzima apresentou um alto efeito estimado (17,86). Além disto, houve-se a necessidade de inclusão de pontos axiais para a curvatura no modelo a fim de obter um $p < 0,05$.

De acordo com os resultados demonstrados, a enzima Lipozyme RM IM foi selecionada para dar continuidade ao processo de otimização das variáveis de reação.

4.9 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a produção de MEP

Após o primeiro planejamento fatorial fracionário, realizado anteriormente, um delineamento do composto central rotacional (DCCR) foi empregado para obter as condições ótimas para a esterificação em questão. O estudo foi realizado utilizando a lipase RM IM, que apresentou o melhor desempenho nos experimentos anteriores, com 85% de conversão com apenas 0,1% do biocatalisador. Deste modo, o processo torna-se mais barato do que utilizar 1% desta enzima para se obter 90% de produto final, quantidade exigida pela enzima TL IM. Os parâmetros de reação envolvidos foram a temperatura (T) e a concentração de substrato (S). A agitação foi fixada a 250 rpm de acordo com os resultados preliminares. Embora a quantidade de enzima (E) tenha apresentado um efeito estimado positivo anteriormente, esta foi fixada em 0,1% p/v, visando uma aplicabilidade industrial, uma vez que bons resultados foram obtidos com esta quantidade de biocatalisador.

No DCCR proposto, ambas as variáveis selecionadas foram variadas em cinco níveis, resultando em 11 experimentos principais, incluindo quatro pontos fatoriais e três pontos centrais que permitem verificar a curvatura. Para ajustar um modelo de segunda ordem, quatro pontos adicionais com a mesma distância a partir do ponto central foram adicionados a matriz deste delineamento. As variáveis utilizadas, com seus respectivos níveis, assim como os resultados obtidos para a síntese de MEP são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18: Planejamento fatorial completo e resultados obtidos com a lipase RM IM para a síntese de MEP

Entrada	Níveis de Variáveis		Conversão (%) ^a
	T (°C)	S (mM)	
1	-1(51.4)	-1(53.6)	75
2	-1(51.4)	+1(71.3)	69
3	+1(58.5)	-1 (53.6)	95
4	+1(58.5)	+1 (71.3)	68
5	-1.41(50)	0 (62.5)	70
6	+1.41(60)	0 (62.5)	86
7	0 (55)	-1.41 (50)	81
8	0 (55)	+1.41 (75)	69
9	0 (55)	0 (62.5)	74
10	0 (55)	0 (62.5)	74
11	0 (55)	0 (62.5)	74

^a Analisado pelo método de Lowry-Tinsley modificado.

Neste experimento, excelentes conversões puderam ser obtidas pela otimização das condições reacionais, atingindo 95% de conversão (experimento 3). Foi-se também obtido o efeito quadrático, o que demonstrou que a temperatura e concentração do substrato e a interação entre estes foram significativas no processo. Estes resultados encontram-se no gráfico de pareto, figura 37.

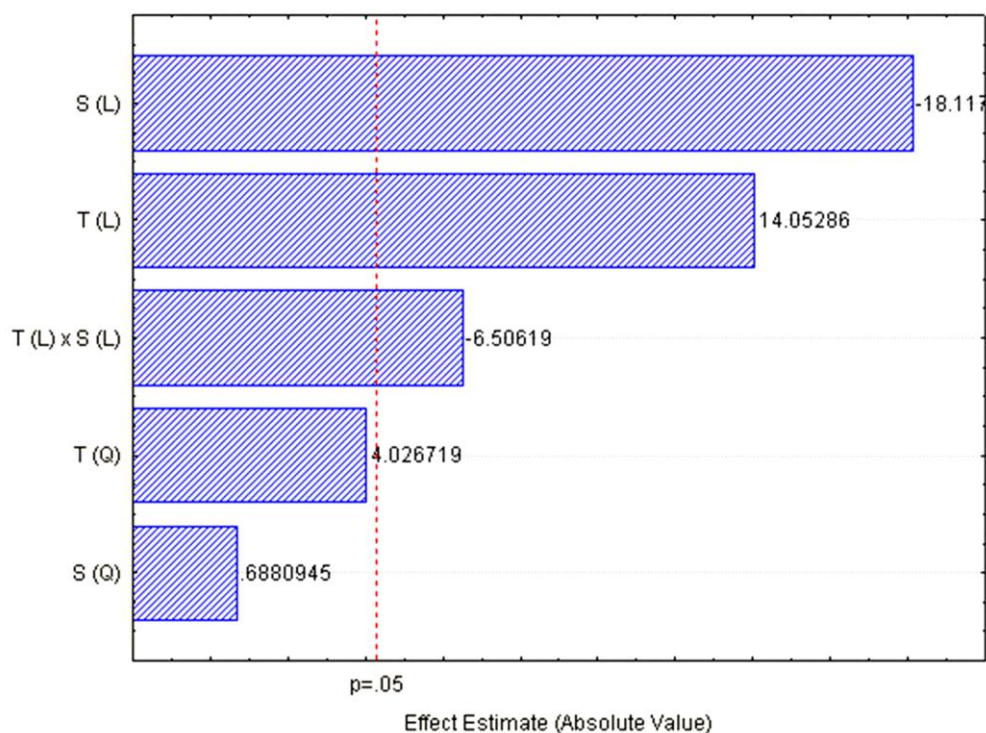


Figura 37: Gráfico de Pareto do DCCR evidenciando a significância da Temperatura e da concentração do substrato. T, temperatura, S, concentração de substrato, L, efeito linear, Q, efeito quadrático.

Analisando-se a figura, um efeito negativo da concentração do substrato no intervalo estudado é observado. Tal fato pode ser explicado por uma menor homogeneidade do meio gerada pelo aumento da concentração do substrato, o qual por sua vez dificulta o contato do substrato com o sítio ativo da enzima. Outra explicação plausível seria uma possível inibição da enzima por elevadas concentrações de substrato. Nos experimentos 1, 2 e 3, 4 (Tabela 18) há um efeito claramente negativo desta variável, uma vez que quando se aumenta a concentração de substratos, a conversão de produto, também diminui.

A validação do modelo matemático foi realizada por meio da análise de variância e parâmetro R^2 . O teste estatístico do modelo foi feito pelo teste estatístico de Fisher para ANOVA. A Equação (1) representa o modelo matemático da formação da MEP em função das variáveis:

$$\text{Convers\~{a}o MEP (\%)} (RMIM) = 74.77 + 5.94T - 7.65S - 3.89T \cdot S \quad (1)$$

onde T e S s\~{a}o os valores n\~{a}o codificados de temperatura e concentra\~{c}o\~{a}o do substrato, respectivamente. O teste estat\~{i}stico do modelo pode ser observado na Tabela 15.

Tabela 19: An\~{a}lise de Vari\~{a}ncia para a valida\~{c}o\~{a}o dos modelos matem\~{a}ticos (ANOVA)*

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado M\~{e}dio	F calculado	F tabelado	Valor de p
Regress\~{a}o	812.27	3	270.75	17.80	4.34	0.0011
Res\~{i}duo	106.42	7	15.20			
Falta de Ajuste	103.55	5				
Erro puro	2.85	2				
TOTAL	918.69	10				

*N\~{i}vel de confian\~{c}a 95%.

A Tabela 19 representa a an\~{a}lise de vari\~{a}ncia (ANOVA) que mostra a validade do modelo pelo teste F e res\~{i}duo que mostra a magnitude do erro experimental. O F calculado (17,80) foi maior do que o F tabelado ($F_{3,7} = 4,34$), mostrando a validade do modelo experimental. A reprodutibilidade do modelo pode ser verificado pela determina\~{c}o\~{a}o do R^2 . O coeficiente de determina\~{c}o\~{a}o ($R^2 = 0,90$) implica que a varia\~{c}o\~{a}o de 90% da amostra para a produ\~{c}o\~{a}o de \u00e9ster \u00e9 atribu\~{i}da \u00e0s vari\~{a}veis independentes e podem ser precisamente explicadas pelo modelo.

A Figura 38 mostra que a diminui\~{c}o\~{a}o da concentra\~{c}o\~{a}o de substrato e o aumento de temperatura resultam em uma resposta \u00f3tima. Entretanto, h\~{a} um limite para o aumento da temperatura para que a desnatura\~{c}o\~{a}o do biocatalisador possa ser evitado.

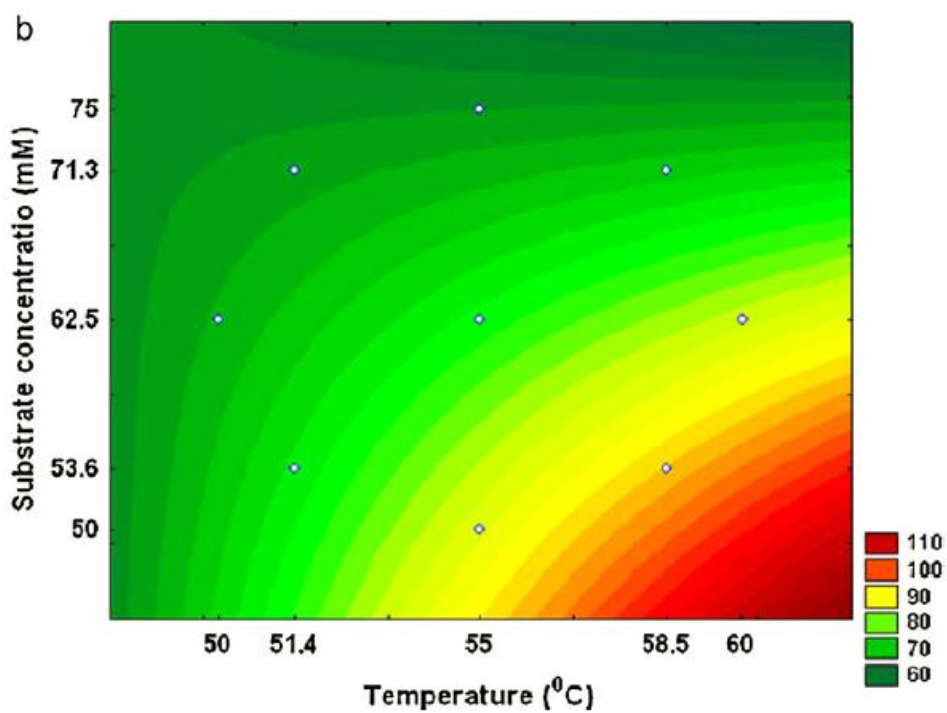
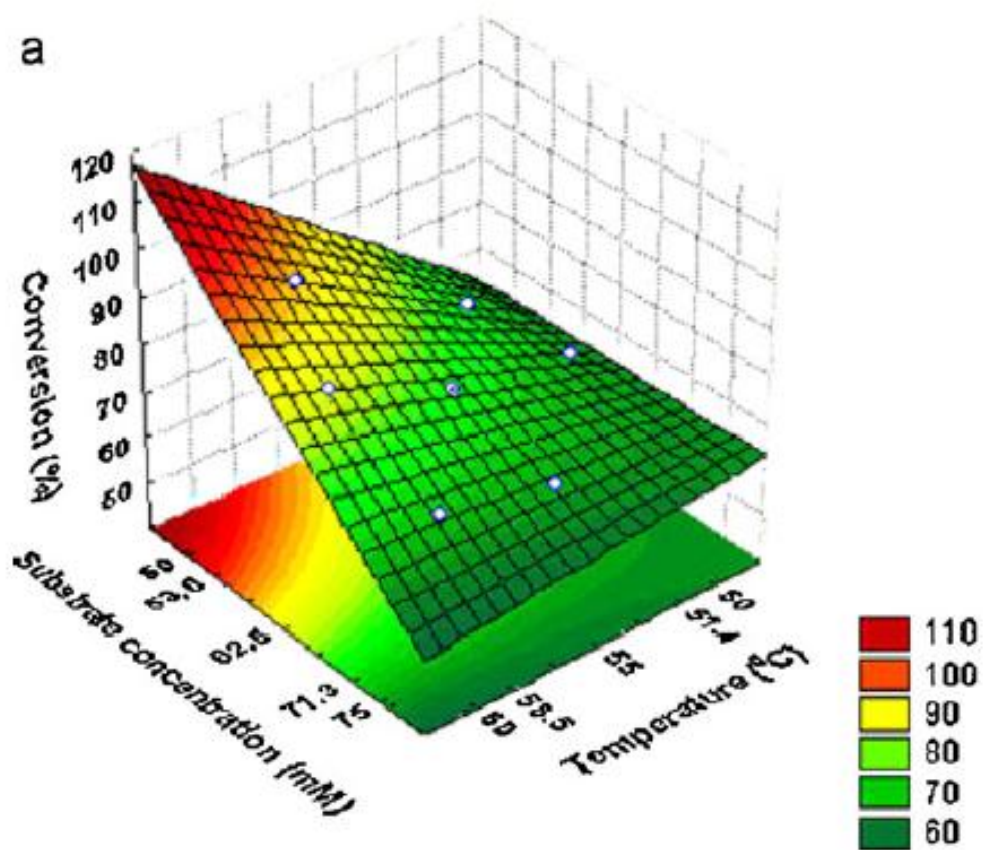


Figura 38: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a formação de MEP catalisada pela enzima Lipozyme RM IM, em função da temperatura e da concentração do substrato.

4.10 – Avaliação da Capacidade de Reusos da enzima Lipozyme RM IM

A lipase Lipozyme RM IM, que apresentou os melhores resultados nos planejamentos experimentais propostos anteriormente para a otimização das condições reacionais, foi investigada quanto a sua capacidade de reutilização. Para isto, ciclos sucessivos de 4h de reação (1mL de meio reacional) foram realizados, e a conversão medida ao fim de cada um deles (figura 39). Entre cada ciclo, a lipase foi lavada com n-heptano em papel de filtro, e posteriormente seca. Uma alíquota de cada reação foi investigada quanto a quantidade de proteínas, como descrito na seção 3.4.

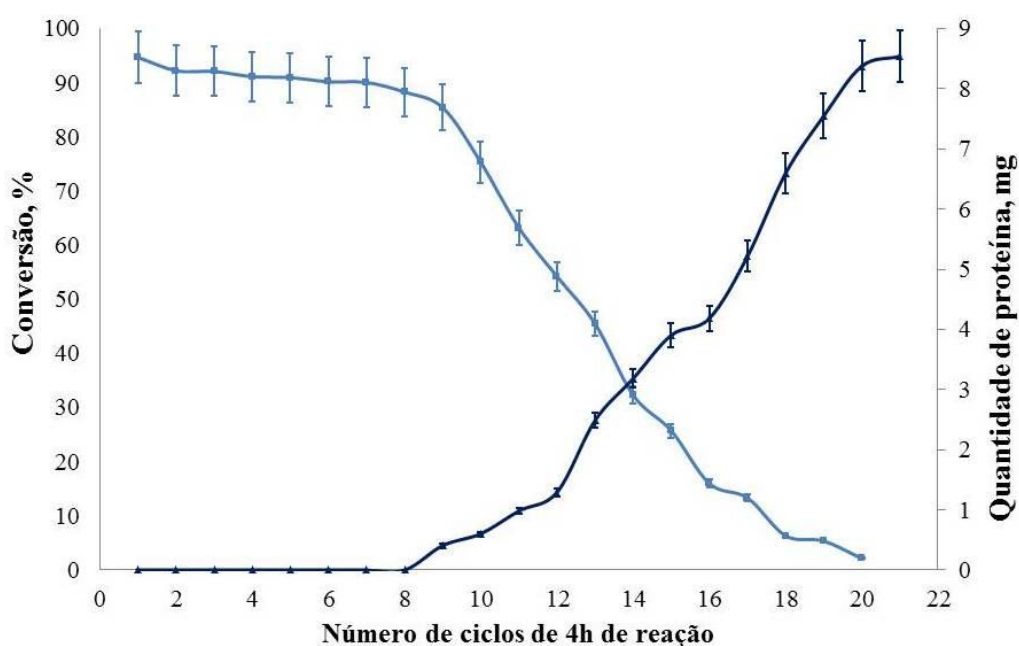


Figura 39: Reciclos possível para a enzima RM IM na reação de formação do MEP e avaliação da quantidade de proteínas lixiviadas para o meio reacional em cada ciclo. Condições: AE:IPG 1:1 (53,6mM), 58,5°C, 225rpm. Quantidade de proteínas doseada pelo método de Bradford (1976).

A figura 39 mostra que foi possível reutilizar a enzima RM IM durante 8 ciclos sucessivos nas condições em batelada testadas, sem que esta apresentasse redução significativa de conversão, fenômeno este, apresentado somente a partir da 9ª reação, onde, se comparada com a primeira reação (95% de conversão), há uma redução em cerca de 10% na formação de produtos (85 % de conversão). Tal fenômeno pode ser explicado por uma possível lixiviação da enzima para o meio reacional, que torna-se significativa a partir da 8ª reação. Tal fenômeno torna a enzima lixiviada mais susceptível às ações deletérias do solvente orgânico, além dos efeitos de temperatura e agitação. No sistema em batelada, a agitação pode ser responsável por danos no suporte das enzimas, tais como ranhuras, rachaduras, ou até mesmo

cisalhamento de toda a estrutura, devido ao atrito entre as partículas do suporte. Tais efeitos podem ser potencializados quando são utilizados reatores com pás agitadoras ou agitação magnética, mas não estão isentos quando se utiliza agitação orbital, como no sistema em questão. Por este motivo, investigamos, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) a morfologia da enzima Lipozyme RM IM (figuras 40-42), antes e após o último reuso.

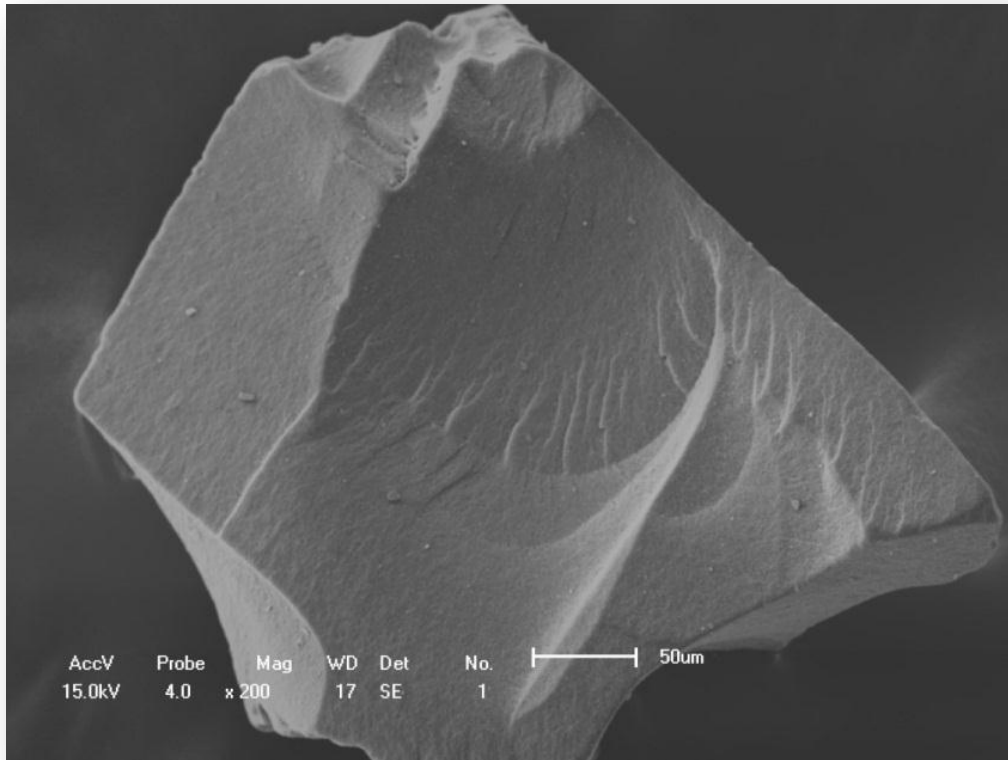


Figura 40: MEV da enzima Lipozyme RM IM antes da reação. Aumento de 200x.

A enzima Lipozyme RM IM apresenta como suporte empregado na imobilização da enzima, uma resina macroporosa de troca aniônica, do tipo fenólica, no qual a enzima é fortemente ligada por adsorção, sem a utilização de agentes de ligação cruzada. O aspecto do produto é granular irregular (figura 40) com tamanho de partícula entre 0,2 e 0,6 mm e densidade entre 350 e 450 kg/m³ (Novo Nordisk, 1992a e 1999).

Ao compararmos as morfologias do suporte antes e ao final das reações (figura 41), observa-se que a agitação sucessiva ocasionou a formação de lascas e ranhuras no suporte, como consequência do intenso atrito gerado.

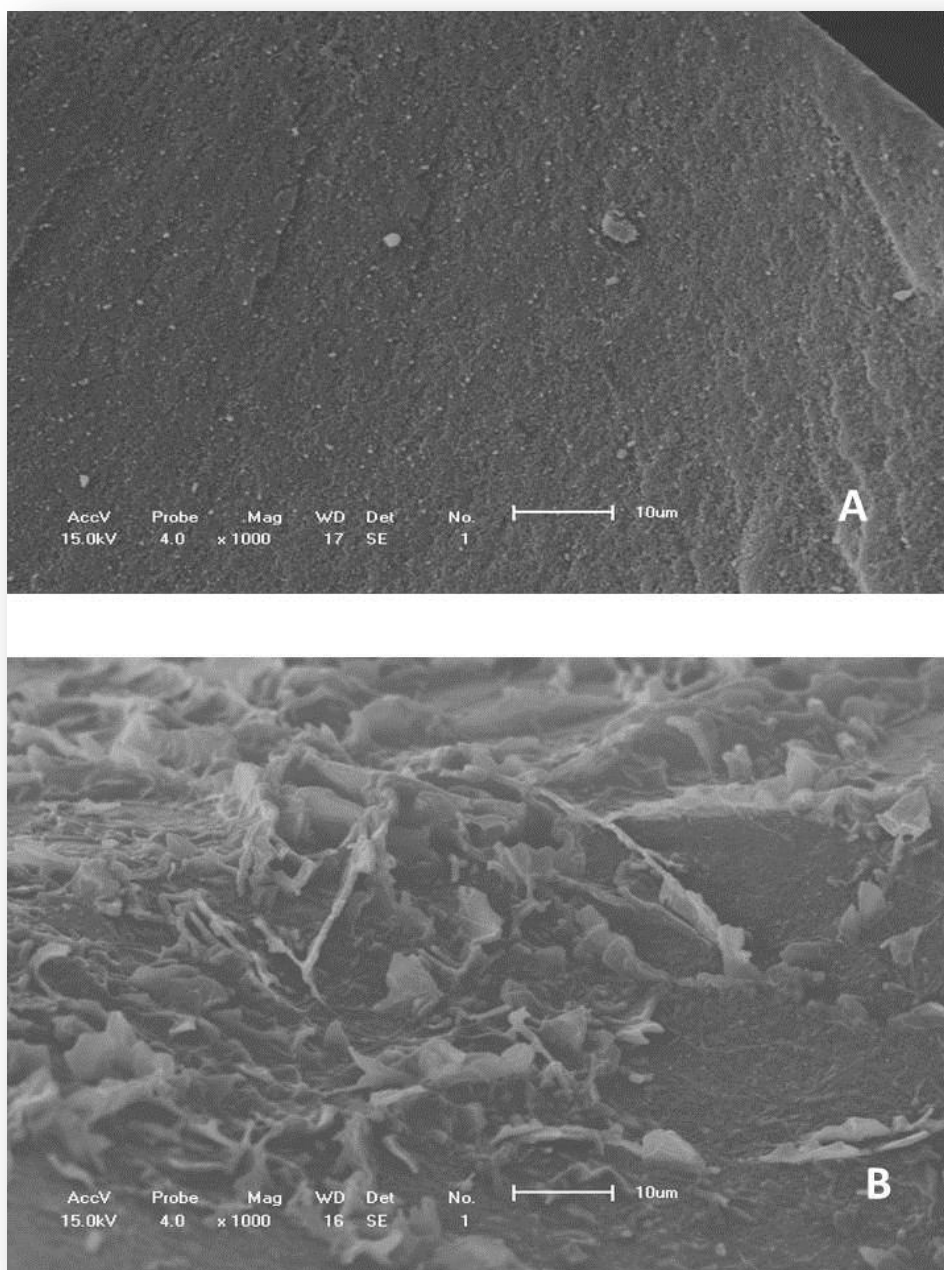


Figura 41: Microscopia eletrônica de varredura de amostras da enzima Lipozyme RM IM. A – lipase RM IM antes das reações; B- lipase RM IM após as reações de reciclo. Aumento de 1000x.

A formação de lascas na superfície do suporte permite o escapamento da enzima adsorvida para o meio reacional, corroborando os dados de quantificação leva ao escapamento. Esta pode ser a possível causa da lixiviação mostrada durante os ciclos.

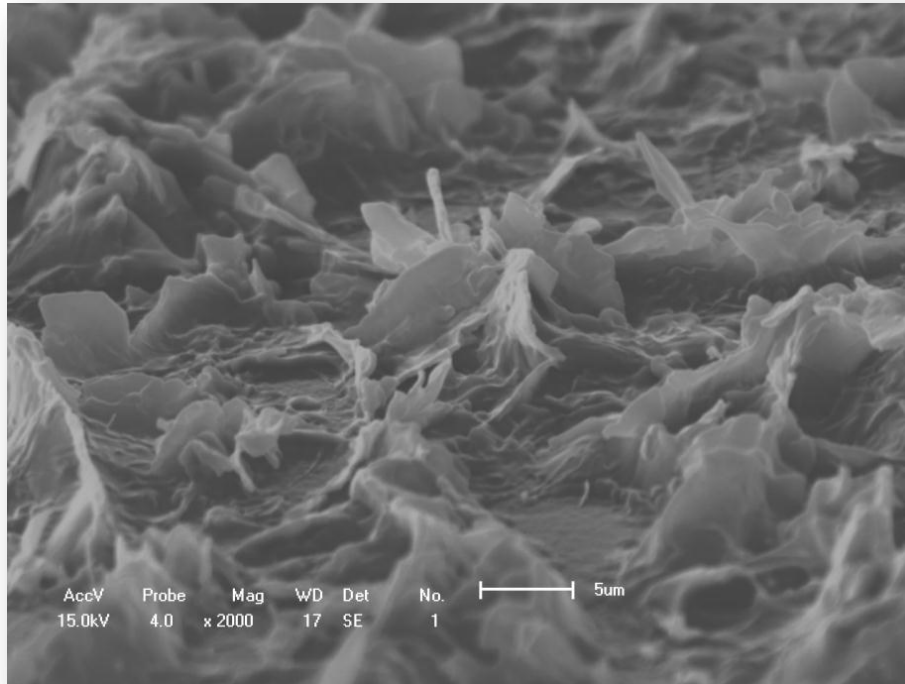


Figura 42: Microscopia eletrônica de Varredura da enzima imobilizada RM IM – aumento de 2000x, evidenciando o efeito de cisalhamento da agitação.

As deformações da superfície do suporte da lipase RM IM podem ser evidenciadas em um aumento de 2000, como mostrado na figura 42.

4.11 - Aumento de Escala e Estudo da Influência de um Reator de Tanque agitado na síntese da MEP

Com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade de esterificação do AE com o IPG, otimizada anteriormente, assim como investigar a influência da agitação na integridade do biocatalisador, referida reação, foi realizada em reator de tanque agitado (CSTR) Easy-Max da Mettler Toledo, com volume de 100mL. Este é composto por reator em jaqueta, para controle de temperatura, assim como pode ser acoplado a sensor de pH (figura 43).

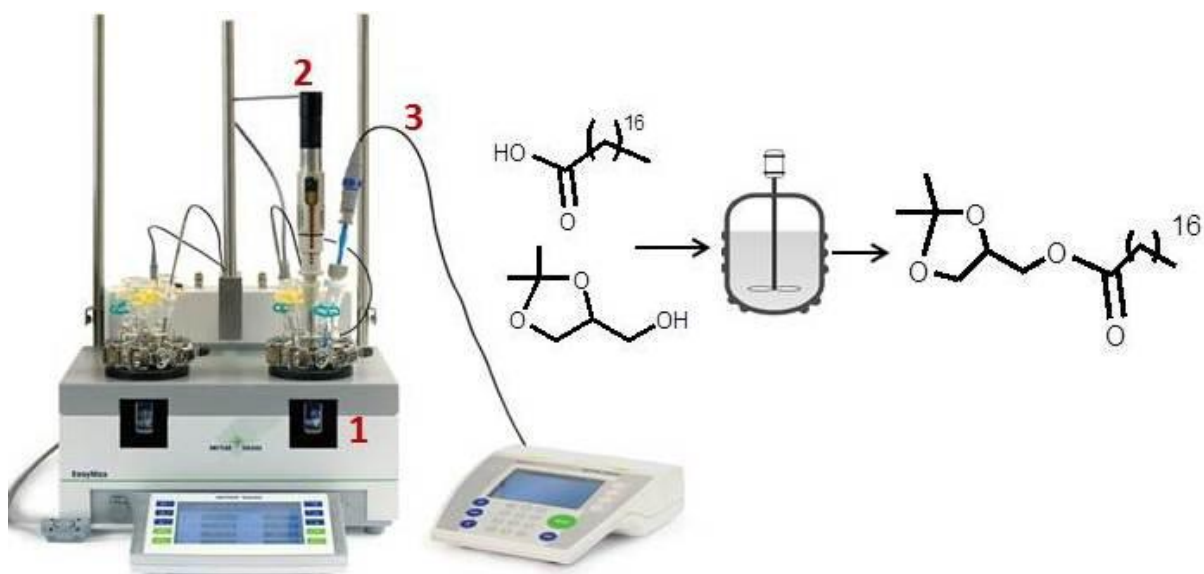


Figura 43: Reator Easy Max, Metter Toledo. 1) reator jaquetado; 2- agitador; 3- sensor de pH.

Para tal, 100mL de uma solução de substratos (AE e IPG - 53,6mM em n-heptano) foi previamente preparada e adicionada no reator, e posteriormente submetida a agitação de 225rpm e aquecimento a 58,5°C. Após a estabilização do sistema, a enzima foi adicionada e as conversões monitoradas de 1 a 6h (figura 44), assim como sua capacidade de ciclos e a lixiviação de proteínas no sistema.

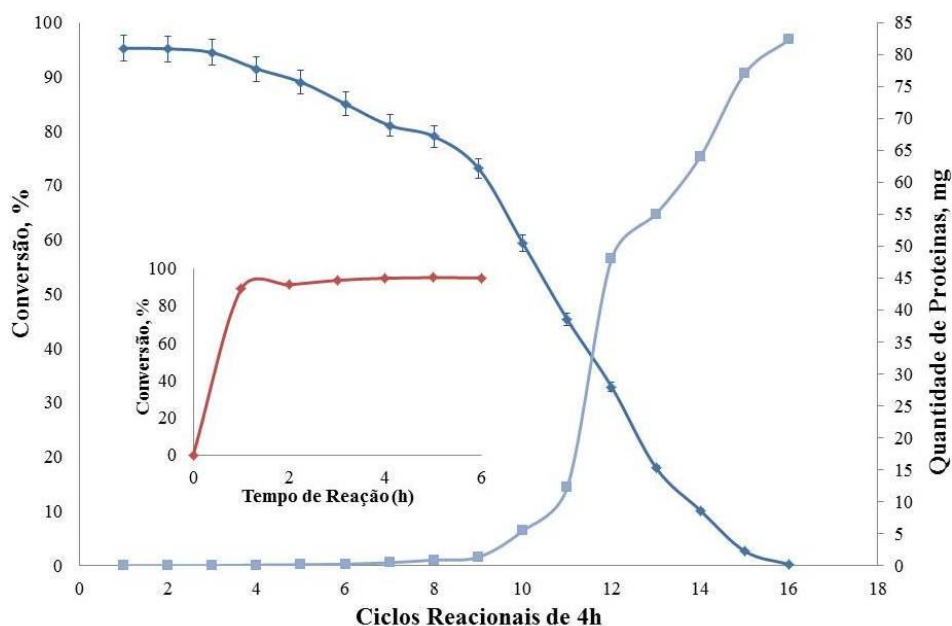


Figura 44: Monitoramento da reação de formação da MEP catalisada pela enzima RM IM em reator Easy-max e avaliação de ciclos e lixiviação de proteínas. para o meio reacional em cada ciclo. Condições: AE:IPG 1:1 (53,6mM), 58,5°C, 225rpm. Quantidade de proteínas doseada pelo método de Bradford (1976).

Como observado, neste tipo de reator, a agitação utilizada não afetou as conversões finais, demonstrando que não houve problemas de transferência de massa ou limitações na dispersão do biocatalisador pelo meio reacional, devido à diferença de agitação utilizada. Entretanto, ao analisar os possíveis ciclos neste novo reator, observa-se que, somente 4 ciclos sucessivos podem ser realizados sem que haja perda significativa de conversões finais. Tal resultado pode ser explicado pelo tipo de agitador empregado, que provavelmente, levou a um maior cisalhamento dos grãos de suporte, favorecendo o escape de proteínas para o meio reacional. A partir do 7º ciclo, a quantidade de enzima lixiviada torna-se significativa a ponto de ser detectada pelo método aplicado. Ao compararmos este sistema, com aquele de agitação orbital, nota-se claramente que o anterior fornece cerca de 8 ciclos possíveis, com manutenção da conversão, confirmando-se, deste modo, a interferência da agitação na integridade do suporte a cada ciclo sucessivo de reações.

De modo geral, a síntese da MEP foi realizada com grande reprodutibilidade, mesmo com um aumento de volume final, e mudança de biorreator, demonstrando, que de fato, esta teve seus parâmetros otimizados.

4.12 - Estudo da Dessorção da Lipase de *Rizhomucor miehei* de seu suporte

Para se avaliar a eficiência de um biorreator, é interessante o cálculo da produtividade final gerada por este sistema. Esta é uma ferramenta importante na construção de novos reatores, pois relaciona a quantidade de produto gerado com o tempo reacional, além da quantidade de biocatalisador utilizado. Portanto, para se fazer este tipo de correlação, é importante conhecer a real quantidade de enzima contida no suporte utilizado na reação.

Trabalhos anteriores, como o de Cabrera et al (2008), demonstram que é possível realizar a dessorção da enzima N435 de seu suporte. Estes experimentos foram realizados com detergentes, como o Triton X-100 em solventes orgânicos, sugerindo que esta enzima seja imobilizada no suporte, principalmente por interações hidrofóbicas. Costa et al (2011) reproduziram a metodologia descrita por Cabrera e colaboradores (2008), atingindo resultados satisfatórios para o estudo somente do suporte.

Segundo a Novo Nordisk (1992), nome antigo da atual Novozymes®, fabricante a lipase Novozym 435, afirma que a mesma é produzida a partir da lipase de *Cândida antarctica* cujo gene responsável por sua produção é expresso em *Aspergillus oryzae*. A lipase produzida

pelo microrganismo hospedeiro é imobilizada em resina macroporosa de troca iônica do tipo acrílica, sob protocolo desconhecido.

Sob a mesma fonte citada anteriormente, encontra-se que a preparação enzimática Lipozyme RM IM produzida a partir da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em uma resina macroporosa de troca aniônica, do tipo fenólica, no qual a enzima é ligada por adsorção, sem a utilização de agentes de ligação cruzada. O aspecto do produto é granular com tamanho de partícula entre 0,2 e 0,6 mm e densidade entre 350 e 450 kg/m³ (Novo Nordisk, 1992a e 1999). Portanto, pelo fato de a enzima em questão também ser imobilizada em um tipo de resina de troca iônica, e a imobilização ser realizada em a ação de formadores de ligação cruzada, acredita-se também, que grande parte das interações entre enzima e suporte sejam proporcionadas por interações hidrofóbicas. Neste item, serão discutidos então, os resultados obtidos nos estudos de dessorção da lipase de *Rhizomucor miehei* de seu suporte, utilizando a metodologia descrita por Cabrera et al (2008) e reproduzida por Costa et al, 2011.

Após a reação de dessorção do suporte, como descrito na seção experimental, a quantidade de proteínas dessorvidas foi analisada pelo método de Lowry, e não pelo método de Bradford, como realizado nos estudos anteriores. Embora o método de Bradford seja mais sensível para a determinação de proteínas, este sofre forte interferência pela presença de detergentes, como o Triton X-100, SDS ou Tween 20. Isto acontece pois grande parte destes apresenta banda larga de absorvância em 650nm, devido a forte reação dos mesmos com o corante Comassie Blue, interferindo intensamente na banda em 595nm, comprimento de onda utilizado neste ensaio, resultando em falso positivo (Zaia, Zaia e Lichtig, 1998). Concentrações de apenas 0,5% de Triton podem causar efeitos batocrômicos (aumento na absorvância) de até 0,59 (Stoscheck, 1990). O método de Lowry pode sofrer influência de alguns detergentes, entretanto, não há relatos na literatura acerca do Triton X-100. Dependendo da concentração de detergentes utilizada, pode haver a formação de precipitados. Geralmente, isto acontece quando há mais de 10% dos mesmos em solução (Copton e Jones, 1985).

Primeiramente, foi estudada a quantidade necessária de Triton X-100 para retirar a referida enzima de seu suporte. Isto foi realizado através da medição da atividade de hidrólise pelo método de p-nitrofenol. Após extrações com soluções de diferentes concentrações de Triton X-100, a atividade do sobrenadante foi medida, calculando-se, por comparação a atividade inicial da enzima, a atividade residual, indicando se toda a enzima foi retirada ou não do suporte figura 45.

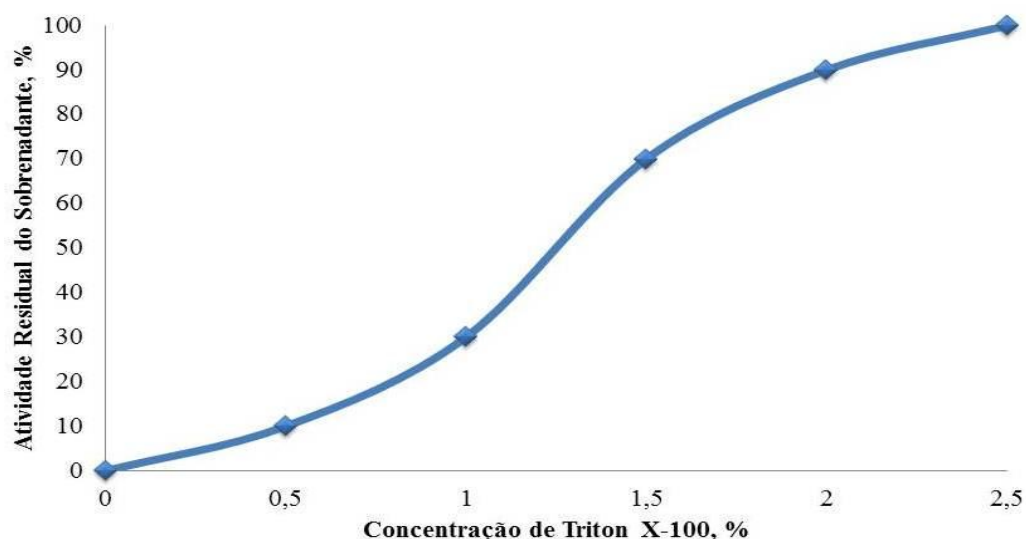


Figura 45: Atividade Residual do sobrenadante de acordo com a concentração de Triton X-100 utilizada na dessorção da lipase RM IM de seu suporte, segundo a metodologia descrita por Cabrera et al, 2008.

Como observado na figura 45, uma solução de 2,5% v/v foi capaz de retirar toda a enzima suportada, de acordo com o ensaio de atividade do sobrenadante. Esta concentração é um pouco maior do que a relatada por Cabrera et al (2008), que utilizou uma solução de 2% v/v de Triton X-100 para a dessorção da enzima Novozym 435. Isto pode ter a ver com o tipo de suporte utilizado, e a intensidade das interações entre este e a enzima.

Seguindo os estudos, novos ensaios com 1g de suporte foram realizados, utilizando-se uma solução a 2,5% v/v de Triton X-100, e a quantidade de proteínas foi medida pelo método de Lowry e pelo método de Bradford (tabela 16).

Tabela 20: resultados da concentração de proteínas obtidas por diferentes métodos.

Método aplicado	Quantidade de proteínas (mg/mL) ¹	Quantidade de proteínas (mg/mL) ²	Quantidade de proteínas (mg/mL) ³	Média	Erro relativo (%)
Bradford	65,22	69,37	54,31	62,96	6,35
Lowry	24,41	24,22	24,14	24,26	0,11

A tabela 20 demonstra que, é discrepante os resultados obtidos pelas metodologias utilizadas. Como citado anteriormente, o método descrito por Bradford apresenta intensa interferência pelo detergente Triton X-100, que neste experimento, esteve em concentração maior do que a descrita em trabalhos anteriores, aumentando a possibilidade de falsos positivos nas análises. Tal fenômeno pode ter ocorrido no ensaio realizado, demonstrando grande diferença no resultado final. Deste modo, optamos por utilizar o resultado obtido pelo método de Lowry, que além apresentar resultados mais consistentes, demonstrou menor erro experimental.

Cabrera et al demonstra em seu trabalho, a quantidade máxima de lipase B de *Cândida antarctica* imobilizada, de acordo com o suporte utilizado, como mostra a tabela 21.

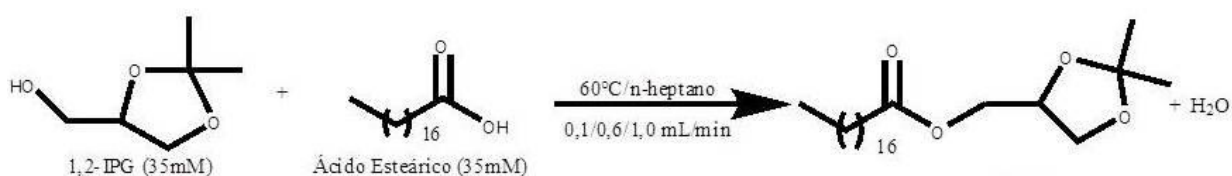
Tabela 21: Quantidade de enzima imobilizada de acordo com o suporte utilizado. Adaptado de Cabrera et al, 2008.

Suporte Utilizado	Quantidade de Proteínas imobilizada (mg/g de suporte)
Resina acrílica (Novozym 435)	30 ± 2
Lewatit	30 ± 2
Octil-Agarose	23 ± 2
Octadecil- Sepabeats	20 ± 1,5
Butyl-agarose	22 ± 2

Como visto, o valor obtido pelo método de Lowry se adequa aos valores descritos na tabela acima, mostrando resultados mais plausíveis. Deste modo, a quantidade de enzima de *Rhizomucor miehei* imobilizada na resina de troca iônica em questão, foi assumida por ser 24,26mg de enzima/mg de suporte. Este valor, portanto, foi utilizado para os cálculos de produtividade dos sistemas estudados.

4.13 - Síntese da MEP em Condições de Fluxo Contínuo

A partir das condições reacionais previamente otimizadas via metodologia de superfície de resposta (MSR), para a síntese da MEP, em condições de batelada, esta etapa do trabalho visou a aplicação e posterior otimização dos parâmetros reacionais em condições de fluxo contínuo. Deste modo, avaliou-se inicialmente, em um reator com coluna de leito fixo de volume total de 0,6mL (figura 46), a reação de esterificação entre IPG e AE catalisadas pela enzima Lipozyme RM IM, que apresentou a melhor atividade na etapa em batelada. A



Reator de Leito Fixo

0.6mL



X-Cube (Thales Nano)

Figura 46: Reator de Leito fixo utilizado na etapa inicial de investigação da reação de formação da MEP catalisada pela lipase RM IM. Condições: AE/IPG 1:1 (35mM) em n-heptano, 60°C .

temperatura inicial foi de 60° C. Diferentes fluxos de bombeamento dos substratos na coluna foram testados (0,2, 0,6 e 1,0 mL/min), gerando diferentes tempos de residência (tabela 18).

Nesta investigação inicial, decidiu-se trabalhar com soluções mais diluídas dos substratos, a fim de se evitar precipitações dos mesmos no reator, ou vazamentos entre as conexões do equipamento. Desta forma, uma concentração inicial de 35mM dos reagentes de partida em n-heptano foi utilizada, oriunda da diluição da solução-estoque de AE e IPG a 75mM utilizada anteriormente. Os percentuais de conversão foram calculados pelo método de Lowry-Tinsley modificado, já descrito anteriormente.

Tabela 22: Investigação inicial da formação da MEP catalisada pela lipase RM IM, em n-heptano a 60°C e razão molar 1:1 (35mM) de AE e IPG.

Q (ml/min)	Tempo de Residência (min)	Conversão (%)
0.2	0.48	65
0.6	1.44	87
1.0	2.4	31

A tabela 22 mostra os tempos de residência do substrato na coluna de leito fixo aplicada, de acordo com o fluxo escolhido. Os resultados preliminares mostram moderadas a boas conversões quando fluxos de 0,2-0,6 mL/min foram utilizados. Estes valores podem ser explicados pelo maior tempo de contato entre enzima e substrato, proporcionando maior conversão em éster. Para se ter uma melhor compreensão sobre acerca dos valores encontrados, assim como otimizar as condições reacionais, foi aplicado um planejamento experimental fatorial fracionário 2^{3-1} . As variáveis independentes analisadas neste caso foram a temperatura (T), o fluxo (Q) e a concentração de substratos (AE/IPG, em razão molar 1:1) (S), variando em dois níveis, com três repetições do ponto central. Cada experimento foi realizado em triplicata.

Em um planejamento fracionário 2^{3-1} , os principais efeitos podem ser calculados e utilizados para indicar quais variáveis devem ser incluídas no estudo seguinte, bem como para definir os novos limites para as mesmas. É importante salientar que o maior nível da variável concentração de substratos (S) foi 100mM, pois esta é a concentração em que o AE ainda permanece solúvel a frio em n-heptano. Os resultados obtidos com o uso do planejamento fracionário para a reação de esterificação nas condições de fluxo contínuo são apresentados na Tabela 19.

Tabela 23: Matriz do planejamento fatorial fracionário experimental 2^{3-1} com valores codificados e reais para a síntese da MEP catalisada pela enzima RM IM em condições de fluxo contínuo.

Entrada	T (°C)	Q (ml/min)	[S] (mM)	Conversão (%)^a
1	-1 (40)	-1 (0.2)	+1(100)	68,2
2	+1 (60)	-1 (0.2)	-1 (35)	61,1
3	-1 (40)	+1 (3)	-1(35)	45,4
4	+1 (60)	+1 (3)	+1(100)	51,2
5	0 (50)	0 (1.6)	0 (67.5)	66,3
6	0 (50)	0 (1.6)	0 (67.5)	64,2
7	0 (50)	0 (1.6)	0 (67.5)	65,1

Os resultados obtidos nos experimentos 3 e 4 (45% e 51% respectivamente), indicam a influência negativa da taxa de fluxo sobre a conversão da reação que é confirmado pelo valor negativo obtido na tabela 24, onde os principais efeitos estimados e seus valores de p são mostrados.

Tabela 24: Efeito estimado dos parâmetros do planejamento 2^{3-1} para a enzima estudada.

Variáveis	Efeito	Valor de p
Média	56,42	<0,0001
Curvatura	17,21	0,0038
Temperatura (T)	-0,65	0,4524
Concentração de Substrato [S]	6,85	0,0103
Fluxo (Q)	-16,25	0,0018

As variáveis Q e S foram as que apresentaram significância no processo devido ao valor de $p < 0,05$ e foram selecionados para serem otimizadas na próxima etapa.

O efeito negativo observado para a variável Q indica que o aumento da conversão pode ser alcançado com a diminuição da vazão. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de que nas reações de menor fluxo há um aumento no tempo de residência dos substratos no equipamento, levando a maior conversão em produtos, já que o tempo de contato entre o biocatalisador e o substrato também é maior neste caso.

A variável S teve um efeito positivo de 6,85. Isso se deve ao fato de que em presença de maiores quantidades de substrato, há um aumento do contato enzima-substrato, levando a uma maior conversão.

O estudo de otimização seguinte consistiu na proposição de um delineamento do composto central rotacional (DCCR). Pelo fato de a variável T não ter apresentado significância no FFD, esta foi mantida constante (60°C) nesta etapa.

A tabela 21 mostra os 11 experimentos resultantes do DCCR, as três variáveis selecionadas e a conversão de cada experimento, que foi realizado em triplicata, gerando 33

experimentos finais. Os oito primeiros tratamentos são suficientes para a determinação do modelo matemático e são referidos como planejamento experimental fatorial completo. Os experimentos 9-11 são as triplicatas dos pontos centrais para a obtenção do erro experimental.

Tabela 25: Planejamento fatorial experimental 2² completo com valores codificados

Experimento	[S] (mM)	Q (ml/min)	Conversão (%) ^a
1	-1 (71.87)	-1 (0.4)	95
2	-1 (71.87)	+1 (0.8)	57
3	+1(95.27)	-1 (0.4)	52
4	+1(95.27)	+1 (0.8)	61
5	-1,41 (67.5)	0 (0.6)	76
6	+1,41 (100)	0 (0.6)	59
7	0 (83.75)	-1,41 (0.318)	60
8	0 (83.75)	+1,41 (0.882)	61
9	0 (83.75)	0 (0.6)	80
10	0 (83.75)	0 (0.6)	83
11	0 (83.75)	0 (0.6)	82

^a investigada pelo método de Lowry-Tinsley modificado

De acordo com a análise da tabela 25, observou-se que a maior conversão foi obtida no experimento 1, confirmando o efeito negativo do fluxo no processo. É importante notar que para obter melhores conversões, mais uma combinação de fatores deve ser feito, neste caso, as taxas de baixo fluxo e baixa concentração. A tabela 26 mostra os efeitos estimados para o DCCR. Todas as variáveis e seus efeitos quadráticos e de interação foram significativos no processo. Mais uma vez, observa-se o efeito negativo do variável fluxo na faixa estudada, que pode ser justificado pelo maior tempo de permanência do substrato em contato com a lipase.

Tabela 26 : Efeitos estimados dos parâmetros utilizados no DCCR 22 estudado.

Variáveis	Efeito	Valor de P
Media	81,63	0,0001
Fluxo	-15,78	0,0044
Fluxo ²	-12,77	0,0096
Concentração de substrato	-6,8318	0,0232
Concentração de substrato ²	-19,78	0,0040
Fluxo x Concentração de substrato	23,30	0,0041

Estatisticamente significativo a um nível de confiança de 95%.

Os efeitos negativos das variáveis estudadas são facilmente observados na superfície de resposta (Figura 47). Quando o fluxo diminui, aumenta-se a conversão em éster. Isso também acontece com a concentração de substrato na faixa estudada. Há uma faixa ideal de trabalho, com fluxos entre 0,3 a 0,4 mL/min e concentrações de substrato entre 65,9 a 71,9mM, para que conversões de 95% em produtos possam ser atingidos, como descrito no experimento 1 da tabela 25.

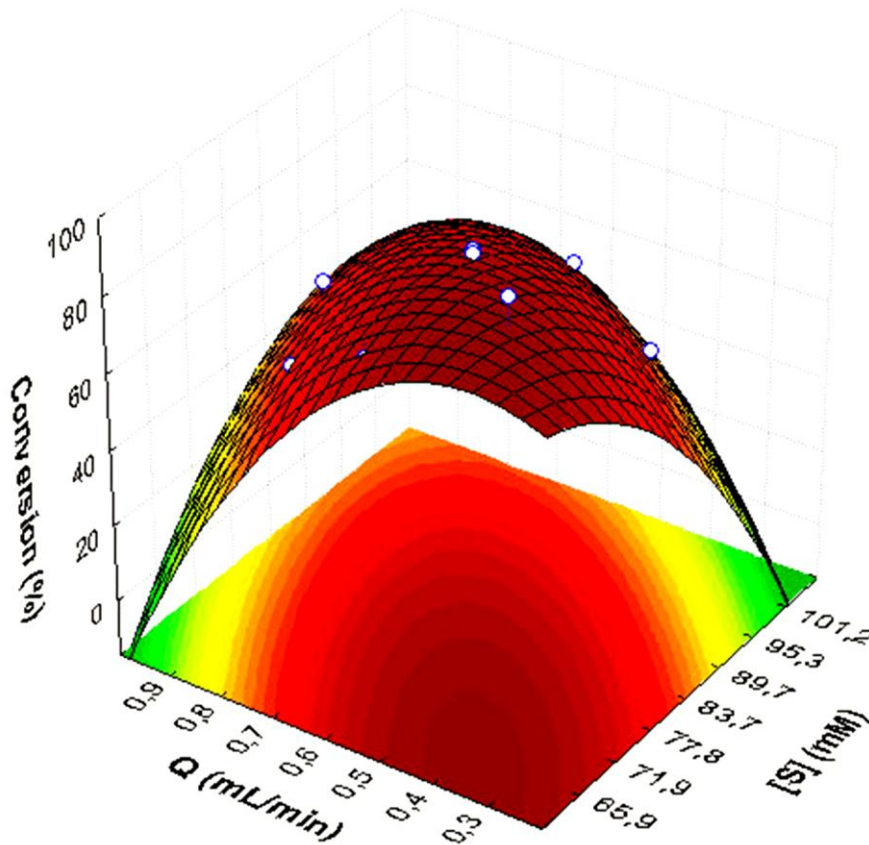


Figura 47: Superfície de resposta para a reação de formação da MEP catalisada pela lipase RM IM em condições de fluxo contínuo, em função do fluxo e concentração do substrato

A Equação 2 representa o modelo matemático de conversão para o MEP, em função de variáveis obtidas a partir dos dados experimentais:

$$\text{Conversão MEP (\%)} (RM IM) (\text{Fluxo}) = 81,63 - 7,89Q - 6,38Q^2 - 3,41S - 9,89S^2 + 11,65Q \times S$$

(2)

onde Q e S são os valores não codificados do fluxo e concentração de substrato, respectivamente. A viabilidade estatística dos modelos deste estudo foi também realizada pelo teste F de Fisher para análise de variância (Tabela 23).

Tabela 27: Análise de variância para a validação dos modelos matemáticos (ANOVA)*

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado	Valor de P
Regressão	1761,51	5	352,30	11,03	5,05	$9,8 \times 10^{-3}$
Resíduo	159,66	5	31,93			
Falta de ajuste	155,15	3				
Erro puro	4,50	2				
TOTAL	1921,16	10				

*Nível de Confiança 95%.

Quanto à análise de variância (ANOVA), a tabela 27 demonstra a validade do modelo pelo teste F e o resíduo que mostra a magnitude do erro experimental. O F calculado (11,03) foi maior do que o F tabelado, mostrando a validade do modelo experimental. A magnitude do modelo pode ser verificada através da do coeficiente determinação (R^2). Para este experimento, o R^2 apresentou valor de 0,83, o que implica que o coeficiente de variação amostral de 83% para a produção do éster de interesse é atribuído às variáveis independentes e podem ser explicadas com precisão pelo modelo proposto.

A fim de se realizar uma aplicação das otimizações reacionais propostas, a melhor condição para a esterificação do IPG com o AE (60°C/0.4mL/min e 71.87mM de substratos a 1:1) foram reproduzidas com diferentes fontes de ácidos graxos, com a mesma lipase (RM IM). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 28.

Tabela 28: Esterificação de diversos ácidos graxos com IPG em fluxo contínuo.

Reações	Ácido graxo	Conversão(%) ^a
1	Palmítico	97
2	Oléico	40
3	Mirístico	32
4	Láurico	41

^aMedido pelo método de Lowry-Tinsley modificado

Os resultados mostraram que, aparentemente, os ácidos graxos saturados de cadeia longa são melhores substratos para a lipase RM IM do que ácidos graxos de cadeia curta, o que corrobora com os bons resultados obtidos com o AE. As condições de reação não foram otimizadas para esses ácidos graxos, nem estudos de seletividade foram realizados para se confirmar tais resultados, já que o objetivo principal deste trabalho foi o uso de AE.

Analisou-se também a aplicação de outras fontes de lipases na reação de esterificação entre o AE e o IPG. Para esta finalidade, foram utilizados reatores de leito fixo preenchidos com as lipases imobilizadas de *Cândida antarctica* Cal. A e Cal. C, nas melhores condições obtidas. Os resultados são apresentados na Tabela 29.

Tabela 29: Efeitos de outras lipases comerciais na esterificação do AE e IPG em fluxo contínuo.

Reação	Lipase	Conversão (%)
1	Cal. A	81
2	Cal. C	91

Como resultados, ambas as lipases apresentaram ótimos percentuais de conversão nas condições estudadas. A lipase Cal C, por ter apresentado um resultado semelhante ao da lipase RM IM, pode ser uma possível substituta desta última, em uma aplicação industrial. Trata-se de uma lipase altamente termoestável, conhecida por ser do tipo 2-específica (Sandstrom et al, 2011) em hidrólise de triacilgliceróis, e que apresenta alta enantiosseletividade para aminoácidos. De María et al, em 2005, discutiram em uma revisão, sobre as propriedades biocatalíticas da lipase A de *Cândida antarctica*, exaltando sua grande

Regiosseletividade e atividade catalítica em reações de resolução cinética e esterificação, sobretudo em álcoois terciários, secundários, e aqueles restritos estericamente, como é o caso do IPG. Já em 2012, Panpinate e seus colaboradores obtiveram ótimos resultados e grande seletividade com esta mesma enzima, em reações de esterificação de fitoesteróis. Neste mesmo ano, Ondul publicou um trabalho com seus colaboradores onde foi abordada a imobilização da lipase Cal A, além daquela oriunda de *Thermomyces lanuginosus* em fibras de Polietilenoimina, utilizando o método da adsorção, tendo-se o glutaraldeído como agente de ligação cruzada, levando ao aumento de atividade hidrolítica, principalmente para a enzima proveniente de *Cândida antarctica*. Sobre a lipase Cal C, são escassos os dados presentes na literatura, o que gera a possibilidade de estudos futuros acerca deste biocatalisador.

4.14 – Adaptação das condições reacionais obtidas para outro equipamento de Leito Fixo

Para se avaliar a eficiência de um determinado tipo de biorreator, seja este em sistema de batelada, ou contínuo, faz-se necessário calcular a produtividade gerada em cada um destes. Esta constante é capaz de relacionar a quantidade de produto obtido na reação, com a quantidade de enzima utilizada, além do tempo reacional. Deste modo, conhecer a real concentração de enzima contida na massa de suporte aplicada é de extrema importância. Os experimentos anteriormente realizados de dessorção da enzima RM IM de seu suporte de resina de troca iônica nos permitiram quantificar a verdadeira concentração de proteína utilizada nas reações de esterificação do AE e o IPG em condições de batelada, de acordo com a massa de suporte pesada em casa caso. Entretanto, nos experimentos realizados em Reator de Leito fixo até aqui, não se sabe ao certo a massa de suporte contida nos micro reatores, devido ao fato destes serem adquiridos industrialmente prontos (figura 48).



Figura 48: Exemplo de Coluna de leito fixo do Reator X-Cube (Thales Nano).
Fonte: <http://www.thalesnano.com/products/catcart> acesso: Março 2013.

Por este motivo, decidimos por adaptar as condições reacionais em fluxo contínuo otimizadas até aqui, para a formação da MEP (60°C/fluxo de 0,4mL/min/ 87,5 mM de AE 1:1 com IPG) em um reator de fluxo contínuo (Figura 49), equipado com coluna de leito fixo cilíndrica em vidro pirex, de altura ajustável, a qual nos permite adicionar quantidades desejadas de biocatalisador, de acordo com o volume deste micro reator.

Neste experimento, foi utilizada uma coluna cilíndrica de leito fixo com volume final de 2,41 mL ($0,3124\text{cm}^2$ de área da base e 8cm de altura), o qual foi totalmente preenchido com a enzima Lipozyme RM IM (total de 421,2mg). Fluxos variando de 0,05 a 3,0 mL/min foram testados inicialmente, resultando em diferentes tempos de residência (tabela 30) dos substratos na coluna.



Figura 49: Equipamento para reação em fluxo contínuo (Asia – Syrris); (A) bomba peristáltica de vazão; (B) aquecedor com termostato; (C) coluna cilíndrica de leito fixo recheada com biocatalisador; (D) substratos; (E) saída do produto reacional.

Tabela 30: Conversões em monoestearato de IPG demonstradas pela Lipozyme RM IM em condições de fluxo contínuo de acordo com o tempo de residência dos substratos. Condições: 60°C, AE e IPG 1:1 (87,5mM), coluna de leito fixo de 2,41mL e 420mg de lipase.

Q (mL/min)	Tempo de Residência (min)	Conversão (%)
0,05	48	94
0,1	24	94
0,2	12	90
0,5	2,4	86
1,0	1,6	72
2,0	1,2	50
3,0	0,8	26

A tabela 30 demonstra que, nos maiores tempos de residência aplicados, maiores foram as conversões apresentadas. Este resultado era esperado, baseando-se nos resultados obtidos no outro reator de fluxo contínuo, já que há maiores tempos de contato entre biocatalisador e substratos nos menores fluxos testados. Neste caso, os fluxos de 0,05 ml/min e 1,0 ml/min, conduziram a resultados semelhantes de conversão e produtividade, demonstrando, portanto, que há um limite de tempo ótimo de contato entre substratos e enzima para que haja as maiores conversões possíveis.

Visando encontrar o melhor fluxo reacional, e aumentar a concentração de substratos no sistema, como tentativa de melhoria da produtividade, a próxima etapa de experimentos consistiu na análise da capacidade de esterificação da enzima RM IM em soluções de AE e IPG (1:1 em n-heptano) variando de 0,1 a 2,5 mol/L (tabela 31). Neste processo, maiores tempos de contato entre o material de partida e o biocatalisador são requeridos, já que maiores quantidades de substratos será bombeada. Por este motivo, os fluxos de 0,05 e 0,1mL/min foram selecionados.

Tabela 31: Aumento de concentração de substratos para a síntese da MEP em condições de fluxo contínuo. Condições: 60°C/AE e IPG 1:1 em n-heptano, reator de volume final de 2,41mL, 420mg de RM IM.

Concentração de Substratos (mol/L)	Tempo de Residência (min)/Conversão (%)	
	48	24
0,1	92	95
0,2	92	94
0,3	90	94
0,5	90	92
0,7	90	92
1,0	88	91
1,1	88	91
1,2	87	90
1,3	84	90
1,4	82	90
1,5	80	90
1,7	72	89
2,0	65	90

Como demonstrado na tabela 31, o sistema sob fluxo de 0,1mL/min foi capaz de manter altas conversões até 2 M, levando a uma produtividade de 518,24 g.h⁻¹.g de enzima imobilizada⁻¹, enquanto que, quando o tempo de residência mais longo foi aplicado (48 min, fluxo de 0,05mL/min), as conversões sofreram expressivo decréscimo a partir de 1,2 M de substratos (figura 50). A explicação para esta tolerância em meios concentrados pode ser relacionado com a quantidade de enzima utilizada no leito fixo (450mg de suporte RM IM), o qual é muito maior do que nas condições de batelada (1mg), podendo gerar caminhos preferenciais, não sendo aproveitado todo o potencial catalítico da lipase. Além disto, como é extremamente lento o fluxo aplicado, gera-se intenso contato com a enzima, fazendo com que esta possa ter sua atividade catalítica inibida pela alta concentração de substratos.

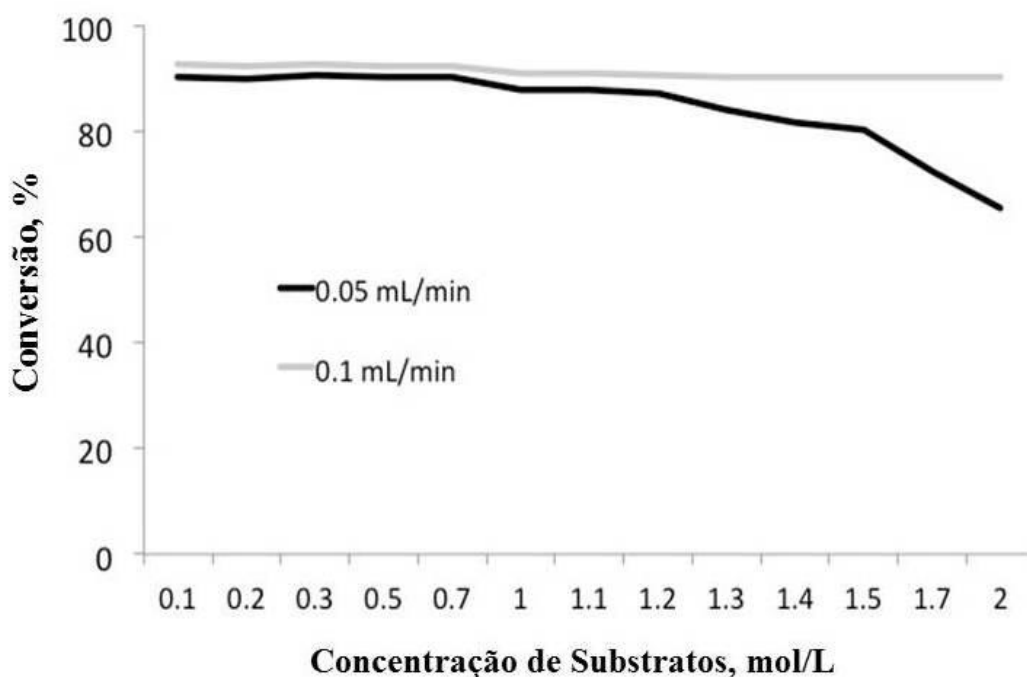


Figura 50: Decréscimo das conversões demonstradas pela lipase RM na formação da MEP de acordo com o fluxo aplicado.

Portanto, o fluxo de 0,1mL/min, assim como a concentração molar de 2,0mol/L de substratos (razão molar 1:1) foram as melhores condições encontradas para a síntese do monoestearato de IPG e serão exploradas no próximo capítulo deste trabalho.

Na concentração de 2,5M, houve extremo decréscimo de percentuais de conversão, devido a baixa solubilidade do ácido em questão, em n-heptano, gerando precipitação do mesmo na

coluna e nas bombas, mesmo sendo um sistema sob aquecimento, refletindo os baixos resultados encontrados.

Com o objetivo de entender o efeito negativo do menor fluxo testado na reação de formação do monoestearato de IPG, a esterificação a 0,05mL/min foi analisada através de uma sonda de infravermelho (figura 51), acoplada a saída do reator de leito fixo. A sonda foi inicialmente calibrada com soluções de cada substrato separadamente em n-heptano, assim como somente com n-heptano, de modo a ajustar o equipamento a detectar as frequências de vibração das deformações axiais e angulares características de ácido carboxílico, álcool, água e éster, além de retirar a interferência do n-heptano. Deste modo, a cada leitura realizada pela sonda, as frequências de vibração detectadas foram quantificadas e transformadas em gráfico, relacionando as mesmas com a conversão em éster gerada pelo sistema.

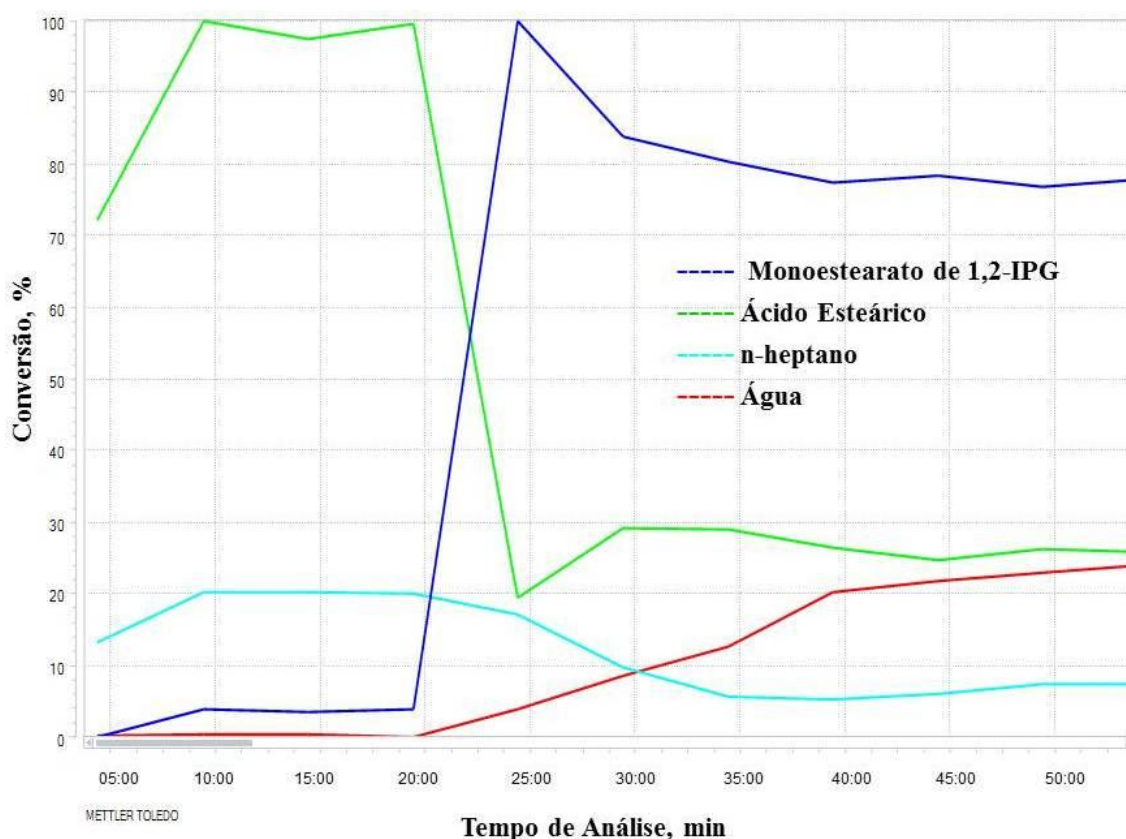


Figura 51: Análise da reação de formação da MEP em condições de fluxo contínuo, em tempo de residência de 48 min (0,05mL/min).

A análise por IV da figura 51 mostra que a reação de esterificação atinge 50% de conversão em torno de 17 minutos. A partir daí, a concentração máxima de éster é detectada em 25 minutos. Por este motivo, maiores conversões são encontradas e mantidas em tempos de residência de 24 minutos. As alíquotas retiradas neste tempo encontram-se no momento

máximo de esterificação. Após este tempo, há um aumento crítico na formação de moléculas de água, como mostra a figura 50. Na reação a 0,05mL/min, após 24 minutos, ainda há contato da enzima com substrato, o que, aliado a grande quantidade de água gerada no meio, começa a deslocar a esterificação para o sentido inverso, ou seja, a hidrólise. Este efeito é mais evidente em altas concentrações de substrato, já que maiores quantidades de água são geradas como produtos da reação. A grande quantidade de ácido presente no meio reacional, pode também causar inibição da enzima, como já dito anteriormente. Neste experimento, conclui-se que o fluxo de 0,1mL/min oferece o tempo de contato ideal entre enzima e substratos, e portanto, foi o escolhido para as próximas etapas. O perfil cromatográfico desta reação foi analisado, a fim de se comparar o resultado obtido pelo método de Lowry-Tinsley, e encontra-se no Apêndice A deste trabalho.

4.15- Reciclos da lipase RM IM em condições de Fluxo Contínuo

A enzima RM IM foi avaliada quanto a sua capacidade de reutilização em condições de fluxo contínuo, quando em tempo de residência de 24 minutos. Assim como na etapa em batelada, a cada ciclo reacional de 24 min, a enzima foi lavada, filtrada e ressubmetida a novas reações. Além das conversões analisadas, as alíquotas recolhidas foram investigadas quanto à quantidade de proteínas presentes (figura 52).

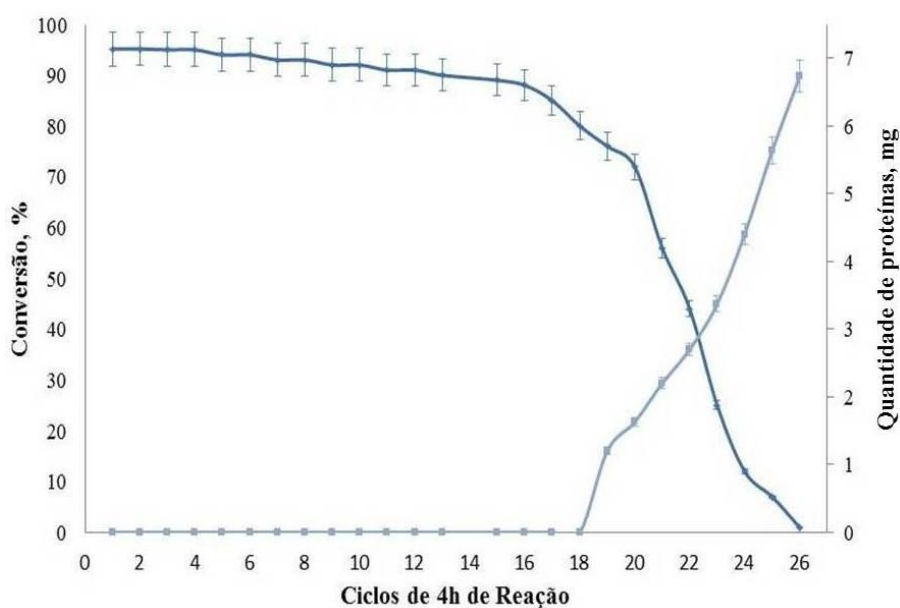


Figura 52: Reciclos possíveis e quantidade de proteínas presente no sobrenadante na reação de formação de MEP em altas concentrações de substratos sob condições de fluxo contínuo. AE:IPG 1:1 (2,5M), 60°C e fluxo de 0,1 mL/min.

A figura 52 mostrou que o processo realizado em fluxo contínuo forneceu cerca de 16 ciclos de reação sem perda significativa de conversões em produto. Ao compararmos os resultados obtidos aqui, com o processo em batelada (figura 39), onde apenas 8 ciclos foram gerados, podemos atribuir o maior reaproveitamento da enzima ao fato de não haver agitação no meio reacional, gerando menos atrito entre os grãos de suporte, evitando-se, desta maneira, a formação de lascas ou espaços que permitam o escape de proteínas para as alíquotas. Entretanto, por se tratar de um processo em leito fixo, o suporte, com o passar dos ciclos reacionais, sofre a ação da lixiviação causada pelo fluxo de bombeamento da solução de substratos, causando desgaste em sua superfície, e desta maneira, pode também causar rompimento de sua estrutura e permitir a perda da enzima em seu interior, o que se tornou evidente a partir do 19º ciclo de reação, onde a quantidade de proteína nas alíquotas recolhidas atingiu concentrações detectáveis pelo método de Bradford.

Até aqui, o processo em fluxo contínuo foi aquele onde maior produtividade reacional foi atingida, onde em 24 minutos, obteve-se um valor de $10,05 \text{ g.h}^{-1}.\text{g de suporte}^{-1}$. Embora maiores quantidades de enzima tenham sido aplicadas, menor foi o tempo reacional necessário para altas conversões serem atingidas, além de maiores reciclos serem permitidos por este sistema.

4.16 - Aplicação de Lipases comerciais no tratamento de um resíduo de ácidos graxos

Monoacilgliceróis podem também ser obtidos através da esterificação de outras fontes de ácidos graxos, como por exemplo, aqueles oriundos de resíduos industriais.

A fim de agregar valor a uma amostra de resíduo de ácidos graxos de palma oriunda indústria do petróleo, decidimos, nesta etapa, realizar um estudo comparativo da reação de esterificação catalisada pela lipase RM IM deste produto com o IPG, em condições de batelada e de fluxo contínuo, utilizando a metodologia de superfície de resposta (RSM) para otimização das condições reacionais, objetivando a utilização destes ácidos graxos como matéria-prima para a produção de monoacilgliceróis de alto valor agregado. O resíduo industrial foi gentilmente cedido pela empresa Agropalma[®], localizada em Belém – PA. Este estudo, foi realizado no mesmo período do que aquele com o AE como reagente de partida. Desta forma, primeiramente foi-se otimizado as principais condições reacionais, e depois, as mesmas foram adaptadas para outro equipamento, onde a quantidade de enzima pôde, de fato, ser quantificada.

Primeiramente, através da metodologia já descrita anteriormente, o resíduo de ácidos graxos (RAG) foi submetido a análise por CG-MS, a fim de se estabelecer a composição graxa (figura 53).

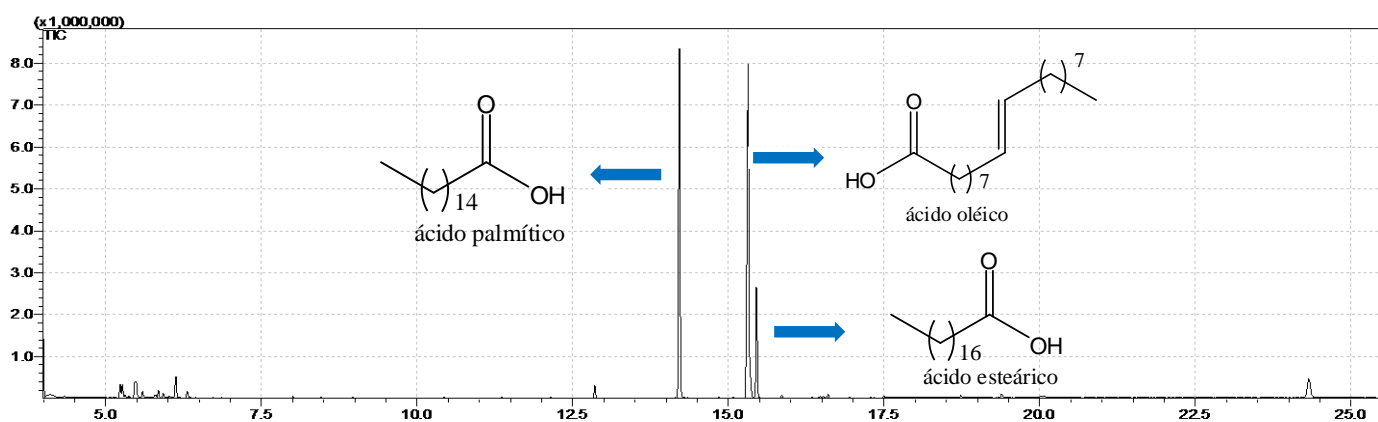


Figura 53: Análise por CG-MS do resíduo de ácidos graxos de palma oriundo do refino de petróleo (RAG).

Figura 53 revela a composição definida na amostra de 44% de ácido palmítico, 42% de ácido oléico e 14% de AE, como constituintes majoritários do (RAG). Com o objetivo de encontrar o melhor biocatalisador para a formação de monoacilgliceróis provenientes do RAG (MRAG), as lipases RMIM e TL IM foram selecionadas, pois, além de serem reconhecidas na literatura por ter especificidade relativa contra um grande número de substratos e apresentar atividade de esterificação notável (Fernandez-Lafuente, 2010; Fernandez-Lafuente & Rodrigues, 2010), estes biocatalisadores apresentaram resultados satisfatórios nas etapas anteriores.

Tendo-se em vista os excelentes resultados de conversão atingidos pela otimização via planejamento experimental da reação de esterificação entre o AE e o IPG com a lipase RMIM, e a composição do RAG ser de ácidos graxos de cadeia longa, demonstrado pelos experimentos anteriores, decidimos aperfeiçoar esta reação também através de um planejamento experimental fracionário, composto por quatro variáveis, variando-se em dois níveis. Deste modo, a necessidade de uma maior quantidade de experimentos foi reduzida sem comprometer os resultados. Novamente, a temperatura (T), quantidade de enzima (E), a concentração de substrato (S) e agitação (Ag) foram considerados como variáveis críticas (independentes) do processo e, portanto, foram avaliadas no planejamento. O tempo de reação foi também fixado em 4 horas na etapa em batelada, visto que este foi o tempo necessário para se atingir os rendimentos máximos nos experimentos anteriores, envolvendo somente o AE. Para o delineamento composto central (DCC) 2^{4-1} de cada enzima foram

aplicados pontos centrais para calcular o erro experimental. Estes, assim como todos os outros experimentos, foram realizados em triplicata.

As reações em batelada foram realizadas utilizando-se a mesma metodologia para as reações em batelada anteriores, utilizando uma solução-estoque contendo IPG e RAG dissolvidos em n-heptano à razão de 1:1 (100mM). As concentrações menores requeridas nos experimentos foram obtidas através de diluição seriada da solução inicial. Os percentuais de conversão foram também verificados pelo método de Lowry-Tinsley modificado, e os melhores resultados, confirmados por CG-EM, como descrito no item 3.2 da seção experimental.

Os resultados do planejamento experimental para ambas as lipases avaliadas, em condições de batelada, são apresentados na Tabela 32. Os primeiros 16 experimentos são suficientes para a determinação do modelo matemático e as experiências de entradas, de 17 a 19 contêm a triplicata do ponto central.

Tabela 32: Resultados do CCD para a reação de esterificação entre o IPG e o RAG, catalisada pelas lipases RM IM e TL IM, em condições de batelada. IPG e RAG 1:1 (100mM), 60°C, 250 rpm de agitação, 1% de catalisador (p/v).

Entrada	T (°C)	[E] (%)*	[S] (mM)	Ag (rpm)	Conversão (%)	
					RMIM	TLIM
1	-1 (40)	-1 (0.1)	-1 (50)	-1 (50)	58	60
2	1 (60)	-1 (0.1)	-1 (50)	-1 (50)	62	58
3	-1 (40)	1 (1)	-1 (50)	-1 (50)	75	69
4	+1 (60)	1 (1)	-1 (50)	-1 (50)	78	70
5	-1 (40)	-1 (0.1)	+1 (100)	-1 (50)	82	77
6	+1 (60)	-1 (0.1)	+1 (100)	-1 (50)	87	87
7	-1 (40)	+1 (1)	+1 (100)	-1 (50)	82	85
8	+1 (60)	+1 (1)	+1 (100)	-1 (50)	94	95
9	-1 (40)	-1 (0.1)	-1 (50)	+1 (250)	56	52
10	+1 (60)	-1 (0.1)	-1 (50)	+1 (250)	54	54
11	-1 (40)	+1 (1)	-1 (50)	+1 (250)	62	63

12	+1 (60)	+1 (1)	-1 (50)	+1 (250)	67	71
13	-1 (40)	-1 (0.1)	+1 (100)	+1 (250)	80	75
14	+1 (60)	-1 (0.1)	+1 (100)	+1 (250)	90	89
15	-1 (40)	+1 (1)	+1 (100)	+1 (250)	78	81
16	+1(60)	+1 (1)	+1 (100)	+1 (250)	96	93
17	0 (50)	0 (0.55)	0 (75)	0 (150)	72	75
18	0 (50)	0 (0.55)	0 (75)	0 (150)	72	74
19	0 (50)	0 (0.55)	0 (75)	0 (150)	72	75

Podemos observar na tabela 32, que ambas as enzimas foram capazes de catalisar a esterificação do IPG e o RAG, como nos experimentos 8 e 16. Neste estágio, houve uma pequena influência da agitação para ambas as lipases, uma vez que pequenas variações nos percentuais de conversão foram encontradas entre as reações efetuadas sob a mesma a temperatura. Este fenômeno pode ser mais facilmente compreendido através da análise dos efeitos estimados (Tabela 33), que mostra que a agitação teve o menor efeito entre as variáveis estudadas (-2,17 e -3,08 para RMIM e TL IM, respectivamente).

Tabela 33: Efeitos estimados dos parâmetros estudados no CCD.

Variável	Efeito		Valor de <i>p</i>	
	RMIM	TLIM	RMIM	TLIM
Média	75.1584	74.2894	<0.0001*	<0.0001*
Temperatura (T)	3.4956	7.0137	0.0008*	0.0037*
Quantidade de enzima (E)	3.9081	9.2487	0.0006*	0.0021*
Concentração de Substrato (S)	11.1868	23.0262	<0.0001*	0.0003*
Agitação (Ag)	-2.1756	-3.0887	0.0022*	0.0187*
T x E	1.2943	0.6862	0.0062*	0.2508
T x S	2.1781	4.3237	0.0022*	0.0097*
T x St	0.5231	2.2487	0.0364*	0.0345*

E x S	-2.4843	-2.9362	0.0017*	0.0206*
E x St	-1.0693	-0.0412	0.0090*	0.9321
S x St	1.9493	1.3212	0.0027*	0.0912

* Estatisticamente significante a um nível de confiança de 95%.

Outro efeito importante na reação foi a quantidade de enzima utilizada, uma vez que as reações com maiores quantidades de biocatalisador conduziram a melhorias significativas nas conversões (experimentos 10 e 12 da tabela 33).

Constatou-se também que todos os efeitos estimados para as variáveis isoladas para ambas as enzimas foram estatisticamente significativos, como mostrado pelos valores de *p* (Tabela 29). As variáveis apresentaram efeitos semelhantes para ambas as enzimas em relação à sua grandeza e influências.

A concentração de substrato foi a que demonstrou o efeito mais positivo entre as variáveis estudadas (11,1868 para RM IM e 23,0262 para TL IM), tendo uma grande influência sobre os percentuais de conversão.

Como foi observado um melhor desempenho global da lipase RM IM em condições de batelada, do mesmo modo que nas otimizações anteriormente realizadas com o AE, decidimos aplicar este biocatalisador na próxima etapa, que consistiu em avaliar em condições de fluxo contínuo, as condições ótimas para a esterificação do RAG com o IPG, além de identificar as variáveis de importância significativa no processo. Para isto, propusemos também um planejamento fatorial completo 2^2 com duas variáveis independentes: fluxo (Q) e concentração de substrato (S), variando em dois níveis e três repetições do ponto central, como realizado anteriormente com as reações envolvendo o AE. A temperatura utilizada para estas reações foi a mesma utilizada na melhor condição obtida nas reações em batelada: 60°C (experimento 16, tabela 31). Para se ajustar a um modelo de segunda ordem, pontos extras (pontos axiais) com a mesma distância a partir do ponto central foram adicionadas à matriz deste experimento. Os resultados apresentados por esta matriz experimental são apresentados na tabela 34:

Tabela 34: Resultados do planejamento fatorial completo 2² para a formação do MRAG catalisada pela lipase RM IM sob condições de fluxo contínuo.

Entrada	S (mM)	Q (ml/min)	Conversão (%)
1	-1 (71.9)	-1 (0.4)	56
2	-1 (71.9)	+1 (0.8)	26
3	+1(95.3)	-1 (0.4)	53
4	+1(95.3)	+1 (0.8)	42
5	-1.41 (67.5)	0 (0.6)	73
6	+1.41 (100)	0 (0.6)	20
7	0 (83.7)	-1.41 (0.3)	28
8	0 (83.7)	+1.41 (0.9)	41
9	0 (83.7)	0 (0.6)	37
10	0 (83.7)	0 (0.6)	37
11	0 (83.7)	0 (0.6)	36

Os experimentos de 1-4 da tabela 34 mostram combinações de variáveis individuais no processo. Os experimentos de 5-8 referem-se aos pontos axiais para a construção do modelo quadrático, assim como as entradas 9-11 referem-se às triplicatas do ponto central para a obtenção do erro experimental.

A maior conversão obtida é mostrada no experimento 5, onde foi-se atingido 73% de produto. Este valor é consideravelmente menor em comparação com os resultados obtidos nas reações em batelada, porém com tempo de reação muito menor. No equipamento de fluxo contínuo utilizado, reação prossegue em um microambiente com 0,6 ml de volume total. No experimento 5 foi aplicado 0,6 mL/min, o que significa que o tempo de contato entre o substrato e a enzima foi de apenas 1 min, contra 4 horas para as reações em batelada. Assim, foi-se possível obter expressivos percentuais de conversão com tempos reduzido sob condições de fluxo contínuo. Ao utilizar maiores taxas de fluxo, o tempo de residência para o substrato não é suficiente para desencadear boas conversões, obtendo-se apenas bons e moderados resultados (experimentos 2 e 8, tabela 34).

É importante notar que a concentração do substrato é também um problema que deve ser levado em conta. Nesta etapa, elevadas concentrações de substratos levaram a baixos índices de conversão, mesmo em condições de baixo fluxo (experimentos 6 e 11, tabela 33). Este fenômeno pode estar relacionado com uma possível inibição da enzima pelo substrato e também a deposição de ácidos graxos no interior do canal, como pôde ser observado para algumas experiências realizadas anteriormente com o AE, nestas condições.

A Tabela 35 mostra os efeitos estimados para o planejamento experimental 2^2 e seus valores de *p*.

Tabela 35: Efeitos estimados dos parâmetros utilizados no planejamento experimental fatorial 2^2 para a reação de formação do MRAG pela lipase RM IM sob condições de fluxo contínuo.

Variáveis	Efeito	Valor de <i>p</i>
Média	36.9000	<0.0001*
Fluxo	-28.8883	<0.0001*
Fluxo ²	11.6500	0.0006*
Concentração de Substrato	7.6462	0.0011*
Concentração de Substrato ²	-0.4500	0.2763
Fluxo x Concentração de Substrato	9.4000	0.0015*

*Estatisticamente significativo a um nível de confiança de 95%.

As variáveis fluxo, fluxo², concentração de substrato e a interação entre o fluxo e concentração do substrato demonstraram valores de *p* <0,05, sendo significativos no processo. A variável Fluxo demonstrou efeito negativo (-28,8883), indicando que nos fluxos mais baixos, se dá a conversão de substratos em produtos.

As equações de 1 a 3 representam os modelos experimentais dos percentuais de conversão em MRAG para as lipases TL IM e RM IM, nas reações em batelada e em fluxo contínuo, respectivamente, em função das variáveis estudadas. A adequação do modelo foi realizada por análise de variância e do parâmetro R^2 .

Conversão MRAG RM IM batelada (Equação 1): $Y = 75.1584 + 3.4956T + 3.9081E + 11.1868S - 2.1756St + 1.2943TxE + 2.1781TxS + 0.5231TxSt - 2.4843ExSt - 1.0693ExSt + 1.9493SxSt$

Conversão MRAG TL IM batelada (Equação 2): $Y = 74.2894 + 3.5068T + 4.6243E + 11.5131S - 1.5443St + 2.1618TxS + 1.1243TxSt - 1.4681ExS$

Conversão MRAG RM IM Fluxo (Equação 3): $Y = 36.6882 - 14.4442Q + 5.8912Q^2 + 3.8231S + 4.6500QxS$

Onde Y é a conversão e T, S, E, Ag e Q, são os valores não codificados de temperatura, concentração de substrato, quantidade de enzima, agitação mecânica e de fluxo, respectivamente. Os testes estatísticos dos modelos foram realizadas pelo teste estatístico F de Fisher para ANOVA.

Os valores de F calculados para todos os modelos matemáticos foram altamente significativos, sendo superiores aos valores de F tabelados. A adequação de um modelo pode ser verificada pelos coeficientes de determinação (R^2) e de correlação (R). Os coeficientes de determinação $R^2 = 0,98$ para RMIM nas reações em batelada, $R^2 = 0,99$ para TL IM em batelada e $R^2 = 0,91$ para RMIM, nas reações sob fluxo contínuo demonstram que uma variação na amostra de 98%, 99% e 91% para a produção do éster de interesse é atribuído às variáveis independentes e podem ser explicados pela precisão do modelo.

Os valores de R 0,99 para reação em batelada para a lipase RM IM, de 0,99 também para as reações em batelada para a enzima TLIM e 0,95 para RM IM em fluxo contínuo sugerem uma representação satisfatória do modelo do processo e uma boa correlação entre resultados experimentais e os valores teóricos previstos pelas equações do modelo. Quanto mais próximo de 1 o valor de R (coeficiente de correlação), melhor é a correlação entre os valores previstos e os experimentais.

As figuras 54A e 54B mostram os gráficos de superfície de resposta para as reações em batelada catalisadas pelas lipases RMIM e TL IM, respectivamente. Já a superfície de resposta construída para a reação sob condições de fluxo contínuo catalisada por RMIM encontra-se na figura 54C, a qual reflete o efeito negativo da variável fluxo que foi discutido, anteriormente.

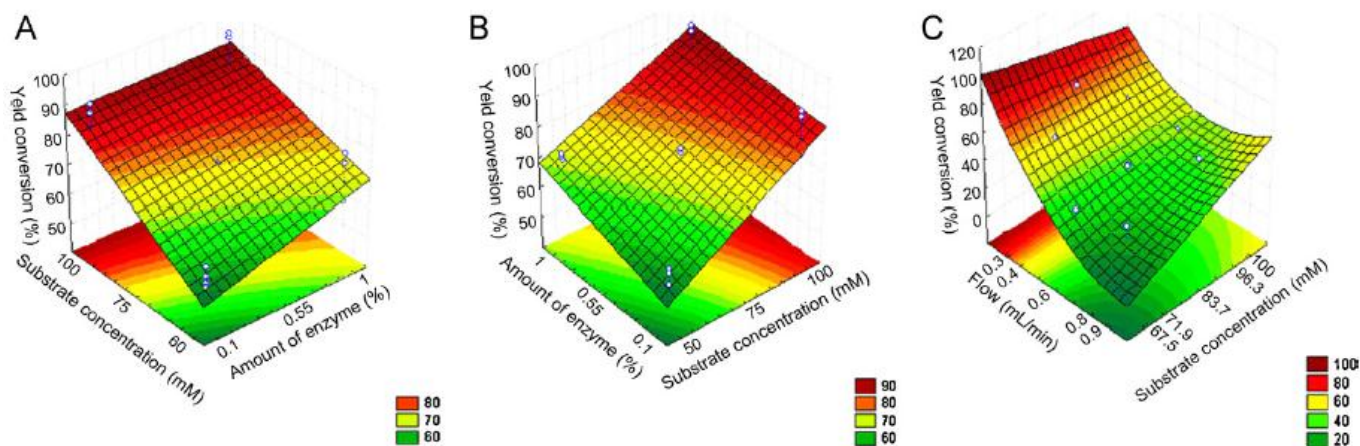


Figura 54: Superfícies de resposta para as reações de formação do MRAG em batelada catalisadas pelas lipases RMIM (A) e TL IM (B), e para a reação catalisada pela lipase RM IM (C) em fluxo contínuo.

4.17 - DCCR para Amostra de Ácidos Graxos com as Enzima Cal A e Cal C

Visando também verificar a otimização da reação em questão com outros biocatalisadores, foi-se realizado o mesmo DCCR proposto anteriormente, para as lipases A e C de *Cândida Antártica* (Cal A e Cal C, respectivamente), sob as mesmas condições propostas anteriormente, dadas as suas importâncias no item 4.11 desta seção. Os resultados encontram-se nas tabelas a seguir (36 e 37):

Tabela 36: Resultados do planejamento fatorial completo 2^2 para a esterificação do RAG e o IPG catalisada pela lipase Cal A sob condições de fluxo contínuo.

Entrada	S (mM)	Q (ml/min)	Conversão (%)
1	-1 (71.9)	-1 (0.4)	46
2	-1 (71.9)	+1 (0.8)	24
3	+1(95.3)	-1 (0.4)	32
4	+1(95.3)	+1 (0.8)	28
5	-1.41 (67.5)	0 (0.6)	83
6	+1.41 (100)	0 (0.6)	65
7	0 (83.7)	-1.41 (0.3)	64
8	0 (83.7)	+1.41 (0.9)	65
9	0 (83.7)	0 (0.6)	69

10	0 (83.7)	0 (0.6)	66
11	0 (83.7)	0 (0.6)	70

Tabela 37: Resultados do planejamento fatorial completo 2^2 para a esterificação do RAG e o IPG catalisada pela lipase Cal C sob condições de fluxo contínuo.

Entrada	S (mM)	Q (ml/min)	Conversão (%)
1	-1 (71.9)	-1 (0.4)	42,1
2	-1 (71.9)	+1 (0.8)	29,5
3	+1(95.3)	-1 (0.4)	43,7
4	+1(95.3)	+1 (0.8)	20
5	-1.41 (67.5)	0 (0.6)	15
6	+1.41 (100)	0 (0.6)	16
7	0 (83.7)	-1.41 (0.3)	25
8	0 (83.7)	+1.41 (0.9)	26,2
9	0 (83.7)	0 (0.6)	18,3
10	0 (83.7)	0 (0.6)	28,82
11	0 (83.7)	0 (0.6)	26

Como resultados obtidos, a Lipase Cal A Também apresenta bons resultados de conversão nas otimizações realizadas, podendo constituir-se um possível substituto da lipase RM IM na síntese do monoacilglicerol de interesse. Entretanto, de maneira geral, as conversões foram inferiores àquelas apresentadas pela lipase de *Thermomyces lanuginosus*. Talles et al (2013), relataram uma seletividade da enzima A de *Cândida antarctica* para ácidos graxos saturados na hidrólise de triacilgliceróis. Pelo fato de o RAG utilizado neste trabalho apresentar composição rica em ácido oleico, um ácido graxo insaturado, a redução nas conversões, se comparadas a etapa de formação de MEP em fluxo contínuo com esta enzima (tabela 36), poderia ser explicada por esta quimiosseletividade da enzima. Entretanto, não foram realizados experimentos que comprovassem tal efeito.

Tendo-se em vista sua gama de aplicações, em trabalhos anteriormente discutidos, este biocatalisador torna-se uma alternativa promissora. Além disto, confirmou-se, neste

experimento, que as condições reacionais foram, de fato, otimizadas, gerando bons resultados de conversão.

4.18 - Adaptação das Condições Reacionais para outro Reator de Leito Fixo

Assim como realizado na etapa com o AE como reagente de partida, a síntese de monoacilgliceróis através do RAG em condições de fluxo contínuo foi adaptada para o sistema Ásia de Fluxo contínuo (figura 55), com coluna de leito fixo de vidro, e volume final de 2,4mL, de modo a se utilizar uma quantidade conhecida de enzima, para que possa ser calculada a produtividade final do sistema.

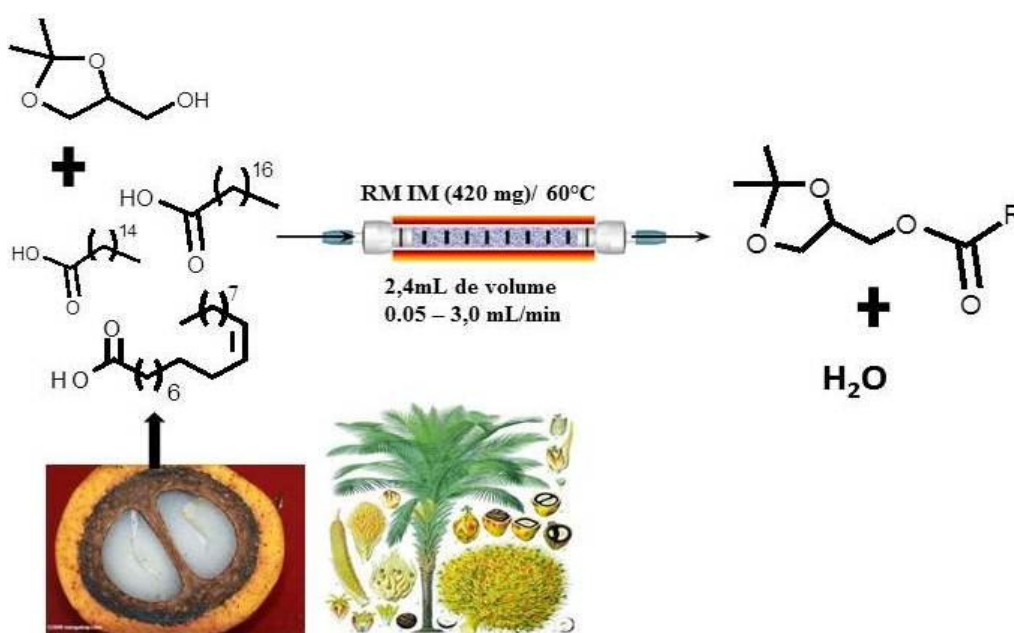


Figura 55: Esquema da reação de formação do MRAG em condições de fluxo contínuo em sistema ASIA. RAG:IPG 1:1 (100mM), 60°C, 420mg de RM IM, coluna de 2,4mL.

De posse dos resultados obtidos no estudo de dessorção da lipase de *Rhizomucor miehei* de seu suporte, realizada anteriormente, os melhores resultados nesta etapa poderão também ser expressos em produtividade, já que a concentração de enzima por grama de suporte é agora, conhecida.

Nesta etapa, a referida reação foi ensaiada em diferentes fluxos reacionais, seguindo as condições previamente otimizadas de temperatura e concentração de substratos, como mostra a tabela 38:

Tabela 38: Conversões apresentadas pela enzima RM IM na formação do MRAG em condições de fluxo contínuo, de acordo com o tempo de residência.

Q (mL/min)	Tempo de Residência (min)	Conversão (%)
0,05	48	90
0,1	24	93
0,5	4,8	80
1,0	2,4	65
1,5	1,6	50
2,0	1,2	41
3,0	0,8	33

Como esperado, os menores fluxos utilizados foram aqueles onde as maiores conversões foram encontradas, devido ao maior tempo de contato do biocatalisador com os substratos. Como evidenciado na tabela 34, não foram encontradas diferenças significativas entre os tempos de residência de 24 e 48 minutos. Entretanto, em termos de produtividade final, a reação realizada em fluxo de 0,1mL/min é mais vantajosa, visto que altas conversões são geradas na metade do tempo de residência quando em fluxo de 0,05mL/min. Desta forma visando a otimização da performance enzimática, esta reação foi analisada em concentrações crescentes de substratos (tabela 39) em tempo de residência de 24 minutos.

Tabela 39: Conversões apresentadas pela enzima RM IM na formação do MRAG em condições de fluxo contínuo, de acordo com a concentração de substratos (RAG e IPG 1:1), em fluxo de 0,1mL/min.

Concentração de Reagentes (mol/L)	Conversão, %
0,1	92
0,2	93
0,3	90
0,5	89
0,7	89
1	90

1,1	89
1,2	90
1,3	89
1,4	90
1,5	90
1,7	64
2,0	30
2,5	20

Neste sistema, a enzima RM IM foi capaz de manter altas conversões até a concentração de 1,5mol/L de reagentes, concentração 15 vezes maior do que a inicialmente testada, demonstrando grande tolerância nas condições de reação. Para verificar a eficiência deste biorreator, decidimos também analisar a quantidade de ciclos possíveis, assim como a possível lixiviação da enzima para o meio reacional (figura 56), como realizado anteriormente para os outros sistemas.

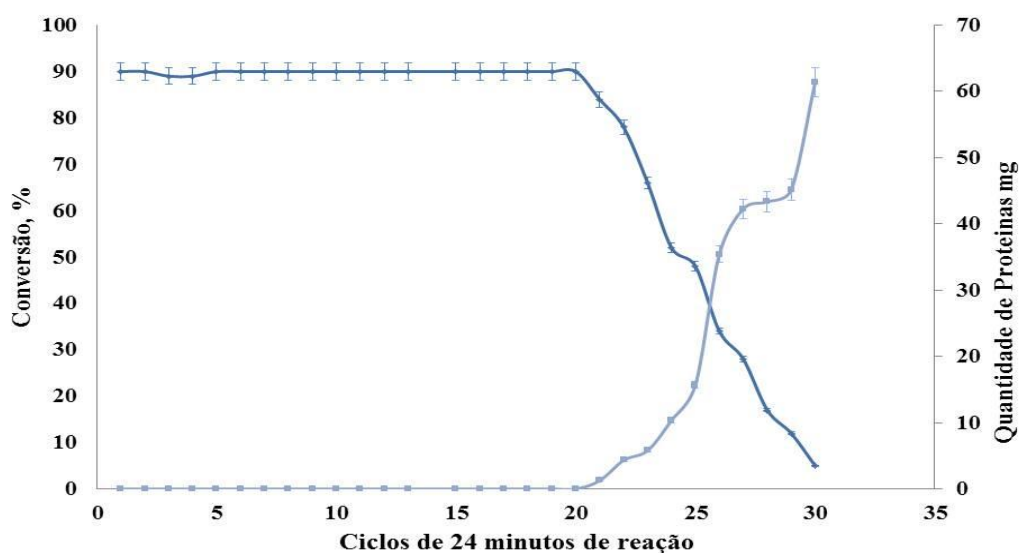


Figura 56: Reciclos possíveis e análise de proteínas nas alíquotas recolhidas na reação de formação do MRAG em condições de fluxo contínuo. Condições: IPG e RAG 1:1 (1,5mol/L em n-heptano), 60°C, 0,1mL/min.

Como visto, neste biorreator, 20 ciclos foram possíveis, de modo que a enzima em questão não perdesse sua capacidade catalítica. Isto pode ser justificado pela melhor solubilidade do

RAG em heptano, devido a maior quantidade de ácido oleico e palmítico, ácidos graxos mais solúveis neste solvente do que o AE. Deste modo, a superfície de contato entre a enzima e o biocatalisador foi otimizada, facilitando também, a retirada de excesso de reagentes durante as lavagens do suporte entre os ciclos reacionais.

4.19 - Estudo da Síntese de Monoacilgliceróis catalisada pela Lipase RM IM em sistemas livres de solventes

Nesta etapa do trabalho, foi investigada a síntese de monoacilgliceróis, tanto aqueles derivados do AE, quanto os derivados de RAG em sistemas livres de solventes (figura 36). Ambas reações foram estudadas tendo-se como biocatalisador a lipase RM IM, enzima utilizada nas etapas anteriores. As diversas variáveis reacionais já otimizadas anteriormente, tais como agitação, temperatura, razão molar de substratos, foram mantidas em cada caso. As combinações entre AE e IPG, assim como RAG com IPG são solúveis entre si em proporções equimolares, possibilitando a obtenção das curvas cinéticas em função do tempo variando a concentração de enzima em 1, 3, 5, 10 e 15% e 20% (p/p substratos).

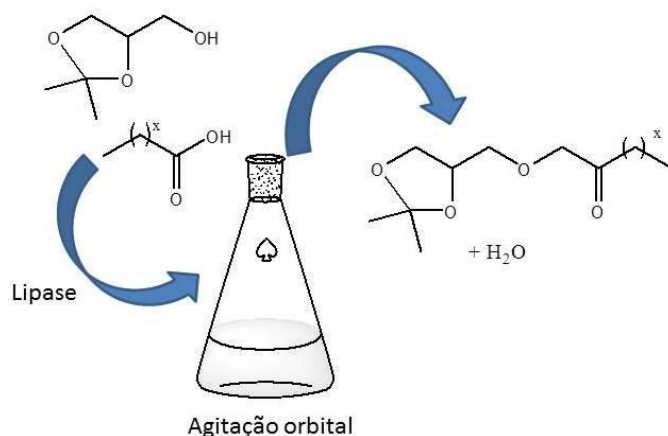


Figura 57: Esquema da reação de formação de MEP e MRAG em condições livres de solventes.

Por se tratar de um sistema livre de solventes, estas reações foram realizadas em frascos erlenmeyers de 125mL (figura 57), de modo a melhorar a dispersão da enzima nos substratos, durante a agitação, já que o meio reacional é mais viscoso. Além disto, por se tratar de um sistema aberto, a saída de água, subproduto da reação é facilitada, não havendo interferência desta nas conversões finais.

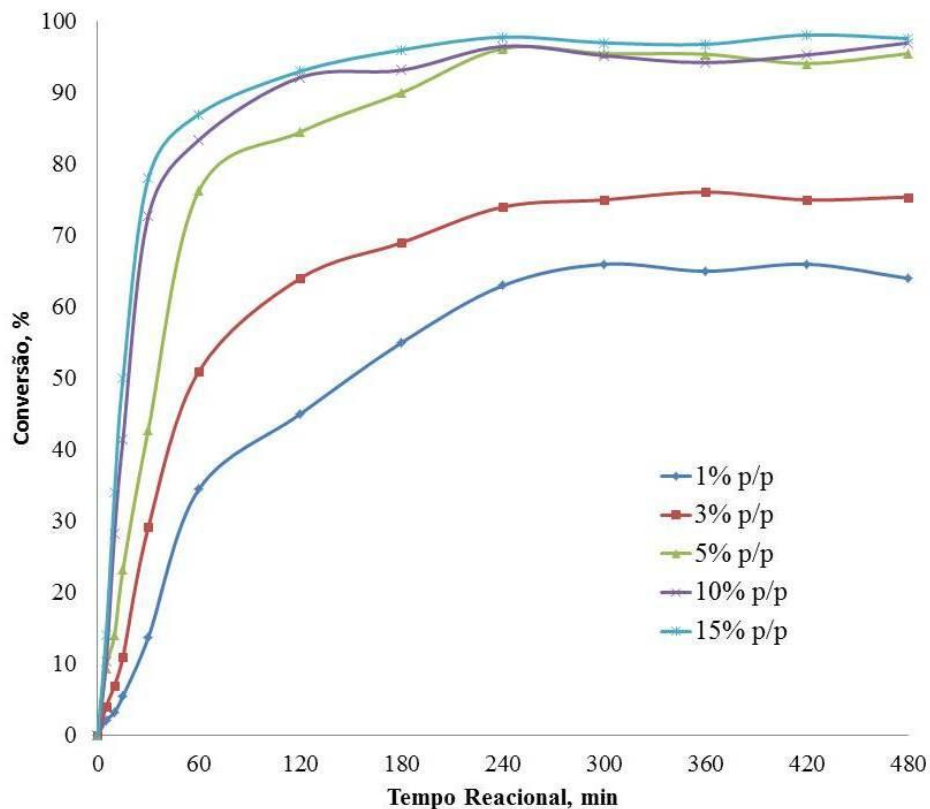


Figura 58: Efeito da concentração da enzima RM IM sobre a conversão do MEP, a razão molar de AE: IPG 1:1, temperatura de 58,5°C, agitação de 250 rpm, em sistema livre de solventes.

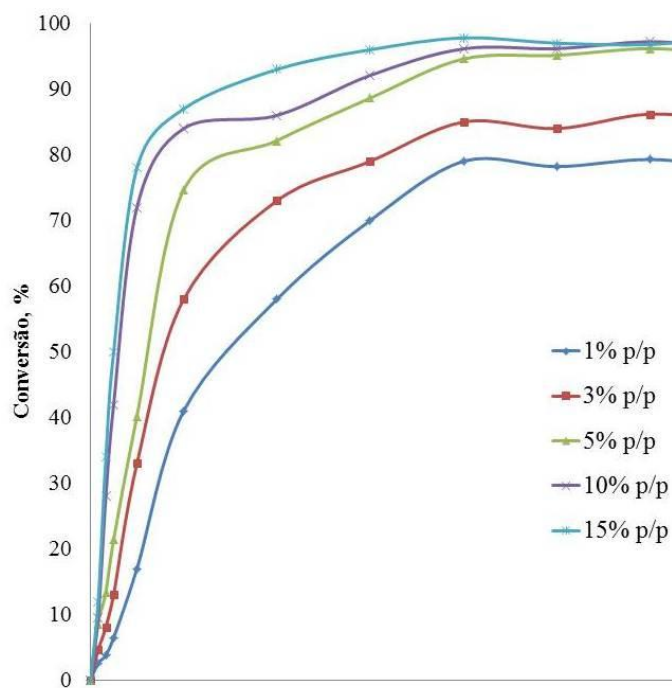


Figura 59: Efeito da concentração da enzima RM IM sobre a conversão MRAG, a razão molar de RAG: IPG 1:1, temperatura de 58,5°C, agitação de 250 rpm, em sistema livre de solventes.

Como observado nas figuras anteriores, na presença de 1% (p/p) de biocatalisador, os sistemas sem solvente apresentaram as menores conversões, diferente daqueles na presença de n-heptano, onde as maiores conversões obtidas foram 74%, no caso do AE, e 79%, tendo o RAG como ácido graxo, ambas em 4h. A tabela com os valores encontrados em cada reação está anexada no apêndice A, ao fim deste trabalho.

O aumento de viscosidade do meio reacional, assim como a maior oferta de substratos para a enzima, podem ter tido importante papel na redução das conversões. Reações em condições ausentes de solvente, onde cada reagente atua como solvente, apresentam importância industrial e comercial, onde diversos estudos para a síntese de novos produtos tem voltado suas atenções (Luque & Clark, 2013). Embora este sistema seja ecologicamente mais correto, as taxas de transferência de massa são bastante limitadas. Sistemas nos quais lipases podem catalisar reações, são na sua grande maioria, heterogêneos, onde os substratos são solúveis em um determinado solvente, e as lipases, insolúveis, sendo a reação procedida na interface entre solvente e biocatalisador. A heterogeneidade da reação resulta na resistência da transferência de massa por causa das baixas taxas de difusão do reagente para o sítio ativo das enzimas (Kumar et al, 2004).

Ainda sobre as figuras 57 e 58, adições de 10 e 15% (p/p) de RM IM ao meio reacional não apresentaram aumento significativo nas conversões de ambos os monoésteres, mostrando que nestes casos, as concentrações ótimas de enzima são de 5% (p/p), diferentemente das condições em batelada otimizadas na presença de n-heptano. Nas maiores concentrações de enzima, nota-se ainda, uma tendência, em ambos os processos, a estabilidade nas conversões a partir do tempo de uma hora. Tal fato, já observado por Richetti (2009) na conversão do palmitato de 2-etilhexila, pode ser explicado pela hipótese de que um excesso de enzima no meio leva a formação de agregados, tornando o sítio ativo dos biocatalisadores menos disponível para os substratos, não gerando aumentos de conversão. Além disto, elevadas quantidades de enzima podem prejudicar a distribuição da enzima pelo meio reacional (Richetti, 2009). Segundo Karra-Chaabouni et al (2006), citado por Richetti (2009), as moléculas de enzima na superfície externa do meio reacional não-homogêneo seriam expostas a elevadas concentrações de reagentes de partida, entretanto, o transporte de massa dentro do suporte pode dificultar a concentração de substrato no interior da partícula. Como consequência, uma fração da quantidade de biocatalisador utilizada apresentará menor atividade, enquanto outra terá grande eficiência, gerando um equilíbrio.

Como realizado nos estudos cinéticos anteriores, nas condições em batelada, as velocidades iniciais foram também calculadas em para cada reação, em suas quantidades de

enzima. Em ambos os processos, na menor quantidade de enzima utilizada, as menores velocidades iniciais de reação foram encontradas. Além disto, aumentos na concentração de enzima a partir de 5% (p/p) não alteram de modo significativo as velocidades iniciais, entretanto, aumentam intensamente as conversões finais.

Tabela 40: Velocidades iniciais calculadas para as cinéticas de formação de MEP e MRAG de acordo com a concentração de enzima, e ácido como material de partida.

Quantidade de Enzima (% p/p) dos substratos	Velocidade inicial de reação (min^{-1})	
	AE	RAG
1	1,21	1,32
3	2,16	2,4
5	3,25	3,12
10	3,44	3,54
15	3,42	3,63

Reações em sistemas de ausência de solventes orgânicos são tidos como ambientalmente favoráveis (Santos et al, 2007), onde a principal vantagem deste sistema seria o fato de a ausência de solvente facilitar processos futuros de purificação, além de refletir em uma redução do impacto ambiental e dos custos finais do processo. Reações na presença de solventes orgânicos apresentam algumas desvantagens, como a inflamabilidade, geração de resíduos, além da toxicidade e custos, tanto para sua aquisição, quanto para reciclagem. Desta maneira, sistemas livres de solventes podem ser uma alternativa atraente.

Tamayo et al (2012) estudaram a esterificação do ácido benzoico com o glicerol em condições livres de solventes para a obtenção do 1 ou 3-monobenzoato de glicerila, catalisada pela enzima CaL B, obtendo-se mais de 80% de conversão a 60°C, além de seletividade para a formação da isoforma α do produto. Já Zhao et al (2011) otimizaram a reação de esterificação do ácido oleico com o glicerol para a obtenção de mono e diacilgliceróis, catalisada pela lipase de *Cândida* sp. 99-125. β -ciclodextrina foi utilizada como assistente. As melhores condições de razão molar glicerol/ácido oleico, razão enzima/ β -ciclodextrina, quantidade de enzima e temperatura foram 6:1, 0, 5% e 50°C respectivamente, para a obtenção de MAG, e 5:1, 1,5, 10%, e 40°C respectivamente para DAG. Sob 10% de água e 190rpm de agitação, foram obtidos 49,6% em MAG e 54,3% de DAG em 8h e 4h, respectivamente.

A síntese dos monoacilgliceróis proposta nesta etapa foi também ensaiada via fluxo contínuo. Entretanto, por se tratar de um sistema livre de solventes, há a necessidade inicial da fusão dos reagentes de partida, para em seguida, ser iniciado o contato dos mesmos com o biocatalisador, neste caso, em coluna de leito fixo. Tendo-se em vista o caminho percorrido pela amostra até a chegada a enzima, como os reservatórios das bombas peristálticas, e as mangueiras condutoras até a coluna, é grande a troca térmica nestes compartimentos, fato este que repercutiu em redução da temperatura, e posterior solidificação, principalmente dos ácidos graxos estudados, que saíram da faixa de temperatura ótima de fusão (55-60°C). Como consequência, houve o aumento da pressão interna do sistema, e até mesmo solidificação de reagentes na coluna de leito fixo contendo enzima. O risco de precipitação de reagentes de partida na coluna, causada por sistemas sem solventes, ou até mesmo a utilização de soluções muito concentradas, é uma das grandes desvantagens da utilização de reatores de leito fixo, limitando alguns estudos de reações utilizando este tipo de abordagem. Tais problemas poderiam ser contornados através da utilização de solventes orgânicos, onde a solubilidade dos substratos é garantida independentemente de temperatura. Entretanto, como este não é o objetivo desta etapa, estudamos somente a reação de formação dos monoacilgliceróis em condições de batelada, isenta de solventes.

CAPÍTULO 5

Resultados e Discussão

PARTE 2: Síntese de Monoacilgliceróis via Químio-enzimática em Cascata sob condições de Fluxo Contínuo.

5.1 - Contextualização:

Neste capítulo, será discutido o acoplamento de etapas para a síntese de monoacilgliceróis, sob condições de fluxo contínuo.

De posse destes resultados de otimização da esterificação do RAG e do AE com o IPG em altas concentrações em n-heptano, sob condições de fluxo contínuo, foi desenvolvido um sistema reacional em cascata, que acopla etapas utilizando catalisadores heterogêneos, para a acetalização do glicerol e formação do IPG in situ, além dos processos de esterificação enzimática e posterior quebra do acetal, para a obtenção dos monoacilgliceróis finais desprotegidos (figura 60).

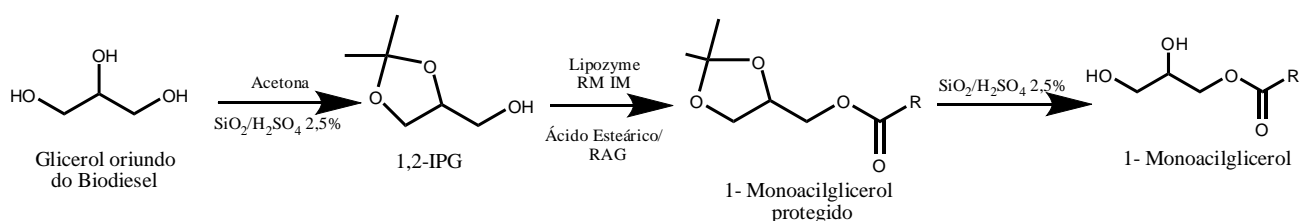


Figura 60: Etapas estudadas para a síntese de MAGs.

Para que o processo em cascata ocorresse de forma eficaz, cada processo foi estudado isoladamente em primeira instância, para que depois, pudessem ser conectados, em 3 reatores.

5.2 – Estudo da Acetalização do Glicerol: Formação de IPG

A primeira etapa da cascata reacional para a formação de monoacilgliceróis consistiu no tratamento do glicerol oriundo da indústria de biodiesel, o qual foi acetalizado e transformado em IPG *in situ*. Pelo fato de o equipamento utilizado não apresentar compartimentos para acondicionar colunas de mesmo volume e altura para cada processo, resolvemos estudar esta reação em coluna de 5,49mL de volume final, totalmente preenchida com um catalisador heterogêneo previamente preparado em laboratório, que será discutido ao longo desta seção. A coluna de leito fixo de 2,41mL de volume final será utilizada para a etapa de síntese dos monoacilgliceróis protegidos, pois foi nesta onde as condições desta reação foram otimizadas anteriormente.

A condensação do glicerol pode ser uma alternativa plausível para o reaproveitamento deste resíduo industrial, uma vez que o produto protegido final pode ser aplicado, além da produção de monoacilgliceróis e outros derivados surfactantes, na síntese de moléculas com propriedades aditivas na síntese de biodiesel (De Torres et al, 2012), melhorando as propriedades frias, além de diminuir a viscosidade (Zheng et al, 2008; Melero et al, 2010; Mota, Silva e Gonçalves, 2010). Tradicionalmente, a condensação de glicerol pode ser feita tanto com acetona, quanto com formaldeído como reagentes de partida. Entretanto, para que haja a formação de IPG, a reação deve proceder em acetona. Neste caso, dois produtos principais (figura 61) podem ser formados: (2,2-dimetil-[1,3] dioxano-4-ol)-metanol (A) e 2,2-dimetil-[1,3] dioxan-5-ol (B) (Khayoon & Hameed, 2013).

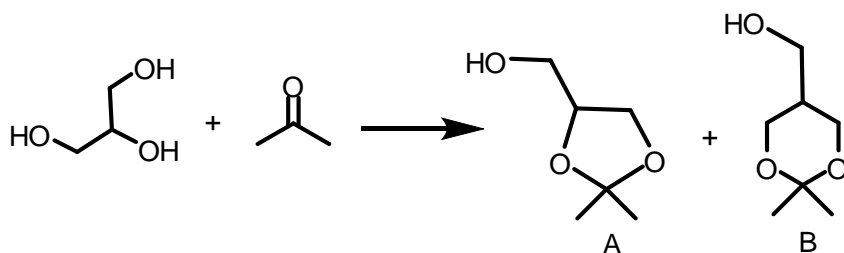


Figura 61: Possíveis acetais formados na reação de condensação do glicerol com a acetona (adaptado de Khayoon & Hameed, 2013).

Como mecanismo provável de reação (figura 62), a acetalização do glicerol com acetona conduz à formação de um hemiacetal. A consequente desidratação promove a formação de um íon carbenium terciário, que pode ser estabilizado através de ressonância com os pares de elétrons livres do oxigênio do grupo hidroxila adjacente. Em seguida, um

rápido ataque nucleofílico do grupo hidroxila secundário ocorre para formar o anel acetal de cinco membros.

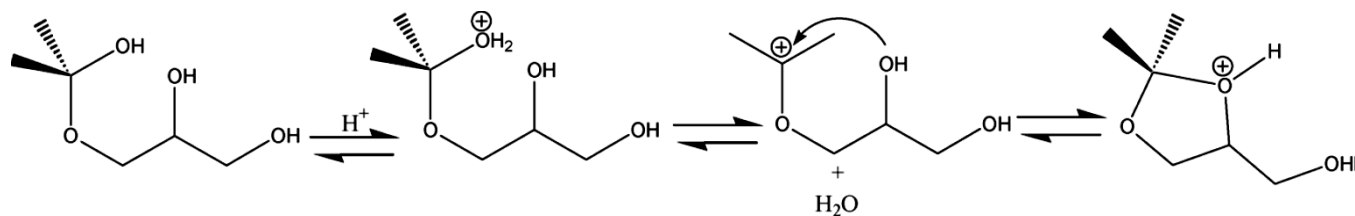


Figura 62: Mecanismo proposto para a acetalização do glicerol. Da Silva et al, 2009.

Como tempo de vida do íon *carbenium* no meio reacional é relativamente curto, em comparação com o tempo de vida do hemiacetal, a distribuição do produto é regulada pela cinética, o que favorece a formação do estado de a transição termodinamicamente menos estável anel de cinco membros (Da Silva et al, 2009; Khayoon & Hameed, 2013). Este produto já foi observado em trabalhos anteriores (Reddy et al, 2011; Gil et al, 2011) o que confirma este mecanismo de reação e prevalência de produto.

Tradicionalmente, a condensação de glicerol com acetona é realizada tendo-se ácidos minerais como catalisadores preferenciais. No entanto, os resíduos gerados levam a problemas ambientais e inconvenientes econômicos. Atualmente, estes problemas podem ser superados pelo uso de catalisadores heterogêneos, como zeólitas e resinas ácidas, como a Amberlyst. Na literatura, poucos são os trabalhos onde são aplicados estes tipos de catalisadores na acetalização de glicerol: Mota, Silva e Gonçalves (2010) acetalizaram o glicerol com acetona e formaldeído, utilizando diversos catalisadores heterogêneos, obtendo maiores conversões com a acetona (95%), a 70°C e 15 minutos, catalisada pela resina ácida Amberlyst-15. Além disto, a zeólita beta gerou uma conversão de 90% em 40 minutos. Já Ferreira et al (2010) investigaram a acetalização do glicerol com acetona, através de heteropoliácidos imobilizados em silicagel convencional, onde obtiveram resultados altamente satisfatórios, com 90% de conversão em IPG em 50 minutos a 50°C. O IPG também foi sintetizado por de Khayoon & Hameed (2013), catalisado por mesoporus 5%Ni–1%Zr/AC, onde 74% de conversão foi obtida a 45°C em 3h. Entretanto, 26% do acetal de intermediário de 6 membros também foi obtido. Tendo-se em vista estes resultados presentes na literatura, além do fato de não haver nenhum trabalho relatando a acetalização do glicerol em condições de fluxo contínuo, decidimos investigar a presente reação através da

funcionalização da sílica gel com ácido sulfúrico (como descrito na seção experimental), sendo este o catalisador heterogêneo utilizado a partir daqui (SGF).

Primeiramente, foi investigada a acetalização em diferentes SGFs, contendo de 1 a 10% de H_2SO_4 p/v, em coluna de leito fixo. Neste ensaio, optamos por utilizar excesso de acetona (razão molar 6:1 com glicerol), como realizado por Ferreira et al (2010), acondicionado em um frasco com forte agitação magnética (figura 63).

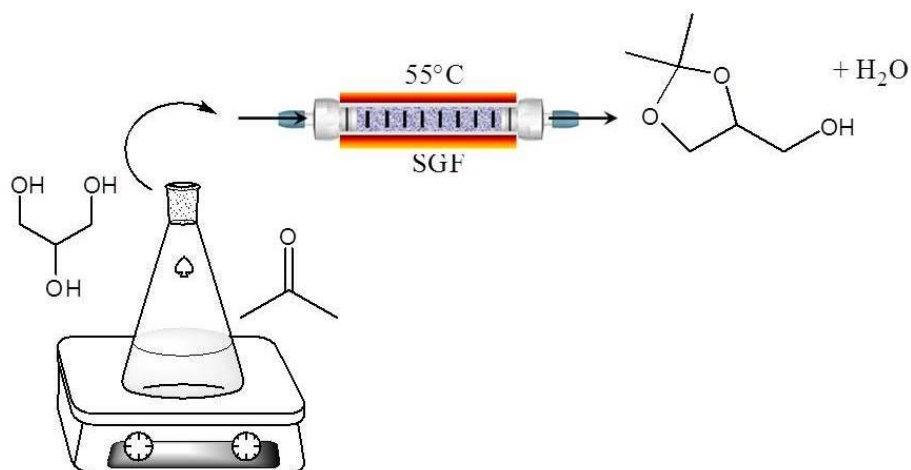


Figura 63: Esquema da reação inicial de acetalização do glicerol em condições de fluxo contínuo. Condições: Razão molar acetona:glicerol 6:1, 55°C, coluna de leito fixo de 5,5mL (580mg de SGF).

Como o ponto de ebulição da acetona é 56°C, optamos também por realizar o processo a 55°C, de modo a contornar sua evaporação durante o percurso reacional. Altas temperaturas também são necessárias para proporcionar a redução de viscosidade do glicerol. O processo foi realizado inicialmente em fluxo de 0,1mL/min, gerando um tempo de residência de aproximadamente 55 minutos (figura 63)

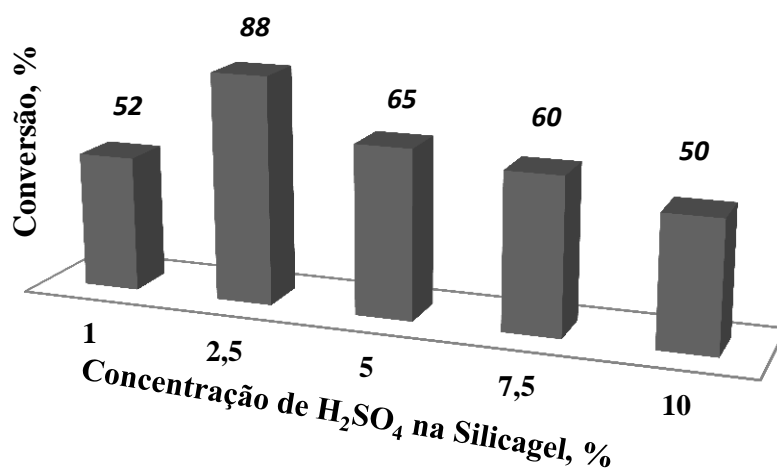


Figura 64: acetalização do glicerol em acetona em fluxo contínuo catalisada por SGFs: fluxo de 0,1mL/min; 55°C; razão molar acetona/glicerol 6:1.

Como observado na figura 64, a concentração de 2,5% foi suficiente para converter cerca de 88% de glicerol em IPG. Isto mostra que o aumento da força ácida da resina tem um limite para que um resultado satisfatório seja obtido, podendo haver o deslocamento do equilíbrio da reação para o sentido de hidrólise, como resultado de uma reação muito rápida, gerando grande quantidade de água. Esta pode ser a explicação para os resultados inferiores obtidos para as SGFs de maiores teores de acidez (5, 7,5 e 10%). Deste modo, a SGF com 2,5% de ácido sulfúrico foi selecionada para os ensaios subsequentes, onde a reação de acetalização foi monitorada em diferentes fluxos, com o intuito de se certificar da influência dos menores tempos de residência na formação do IPG, como mostra a tabela 41:

Tabela 41: Resultados de conversão em IPG de acordo com o tempo de residência. Razão molar Acetona, glicerol 6:1; 55°C.

Fluxo	Tempo de Residência (min)	Conversão (%)
0,1	55	88
0,2	28	86
0,5	11,2	60
1,0	5,5	45
1,5	4,1	42
2,0	2,8	38

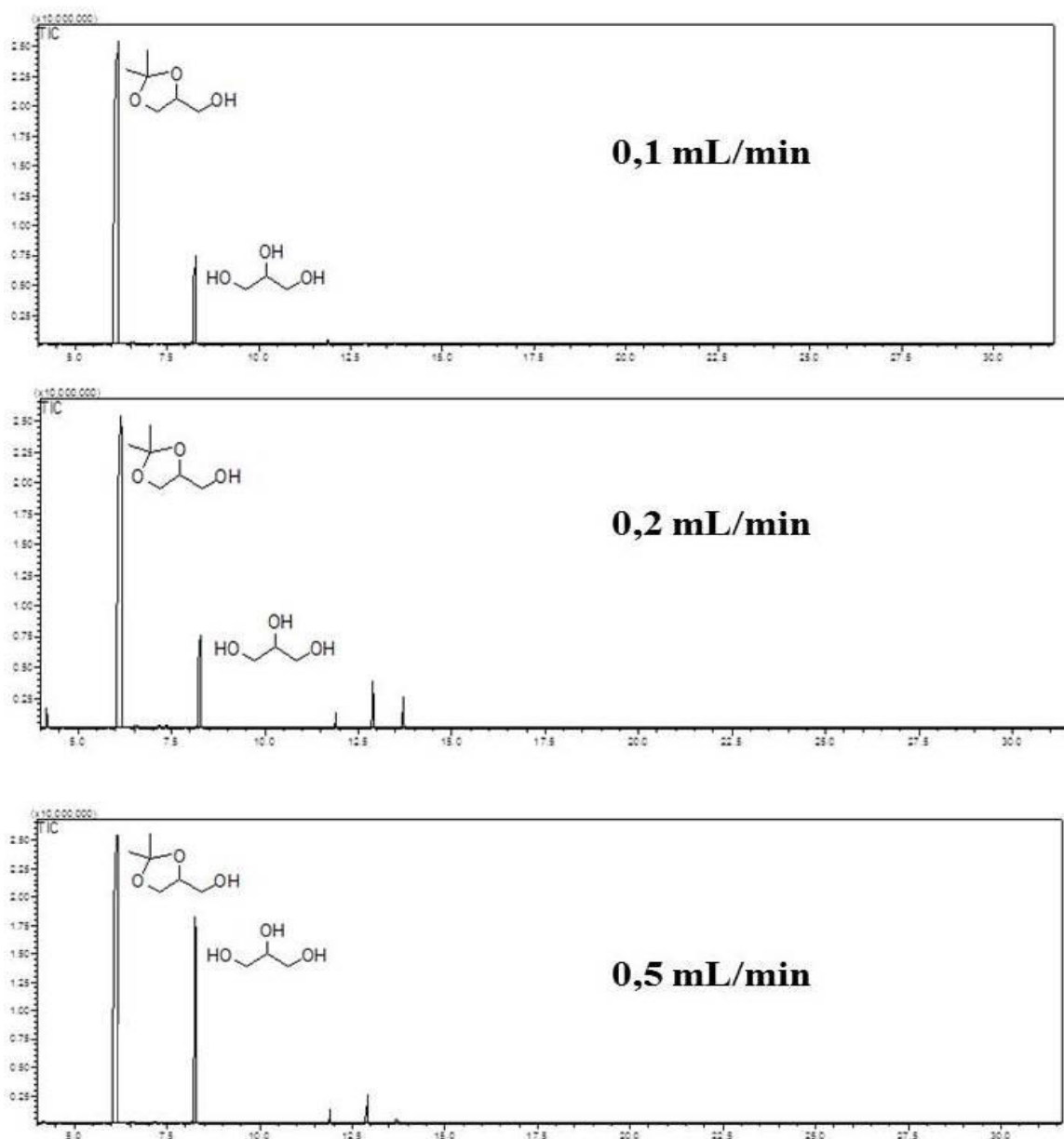


Figura 65: Cromatogramas das reações de acetalização do glicerol em reator de leito fixo, em fluxos de 0,1;0,2 e 0,5mL/min. Razão molar acetona/glicerol 6:1, temperatura de 55°C.

Como observado, fluxos entre 0,1mL/min e 0,2mL/min não apresentam diferenças significativas na conversão em IPG. Entretanto, esta torna-se pronunciada ao levarmos em consideração o tempo de residência, onde o fluxo de 0,2mL/min é capaz de fornecer boas conversões em 28 min, enquanto que em fluxo de 0,1mL/min, há um tempo de residência de 55 minutos. A figura 65 mostra os cromatogramas das amostras recolhidas nos fluxos de 0,1, 0,2 e 0,5 mL/min.

Analisando-se os cromatogramas das reações, observa-se que não houve a formação do intermediário de 6 membros, demonstrando ser este um sistema reacional seletivo.

Em fluxo de 0,5mL/min a redução de contato entre os reagentes de partida e o catalisador começam a ser significativos. Portanto, o fluxo de 0,2mL/min foi tido como o melhor nesta etapa.

Diferentes razões molares entre acetona e glicerol, assim como temperaturas mais brandas para a esta reação foram investigadas, como mostrado na tabela abaixo:

Tabela 42: Resultados da investigação de diferentes temperaturas e razões molares acetona:glicerol na reação de acetalização do glicerol em coluna de leito fixo. Condições: 55°C, coluna de 5,5mL (480mg de SGF), fluxo de 0,2mL/min (28minutos).

Razão molar acetona/glicerol	Temperatura (°C)				
	25	30	40	50	55
1:1	13,6	23,1	50,1	75,4	80
1,5:1	14,7	26,1	51,2	79,3	88
2:1	15,1	25,7	52,3	80,2	87
3:1	14,4	24,1	53,0	80,6	88

Os resultados obtidos (tabela 42) mostram que o fluxo e a temperatura são variáveis bastante importantes nesta reação. As temperaturas mais elevadas foram responsáveis pelas melhores conversões. Isto é consequência da menor viscosidade do glicerol em temperaturas maiores que 50°C, melhorando o contato deste com o catalisador, evitando sua deposição na superfície do suporte. Nos maiores fluxos, o tempo para a conversão completa do material de partida é insuficiente. O melhor resultado foi obtido quando se operou o sistema em 0.2mL/min a 55°C, obtendo-se 87,5% de conversão. Além disso, as maiores proporções molares entre acetona e glicerol testadas não foram significativas na melhoria das conversões, sendo a razão molar ótima de 1,5:1, diferentemente dos resultados obtidos por Khayoon & Hameed (2013), onde as maiores conversões em IPG foram encontradas em razões molares de glicerol/acetona 1:8, a 45°C e 3h, além do trabalho publicado por Da Silva et al (2010), onde a razão molar necessária foi de 1:6, como descrito anteriormente. Por se tratar de um processo realizado em reator de leito fixo, este resultado é interessante, visto que os processos realizados por outros autores, em sistemas de batelada, utilizam razões molares superiores de reagentes e obtêm resultados semelhantes, demonstrando que a tecnologia de fluxo contínuo pode ser uma ferramenta interessante.

5.3 - Estudo da Desproteção do MEP

Tendo-se em vista a otimização previa, das condições reacionais para a formação de monoestearato de IPG em altas concentrações de reagentes (2,0mol/L) em fluxo contínuo, a etapa de desproteção deste produto foi estudada próxima etapa estudada isoladamente foi a quebra dos acetais presentes nos produtos de esterificação (figura 66). Como catalisador desta reação, aplicou-se a mesma SGF da etapa de acetalização do glicerol.



Figura 66: Esquem da reação de desproteção do MEP.

Entretanto, por se tratar de uma catálise ácida, maiores ou menores tempos de contato entre os monoacilgliceróis protegidos e o catalisador podem gerar alguns subprodutos de hidrólise do éster formado, ou até mesmo não levar a formação do produto final (Figura 67).

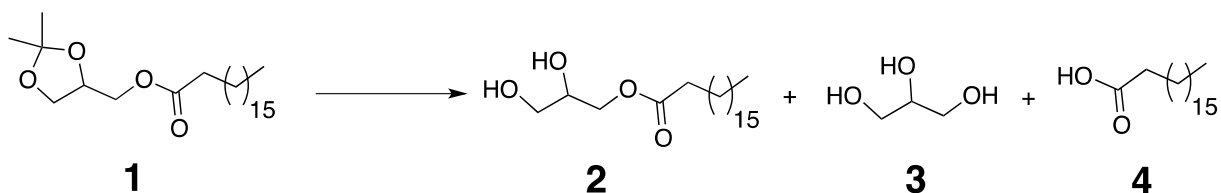


Figura 67: Possíveis subprodutos formados na catálise ácida de desproteção do MEP. 1- MEP; 1-monoestearato de glicerila; 3-glicerol e 4- AE.

Desta forma, esta é a etapa mais importante do processo, e por este motivo, o fluxo preconizado nesta reação foi o fluxo que regeu toda a cascata de reação, quando acoplada. De modo a se avaliar cautelosamente a seletividade para os produtos formados, reaproveitamos o monoestearato de IPG, previamente obtido na etapa de reação em batelada sem solventes e purificado como descrito na seção experimental.

A quebra do acetal de uma solução a 2,0 mol/L deste intermediário em n-heptano foi então, testada em diversos fluxos, variando de 01 a 0,5mL/min, a 55°C, temperatura próxima a condição ideal de esterificação, e a melhor para a acetalização.

A tabela 43 demonstra os resultados de seletividade para os subprodutos da reação, de acordo com os fluxos testados:

Tabela 43: Seletividade para os produtos possíveis da Desproteção dos acetais do monoestearato de IPG.

Experimento	Fluxo (mL/min)	Seletividade (%)			
		1	2	3	4
1	0.1 mL/min	n.d	65.4	29.35	5.25
2	0.2 mL/min	n.d	87,5	n.d	12.5
3	0.3 mL/min	19.35	70.2	n.d	10.45
4	0.5 mL/min	42.12	48.35	n.d	9.53

Como observado, o fluxo aplicado foi de extrema importância para uma conversão seletiva do MEP (1) para o 1-monoestearato de glicerila (2). Os baixos fluxos aplicados (experimento 1), propiciam um maior tempo de residência, e conseqüentemente, maior o tempo de contato entre o material de partida e a SGF, levando a hidrólise de (1), expresso pela baixa seletividade para (2). Elevando-se o fluxo para 0,5 mL/min (Experimento 4), gera-se um tempo de residência muito curto, diminuindo a conversão do produto de interesse (2). A grande quantidade de produto (1) detectada corrobora com esta afirmação. Tais resultados podem ser comprovados pelos cromatogramas da figura 68.

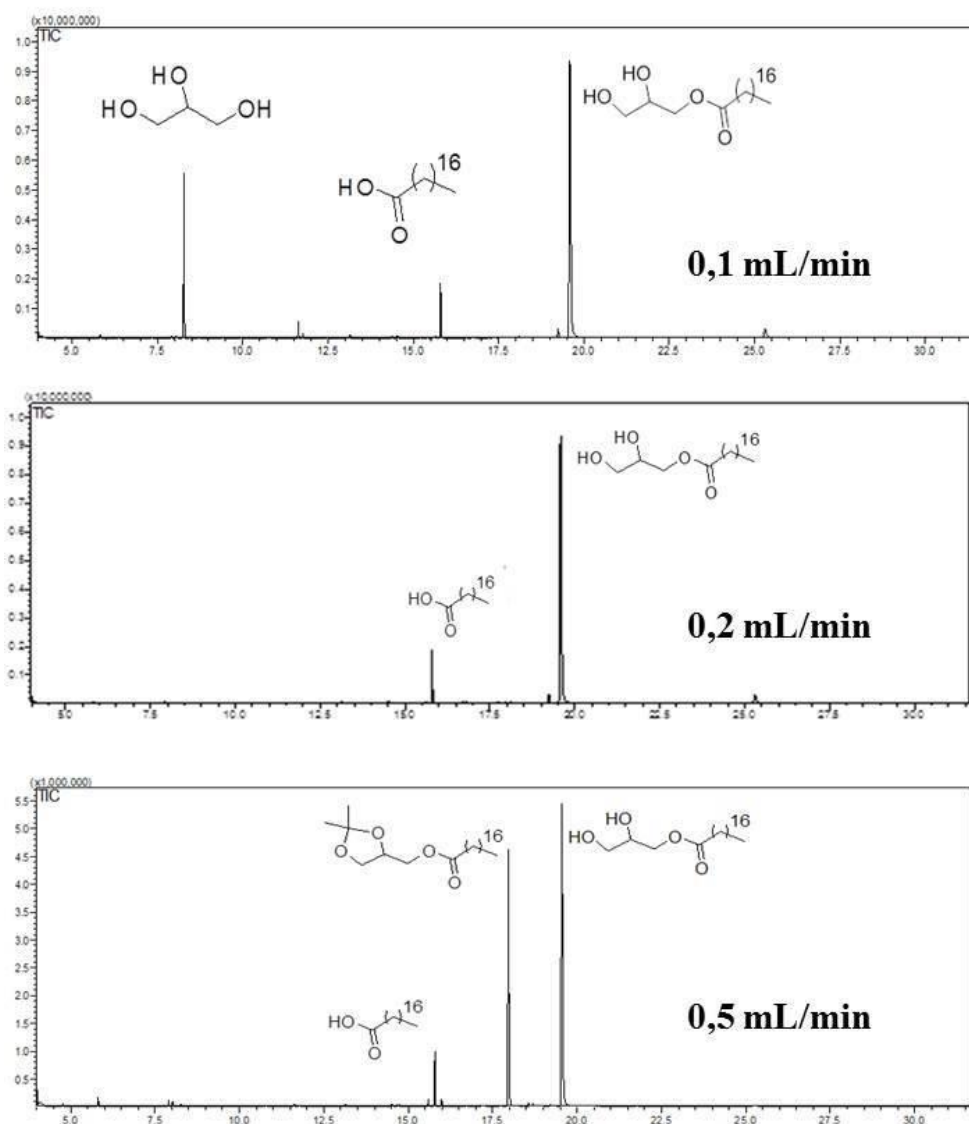


Figura 68: Cromatogramas das reações de quebra do acetal MEP em diferentes fluxos, evidenciando a seletividade para a formação dos produtos possíveis. Condições: 55°C, 2,0mol/L (n-heptano) de MAG protegido.

Coincidentemente, o melhor fluxo para esta etapa foi o de 0,2 mL/min, cuja a formação de (1) foi otimizada e bons resultados de seletividade para (2) foram obtidos, sem a formação de subprodutos. Portanto, este foi o fluxo utilizado em todo o processo interligado, que constituiu a última etapa deste estudo. Todos os reatores, contendo as quantidades estudadas de SGF e biocatalisador foram adequadamente conectados por mangueiras de silicone, e postos para aquecimento a 55°C, como mostra a figura 69.



Figura 69: Esquema da reação em cascata para a formação de monoestearato de glicerila, evidenciando o acoplamento de todas as etapas envolvidas. 1 – suspensão acetona/glicerol; 2 – coluna de leito fixo contendo SGF para a acetalização do GL; 3 – conexão para a retirada de produtos da primeira etapa; 4 – IPG e em n-heptano; 5 – coluna de leito contendo a lipase RM IM para a esterificação de IPG com AE; 6 – coluna de leito fixo contendo SGF para a quebra dos acetais do MEP; 7 – MONOEST em n-heptano, evidenciando sua precipitação após o resfriamento.

Primeiramente, todo o processo foi ensaiado na presença de acetona, que é reagente de partida na primeira etapa (acetalização do glicerol), assim como serviria como solvente nas etapas posteriores. Entretanto, pelo fato de a mesma ser um inibidor enzimático conhecido, gerou baixa produção de monoacilgliceróis. Desta forma, houve a necessidade de isolamento do produto e retirada de solvente. As duas etapas seguintes foram realizados sem isolamento do intermediário, tendo-se uma solução a 2M de reagentes de partida e um fluxo de 0,2mL/min a 55°C.

Felizmente, não houve a necessidade qualquer outra purificação do produto final ou qualquer etapa onerosa posterior de isolamento, pois a monoestearina, a baixas temperaturas, perde sua solubilidade em n-heptano, devido ao aumento drástico de hidrofobicidade na molécula como consequência da quebra dos acetais e exposição das hidroxilas. Sendo assim, o produto obtido precipita e deposita-se ao fundo do recipiente, como demonstrado na figura 70.



Figura 70: solução contendo o produto final da reação em cascata para a formação da monoestearina sob condições de fluxo contínuo. 1 - monoestearina recém-recolhida a 60°C, 2- início da precipitação do produto a 40°C; 3- decantação do produto em n-heptano.

Para a recuperação do produto, apenas uma simples filtração foi necessária, uma vez que o ácido graxo não reagido e eventuais subprodutos permanecem solúveis em n-heptano.

Toda a cascata de reação foi novamente realizada com uma amostra de Glicerol oriunda da Indústria de Biodiesel, onde o processo transcorreu da mesma forma, sendo atingido o monoacilglicerol de interesse, em rendimentos semelhantes. Da mesma forma, utilizou-se como reagente de partida o RAG como fonte de ácidos graxos, conduzindo a formação do produto correspondente (MONORES). Desta forma, este trabalho apresentou uma alternativa viável e interessante para o reaproveitamento de resíduos industriais, adicionando valor comercial aos mesmos, já que monoacilgliceróis apresentam grande importância de mercado. É interessante compararmos as mudanças de características físicas dos produtos antes e depois a etapa de abertura dos acetais (figura 71).



Figura 71: mudanças físicas observadas nos monoacilgliceróis sintetizados, antes e depois das rereações de clivagem dos acetais: 1 – MEP; 2-MRAG; 3- MONOEST; 4- MONORES.

Os monoacilgliceróis protegidos possuem característica oleosa amarelada, sendo o MONORES (2) de cor mais intensa do que o MONOEST (1), devido à presença do derivado de ácido oleico. Após a etapa de quebra do acetal, o composto MONOEST tornou-se um sólido branco, como característica física descrita por Hess et al (1995). Surpreendentemente, o composto MONORES também tornou-se um sólido branco, como resultado da reação final (figura 71).



Figura 72: Filtração a vácuo da reação final de formação do MRAG obtida através de reação em cascata sob condições de fluxo contínuo, evidenciando a mudança de coloração do produto final (MONORES), na parte superior do funil de Buchner.

Esta mudança foi evidenciada ao filtrar a vácuo o precipitado resultante, lavando o mesmo posteriormente com n-heptano, como mostra a figura 72. Isto indica que as impurezas que tornam o RAG amarelado são solúveis em heptano, sugerindo um processo de cristalização espontânea ao fim do processo.

5.4 – Análise dos Produtos de Esterificação por Espectroscopias de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Além da análise via CG-EM dos produtos obtidos na esterificação, tais como o MEP, ME, MRAG e MONORES foram analisados via Infravermelho, de modo a se confirmar as evidências demonstradas via cromatografia em fase gasosa.

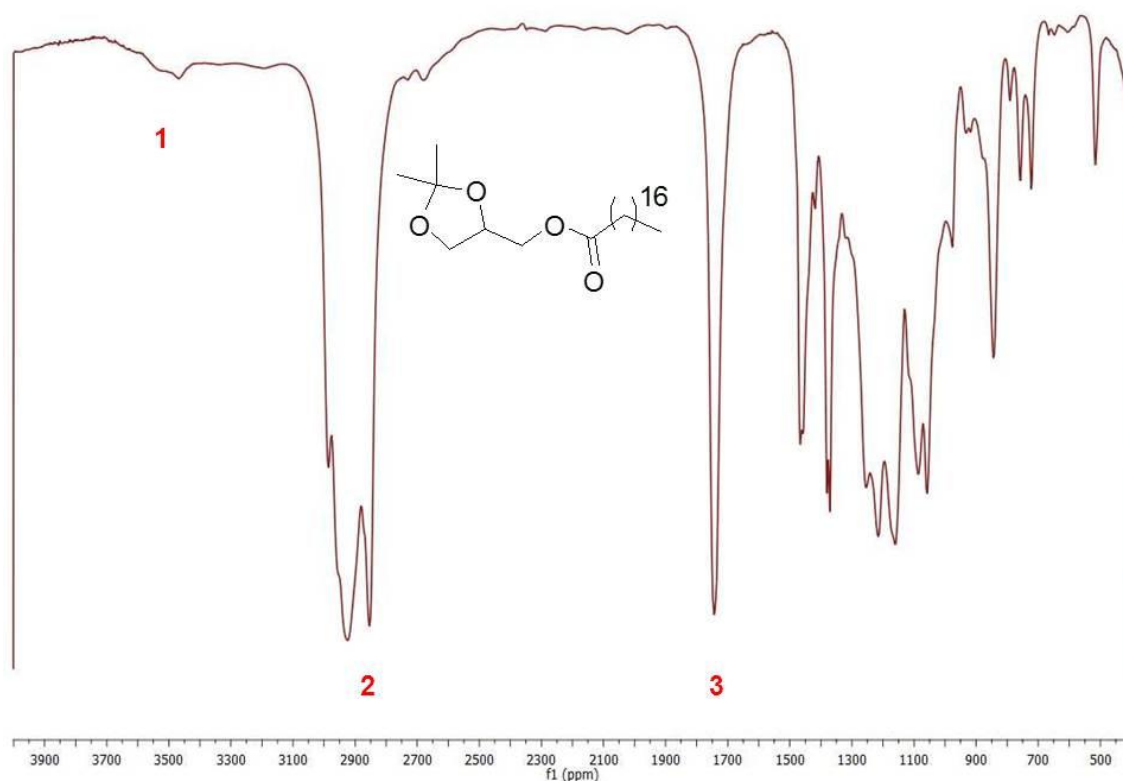


Figura 73: Espectro de infravermelho do MEP, feito sob a técnica de filme. Região 1: ausência de bandas demonstrando deformações axiais de O-H de álcool; região 2: bandas referentes a deformação axial de ligação C-H de hidrocarbonetos alifáticos; região 3: banda referente a deformação axial de ligação C=O de carbonila de éster.

Ao analisarmos a estrutura do MEP sintetizado, como descrita na figura 73, seria esperado encontrar em um espectro de infravermelho, bandas características das frequências de vibração das deformações axiais de ligações C-H, referentes a cadeia alifática proveniente do ácido esteárico, além daquelas provenientes das ligações C=O, de carbonila de éster. Deformações axiais de ligações O-H, referentes às hidroxilas provenientes de glicerol não devem estar presentes, já que se trata de um éster com hidroxilas protegidas. No referido espectro, a região 1, localizada entre 3300 e 35000 cm⁻¹ demonstra que não há a presença de bandas com intensidade significativa. Tal região é característica da deformação axial de

ligações O-H de álcoois, demonstrando, neste caso, a ausência de hidroxilas livres no éster em questão, levando a indícios de que o produto formado está, de fato, protegido por um acetal. A região 2 denota intensas bandas entre 2870 e 3050 cm^{-1} , características de vibrações axiais de ligações C-H de alcanos ou alcenos alifáticos, como a cadeia carbônica do ácido esteárico. Além da região 1, anteriormente explicada, uma outra informação importante demonstrada na figura 52 provém da região 3, onde uma intensa banda em 1731 cm^{-1} é denotada, referente a deformação axial da ligação C=O, típico de carbonilas de éster, como esperado para o produto formado.

Após o processo de clivagem dos acetais, além das bandas referentes a carbonila de éster, e de hidrocarbonetos alifáticos, espera-se o aparecimento de intensa banda na região 1 do espectro de infravermelho, mais precisamente, entre 3250 e 3350 cm^{-1} , como consequência da presença de grupamentos hidroxila, presentes na molécula de monoestearina, como demonstrado na figura 73.

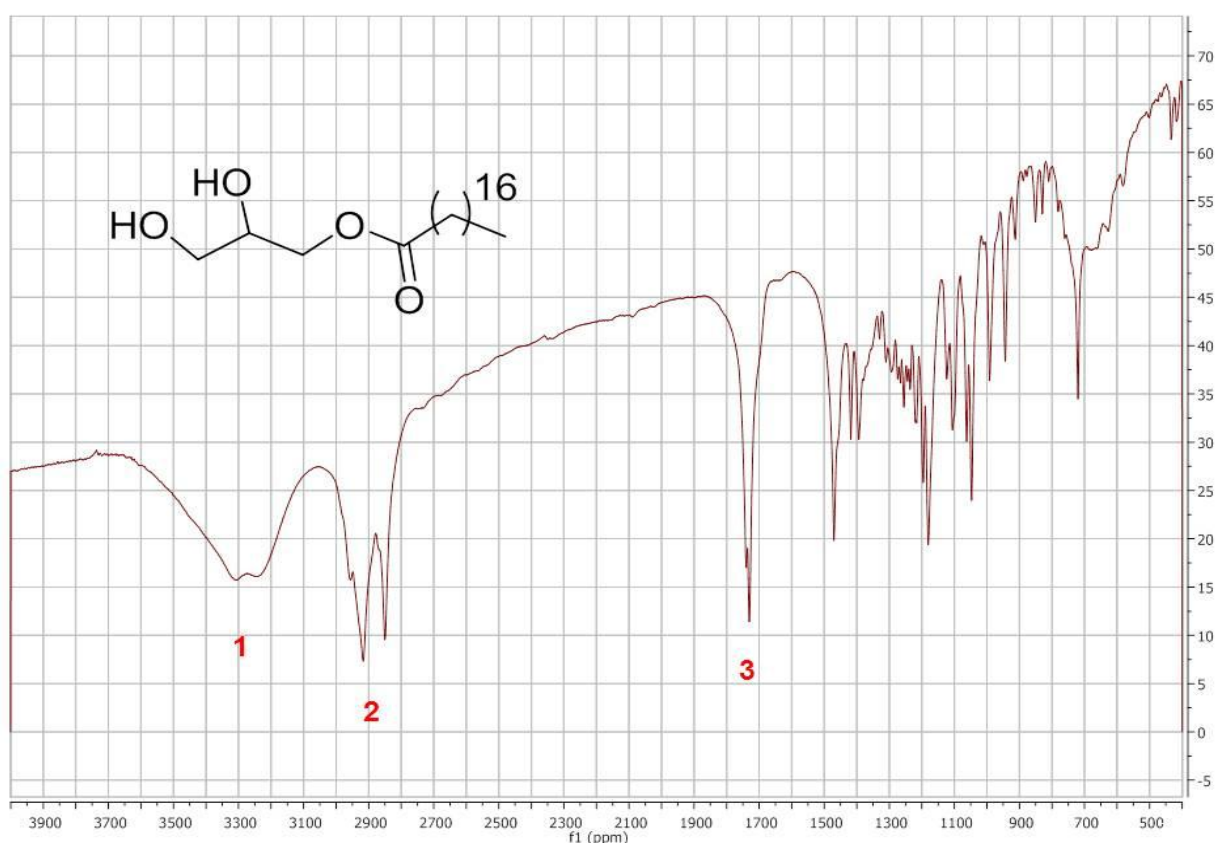


Figura 74: Espectro de infravermelho da ME, feito sob a técnica de filme. Região 1: bandas referentes a deformação axial da ligação O-H de álcool; região 2: bandas referentes a deformação axial de ligação C-H de hidrocarbonetos alifáticos; região 3: banda referente a deformação axial de ligação C=O de carbonila de éster.

Pelo fato de a molécula final (ME) apresentar dois grupamentos hidroxila, a banda proveniente da deformação axial da ligação O-H torna-se intensa (região 1, figura 74), reduzindo a resolução dos outros picos. O alargamento desta banda é consequência das ligações hidrogênio proporcionadas por estes grupamentos. As regiões 2 e 3 deste espectro foram mantidas, nos mesmos números de onda daquelas demonstradas na figura 73, indicando que o processo realizado para a quebra de acetal não causou modificações estruturais secundárias na molécula final de interesse.

Ao compararmos o espectro de infravermelho da ME produzida, com um espectro presente na literatura (figura 75), podemos observar que o mesmo perfil, assim como as regiões, e bandas, em números de onda semelhantes, foram obtidos, levando a indícios de que o produto sintetizado, é de fato, a α -monoestearina, um 1-MAG.

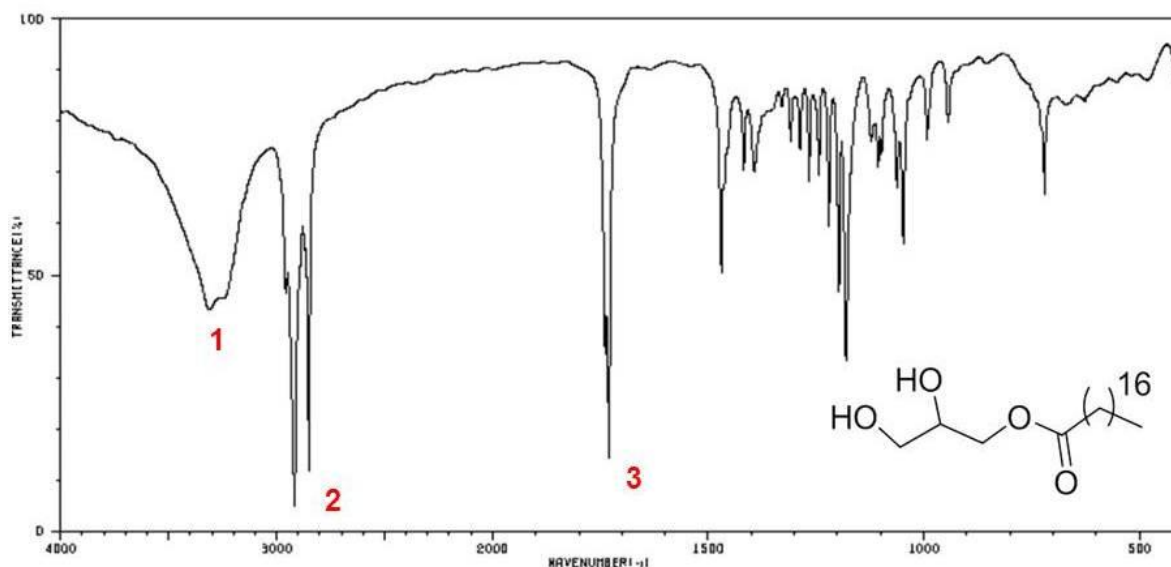


Figura 75: Espectro de infravermelho da α -monoestearina, produzido em pastilha de KBr. Região 1: bandas referentes a deformação axial da ligação O-H de álcool; região 2: bandas referentes a deformação axial de ligação C-H de hidrocarbonetos alifáticos; região 3: banda referente a deformação axial de ligação C=O de carbonila de éster. Fonte: SBDS - [http://riodb01.lbase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct frame top.cgi](http://riodb01.lbase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi).

Os produtos de esterificação obtidos com o RAG também foram analisados via espectroscopia de infravermelho (figuras 76 e 77).

A figura 76 demonstra a espectro de infravermelho do produto MRAG, constituindo-se de uma mistura de ésteres, provenientes dos ácidos esteárico, palmítico e oleico, presentes no RAG, como IPG.

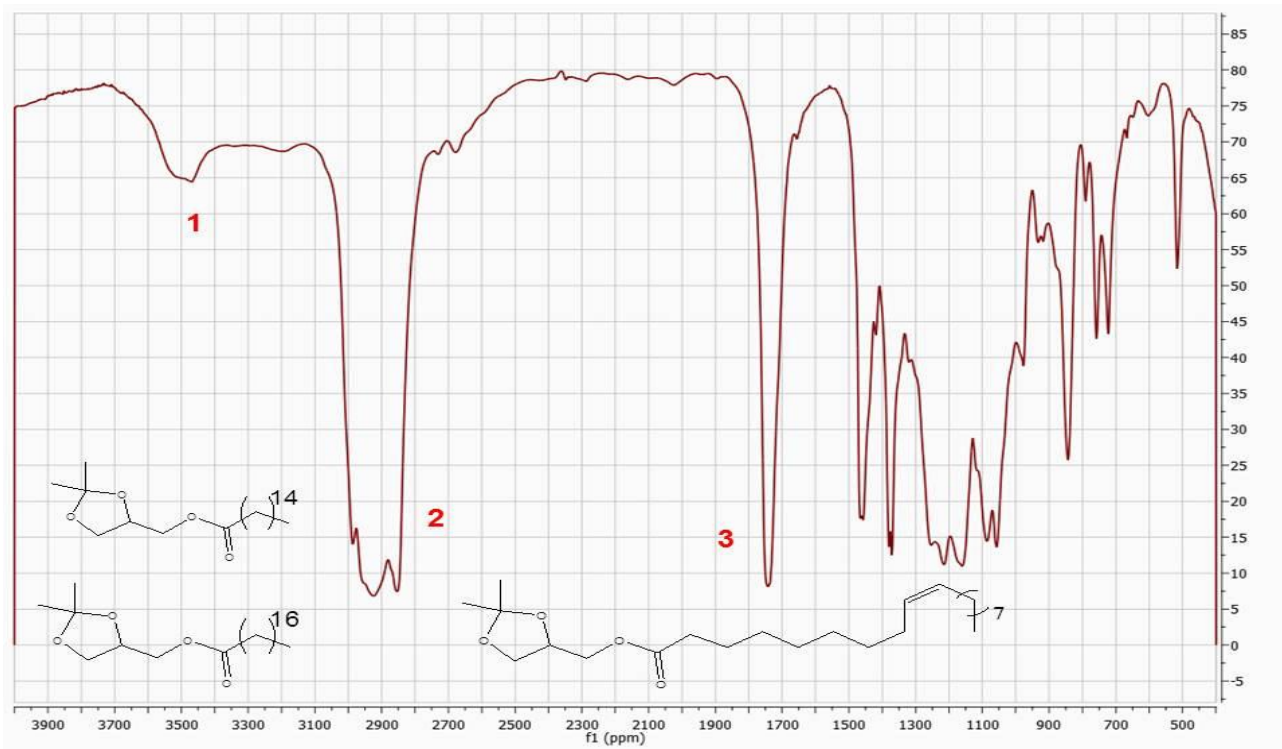


Figura 76: Espectro de infravermelho do produto MRAG. Região 1: pequena banda referente a deformação axial da ligação O-H de ácido carboxílico; região 2: bandas referentes a deformação axial de ligação C-H de hidrocarbonetos alifáticos; região 3: banda referente a deformação axial de ligação C=O de carbonila de éster.

Semelhantemente à figura 73, o espectro de infravermelho do MRAG apresenta bandas intensas nas regiões 2 e 3, referentes as frequências de vibração das deformações axiais de ligação C-H de cadeia hidrocarbônica alifática ($2850-3000\text{ cm}^{-1}$), e a ligação C=O de carbonila de éster (1730 cm^{-1}), respectivamente. Na região 1, diferentemente do esperado, encontra-se uma pequena banda em 350 cm^{-1} , o que pode ser resultado de impurezas no produto, como resquícios de ácidos graxos não-reagidos, já que as conversões encontradas para a síntese de MRAG foram sutilmente inferiores às encontradas para a síntese de MEP. A presença destes contaminantes gera uma banda nesta região, referentes à deformação axial de ligação O-H de ácido carboxílico. Entretanto, por estarem presentes em baixas concentrações, não é visível no presente espectro, uma banda referente à deformação axial de ligação C=O de carbonila de ácido carboxílico, já que esta apresenta número de onda típico em 1750 cm^{-1} , faixa próxima à demonstrada pela carbonila de éster.

Após a quebra do acetal, realizada para MRAG, o produto final MONORES demonstrou um espectro de infravermelho típico de monoacilgliceróis (figura 77), entretanto, por tratar de uma mistura de monoacilgliceróis, este apresenta características mistas aos espectros de infravermelho da monopalmitina (figura 79), monoestearina e monooleína (figura 78).

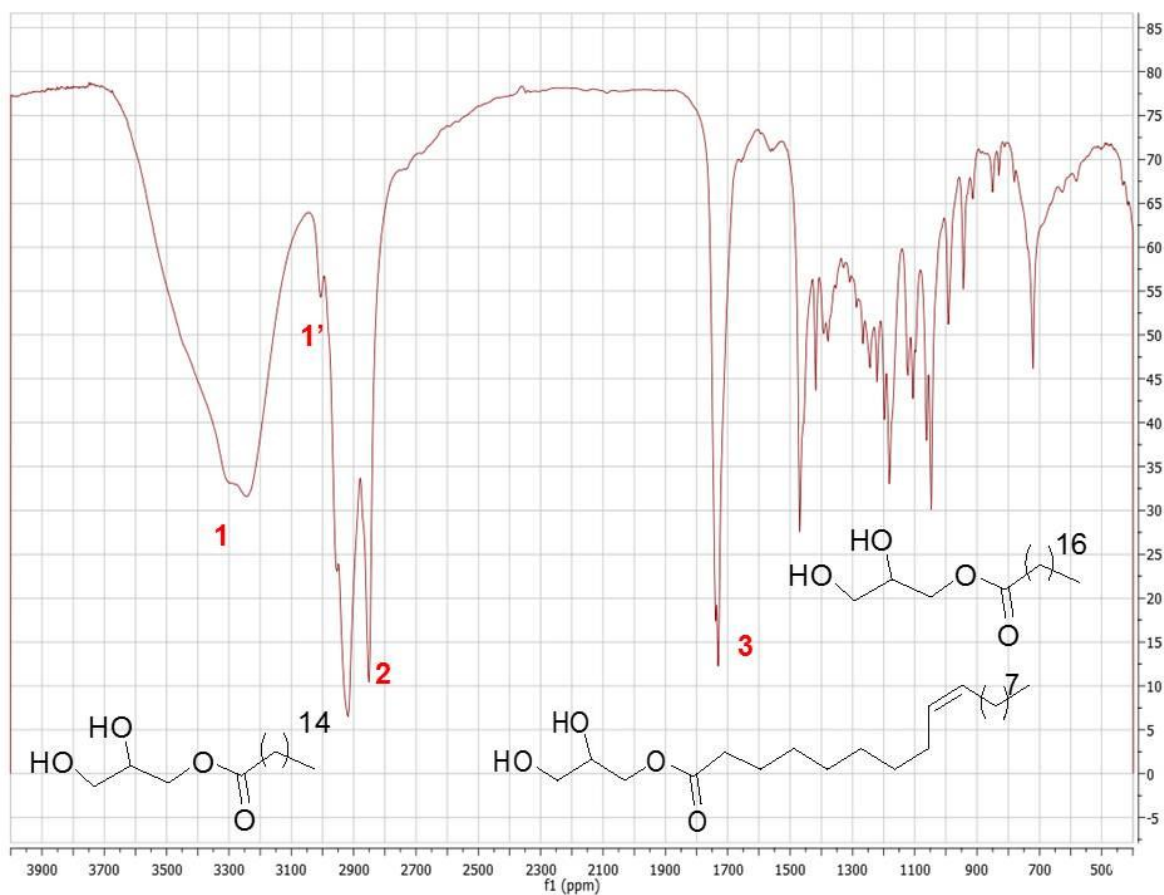


Figura 77: Espectro de infravermelho do produto MONORES. Região 1: banda referente a deformação axial da ligação O-H de álcool; região 2: bandas referentes a deformação axial de ligação C-H de hidrocarbonetos alifáticos; região 3: banda referente a deformação axial de ligação C=O de carbonila de éster.

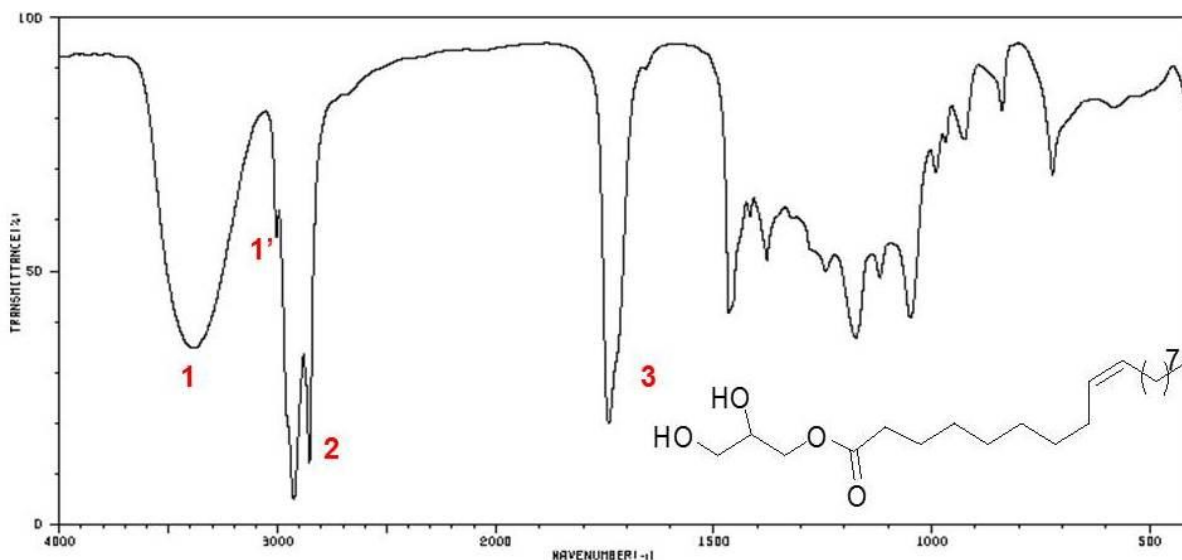


Figura 78: Espectro de infravermelho da monooleína, feito em pastilha de KBr. Região 1: banda referente a deformação axial da ligação O-H de álcool; região 2: bandas referentes a deformação axial de ligação C-H de hidrocarbonetos alifáticos; região 3: banda referente a deformação axial de ligação C=O de carbonila de éster. Fonte: SBDS - http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

Além das bandas referentes às deformações axiais características de grupamentos carbonila de éster, hidroxila e hidrocarbonetos alifáticos, o espectro da monooleína apresenta, na região 1' (figura 77), referente a deformação angular de ligação C=C, de hidrocarbonetos insaturados, como o caso da cadeia carbônica do ácido oleico, presente no RAG, e conseqüentemente, pôde ser notada no espectro do MONORES.

O formato e a intensidade da banda 1 do espectro de infravermelho do MONORES (figura 77) se assemelha à demonstrada na figura 79, para a monopalmitina.

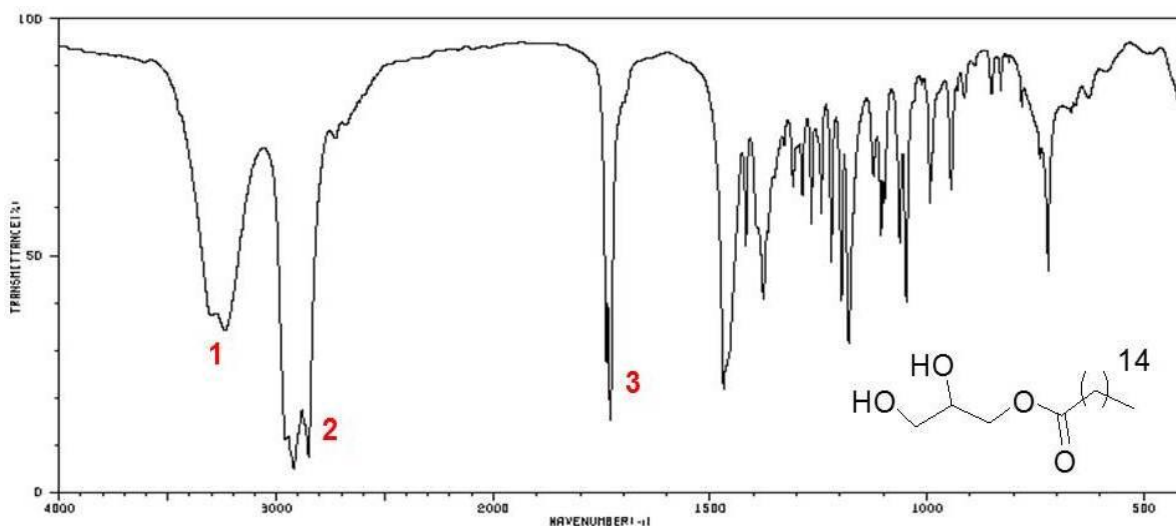


Figura 79: Espectro de infravermelho da monopalmitina, feito em pastilha de KBr. Região 1: banda referente a deformação axial da ligação O-H de álcool; região 2: bandas referentes a deformação axial de ligação C-H de hidrocarbonetos alifáticos; região 3: banda referente a deformação axial de ligação C=O de carbonila de éster. Fonte: SBDS - http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

A MEP também foi analisada por C13-RMN, além de 1H-RMN, demonstrando sinais característicos de MAGs. Além disto, os espectros obtidos pelos RMNs bidimensionais confirmam a formação dos produtos em questão, indicando que não houve migração para 2-MAG. Tais espectros encontram-se anexados no apêndice B deste trabalho.

CAPÍTULO 6

Resultados e Discussão

PARTE 3: Biocatálise em Sistemas Microemulsionados – Micelas Reversas e Organogel

4.1 – Considerações Iniciais:

Neste capítulo, serão abordados os resultados atingidos para a obtenção de MEP, assim como de MRAG, através de esterificação do AE e RAG com o IPG, catalisados por lipases estruturadas em microemulsões O/A denominadas micelas reversas, assim como suas imobilizações em matrizes gelificadas, conhecidas como organogel, técnica esta que permitiu a aplicação destes suportes em etapa de flux contínuo.

Esta parte do trabalho foi realizada no *Institute of Biology Medicinal Chemistry and Biotechnology - The National Hellenic Research Foundation*, localizado em Atenas, Grécia, sob a orientação do Doutor Aristóteles Xenakis, e colaboração com a Doutora Maria Zoumpantioti.

4.2 – Escolha do Melhor Sistema Microemulsionado

Esta etapa teve como principal objetivo, a escolha da melhor microemulsão capaz de gerar os maiores resultados para a conversão de MEP. Tendo-se em vista a variedade de dados na literatura acerca de reações utilizando enzimas em micelas reversas, pode ser notado que os dois tipos principais de sistemas microemulsionados se destacam: O sistema em AOT/Isooctano, além daquele formado por Lecitina em isopropanol (Zoumpantioti et al, 2010; Papadimitriou et al, 2011; Reis et al, 2012; Margulis-Goshen & Magdassi, 2012; Hayes et al, 2013). Dentre as lipases aplicadas com sucesso para reações de esterificação, destacam-se aquelas do gênero *Cândida*, representado pelas espécies *Cândida cylindracea*, *C.*

antarctica, *C. rugosa*; além daquelas do gênero *Rhizomucor*, onde as lipases de *R. miehei* e *R. javanicus* foram estudadas, além de enzimas de espécies dos gêneros *Rhizopus*, e *Pseudomonas* (Naoe et al, 2004; Moniruzzaman et al, 2006; Dandavate et al, 2009; Rodrigues & Fernandez-Lafuente, 2010; Fragoso, Pacheco e Karmali, 2012; Bernardo et al, 2013; Garcia-Galan et al, 2013; Xue et al, 2013). Pelo fato de as lipases de *Cândida antarctica* e *Rhizomucor miehei* terem sido aplicadas nas etapas passadas, resolvemos investigar o potencial destas enzimas em micelas reversas. Neste tipo de sistema, é de grande importância a utilização de enzimas livres em suas formas liofilizadas, para que a quantidade de água seja precisamente calculada. Por este motivo, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* não foi investigada neste estudo, já que esta é somente encontrada, quando em sua forma livre, dissolvida em solução com detergentes e estabilizantes, ou complexada com glutaraldeído.

Seguindo os trabalhos anteriores de nosso grupo de colaboração (Papadimitriou, 1995; Zoumpantioti et al, 2006; Michaux et al, 2010), decidimos selecionar a microemulsão ideal, inicialmente a 40°C, temperatura nas quais as lipases aplicadas nestes sistemas apresentaram os melhores resultados anteriormente. Para tal, foram preparados sistemas reacionais em AOT/Isooctano, além daqueles em Lecitina/isopropanol (figura 80), como explicado na seção experimental, tanto para as lipases de *Cândida antarctica* B (CaL) e *Rhizomucor miehei* (RM). As razões molares entre AE, e IPG foram mantidas (1:1 – 100mM). Para comparação de eficiência enzimática, as mesmas reações foram também realizados usando as lipases imobilizadas comerciais, em isooctano (figura 80). Neste caso, a quantidade de suporte (1% w / v), bem como os tempos de reação foram baseadas nos nossos estudos discutidos nos capítulos anteriores.

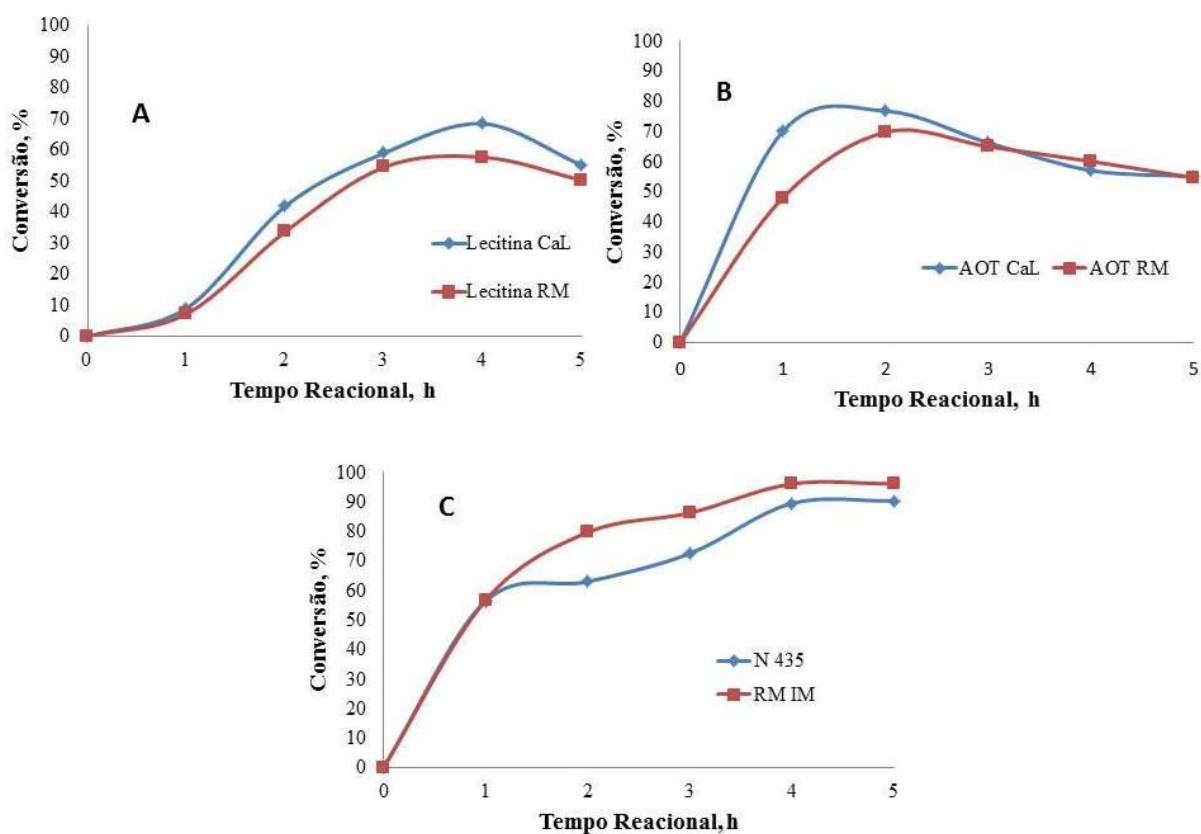


Figura 80: Rastreamento inicial da melhor microemulsão para a síntese de MEP. A) Microemulsões em Lecitina; B) Microemulsões em AOT; C) reação com enzimas imobilizadas. condições: 0,9mg de lipase; AE e IPG 1:1 (100mm), 40°C.

A figura 80 mostra que as reações de formação de MEP nos sistemas microemulsionados ocorreram em tempos inferiores do que aqueles em sistemas heterogêneos, envolvendo enzimas imobilizadas, tanto aquelas em isooctano, quanto as em heptano, como descrito no capítulo 4. Dentre estes, destaca-se o sistema em AOT/Isooctano, onde, em apenas duas horas, as maiores conversões foram obtidas, para ambas as enzimas, sendo 77% de conversão para a enzima CaL B, e 68% para a lipase RM. Nos sistemas em Lecitina, três horas foram necessárias para que as reações atingissem seus equilíbrios, e ainda, demonstrando menores conversões do que os sistemas anteriormente citados. É importante ressaltar que estes resultados foram obtidos com apenas 0,9mg de lipase (provenientes de adição de 30µL de uma solução a 30mg/mL de lipase em 970 µL de solução de AOT/isooctano ou lecitina/isopropanol, ambas contendo os substratos), quantidade bastante inferior às utilizadas nas etapas anteriores, envolvendo enzimas imobilizadas. Tais diferenças pode ser melhor entendidas ao compararmos as produtividades geradas por estes sistemas, na figura 81:

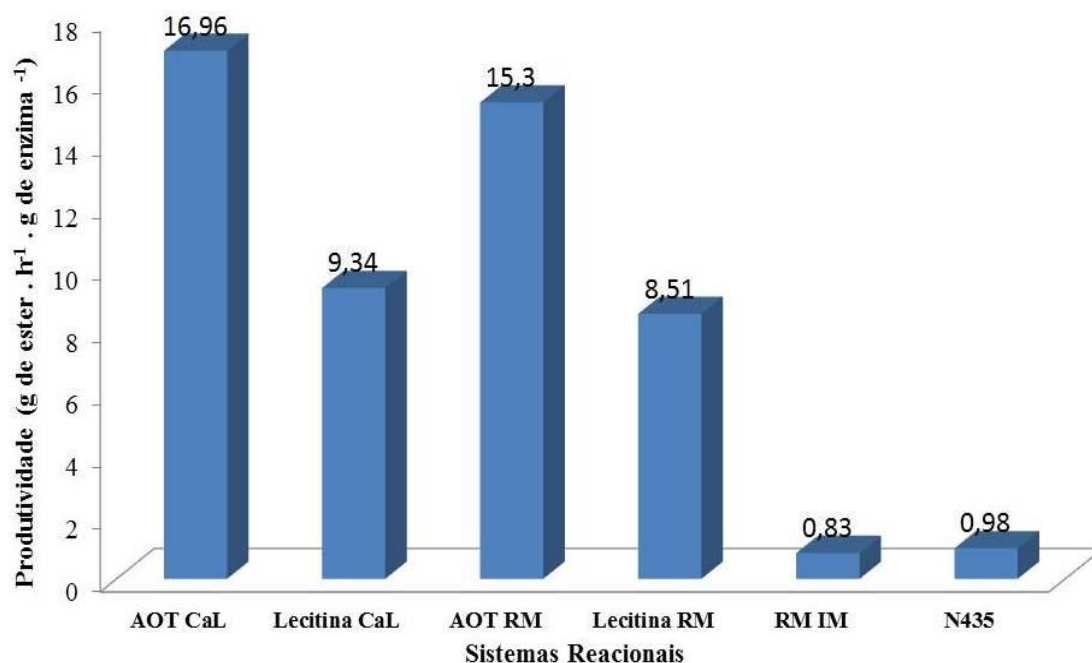


Figura 81: Produtividade gerada pelos sistemas reacionais estudados. Condições: 40°C, AE e IPG 1:1 (100mM), 0,9mg de enzima nas microemulsões e 1% p/v de suporte com as enzimas imobilizadas.

Como pôde ser observado, as microemulsões em AOT foram aquelas que expressaram maiores produtividades (figura 81), seguido dos sistemas em lecitina, sendo os sistemas heterogêneos, aqueles que demonstraram valores inferiores. Dentre os sistemas em AOT analisados, aquele com a enzima CaL B, demonstrou uma produtividade de quase 17g de éster .h⁻¹.g de enzima⁻¹, valor praticamente 17 vezes maior do que o apresentado pela mesma enzima imobilizada (N435), demonstrando que esta microemulsão pode ser um sistema eficiente para a produção do éster em questão. Embora as enzima imobilizadas tenham apresentado maiores conversões finais, a quantidade de enzima aplicada foi muito mais elevada (50 mg), demonstrando que o sistema AOT/Isooctano levou a uma otimização do uso de biocatalisador, além da redução do tempo reacional. Portanto, a microemulsão AOT CaL foi selecionada para os estudos posteriores.

A fim de se investigar o melhor tempo reacional para a formação de MEP catalisada pelo sistema AOT CaL, os valores de conversão foram investigados em tempos reacionais menores, como mostra a figura 81:

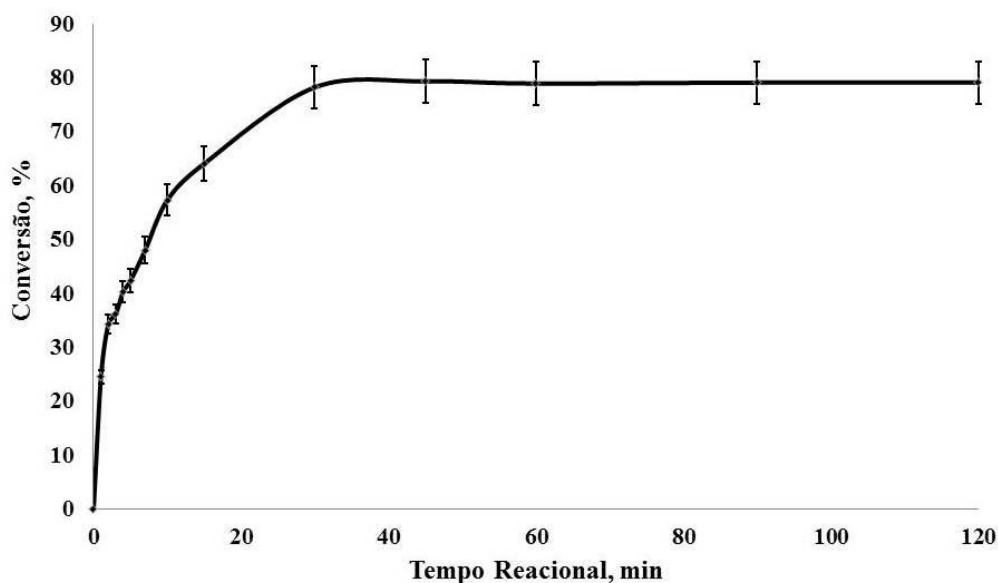


Figura 82: Perfil reacional da microemulsão AOT CaL. Condições: AOT/Iso-octano 0,1M, contendo AE:IPG 1:1 (100mM), 40°C, 0,9mg de lipase CaL B.

Interessantemente, a reação de formação de MEP em AOT CaL praticamente atinge seu equilíbrio em apenas 30 minutos (figura 82), onde 79% de conversão são observados. Para a reação catalisada por Cal B em microemulsões de lecitina, a conversão encontrada foi muito inferior, ou seja, 42% após 2 horas de reação, confirmando-se que o sistema AOT CaL é, de fato, mais eficiente. Tais resultados encontrados são interessantes, pois alguns trabalhos previamente publicados na literatura demonstram que as microemulsões em lecitina, geralmente oferecem melhores conversões do que aquelas onde o AOT é utilizado como surfactante (Nagayama et al, 1998; de Maria et al, 2004). Além disto, efeitos deletérios do surfactante AOT também já foram publicados anteriormente, para as lipases de *Cândida rugosa* e *Rhizomucor miehei* (del Val & Otero, 1998; Delimitsou et al, 2002), o que poderia explicar os resultados inferiores encontrados para as microemulsões contendo a última enzima citada. A reação de formação do butirato de butila, catalisada pela lipase RM em sistema AOT/isooctano foi estudada por Borzeix et al (1992), e citado por Biasuti et al, 2008. Neste trabalho, a atividade de esterificação da enzima foi cerca de duas vezes menor do que a analisada em sistema bifásico, tendo-se hexano como solvente. Como explicação para este resultado, os autores atribuem a interação da enzima com o surfactante AOT, limitando a transferência do éster para a fase orgânica. Tal efeito pode ter ocorrido com a nossa reação de estudo, já que o sistema utilizado foi o mesmo. Além disso, deve ser considerado que o comportamento de cada enzima depende do surfactante empregado no sistema de microemulsão de estudo. Por exemplo, um trabalho publicado por Abuin et al (2007)

demonstrou que a fosfatase ácida de gérmen de trigo também apresenta menor atividade em sistemas AOT/isooctano, sendo mais ativa em solução aquosa. Indo além, foi-se demonstrado que esta enzima apresentou superatividade em sistemas de microemulsões contendo lecitina como surfactante.

5.3 – Estudos do Efeito da Temperatura

Visando melhorar as conversões apresentadas pelo sistema em AOT/Isooctano contendo a lipase CaL B na síntese do MEP, o efeito de temperatura nas conversões finais foi também estudado. Portanto, temperaturas variando de 35 °C – 60°C foram também investigadas (figura 83). Como a reação neste sistema se completou em apenas 60 minutos, as temperaturas foram investigadas também neste tempo reacional.

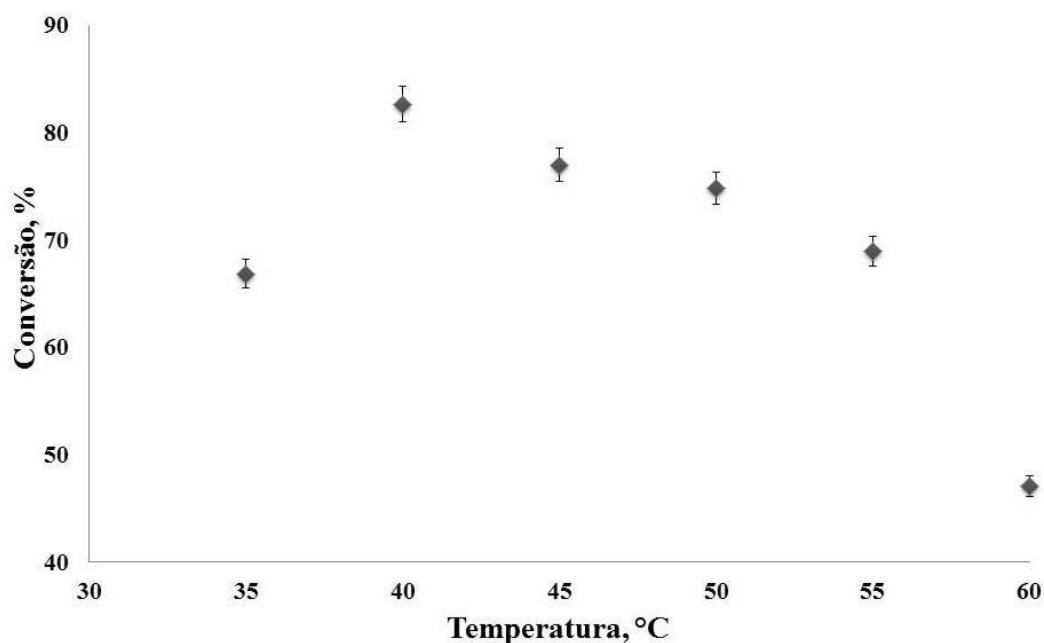


Figura 83: Efeito da Temperatura na conversão demonstrada pela microemulsão AOT/Iso-octano contendo a lipase CaL B para a formação de MEP. Condições: AOT/Iso-octano 1:1 (100mM), 0.9mg de lipase.

Como demonstrado na figura 83, as melhores conversões, foram, de fato, encontradas a 40°C. Em comparação com os sistemas estudados nos capítulos anteriores deste trabalho, envolvendo lipases imobilizadas, as temperaturas ótimas de reação foram em torno de 60°C. Portanto, a microemulsão AOT CaL demonstrou um melhor desempenho, uma vez que altas conversões foram encontradas em temperaturas mais brandas, além de tempos inferiores de reação.

5.4 – Efeito da Quantidade de Água

A fim de se encontrar uma quantidade de água ideal para o sistema, de modo a ancorar de forma mais eficiente o sítio catalítico da enzima, e ao mesmo tempo, não proporcionar hidrólise do produto formado, o efeito de diversos W_0 , variando de 5 a 20, foi estudado, a 40°C , já que esta foi a melhor temperatura encontrada neste sistema.

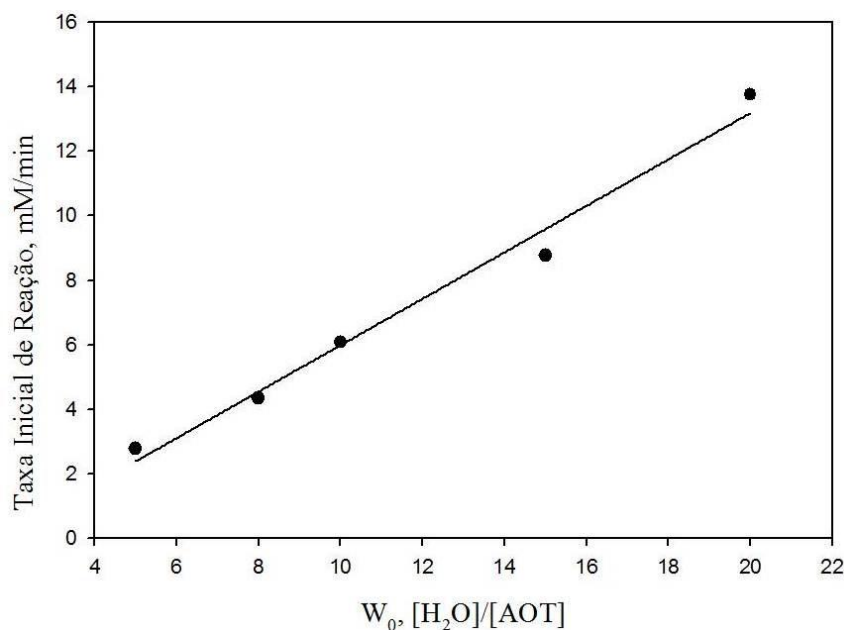


Figura 84: Efeito da Quantidade de água nas taxas iniciais de reação para a formação de MEP catalisada pela enzima CaL B estruturada em microemulsão AOT/Iso-octano. Condições: AOT/Iso-octano 1:1 (100mM), 0.9mg de lipase, 40°C

Como pôde ser observado, aumentos na quantidade de água (W_0), proporcionaram aumentos lineares nas velocidades de reação. Tal resultado é exatamente o oposto ao encontrado em estudos anteriormente realizados acerca da investigação do efeito da quantidade de água em reações de esterificação catalisadas por lipases em microemulsões em AOT, onde geralmente são obtidos gráficos sinodais, como no trabalho publicado por Stamatis, Xenakis e Kolisis, 1999.

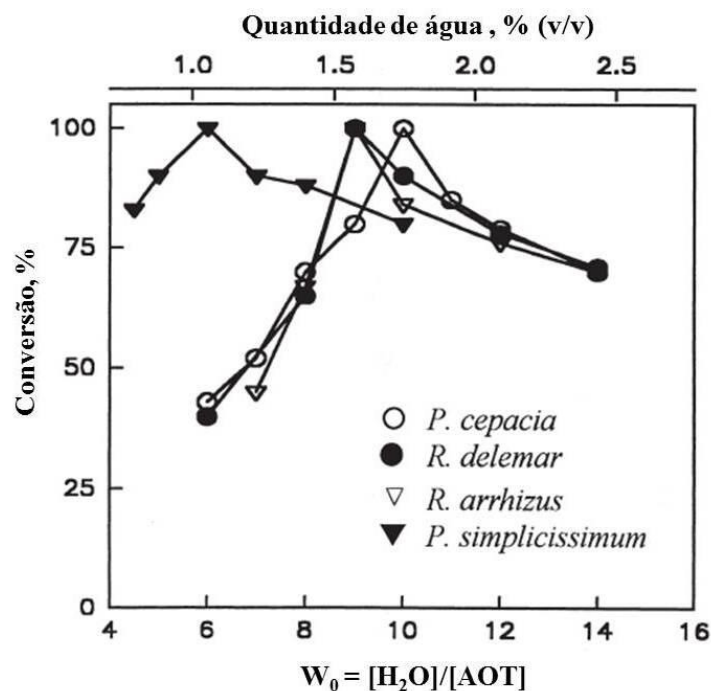


Figura 85: Efeito da quantidade de água (W_0) na conversão apresentada por diversas enzimas na esterificação do n-hexanol com o ácido oleico em sistemas AOT/Iso-octano. Adaptado de Stamatis, Xenakis e Kolisis, 1999.

Nesta revisão, demonstrou-se, como observada na figura 85, adaptada desta obra, que aumentos na quantidade de água na microemulsão em AOT/isooctano aumentam significativamente as conversões de oleato de hexila, até certo limite, onde valores de W_0 são em torno de 10, diferentemente dos resultados encontrados para o sistema de nosso trabalho, onde as maiores conversões foram encontradas em $W_0 = 20$.

Este aumento linear pode parecer uma contradição às teorias de difusão de substratos convencionais, como explicadas por Holmberg, (1994), que predizem que quaisquer alterações na atividade da enzima em relação ao aumento da quantidade de água são devidas a uma restrição em termos de acessibilidade do substrato, onde o excesso de água induz uma barreira adicional a difusão do substrato. No presente estudo, uma explicação plausível seria que o éster produzido na reação é mais hidrofóbico do que os substratos, necessitando, desta forma, de uma maior força motriz para a difusão na fase aquosa, que foi aumentada. Resultados semelhantes já foram descritos para síntese do piruvato através do fosfoenolpiruvato e ADP, catalisada pela enzima piruvato cinase em microemulsões de CTAB, na presença de K^+ , um ativador clássico da enzima (Ramirez et al, 1993). Este comportamento similar foi atribuído a superativação da enzima na presença da microemulsão.

5.5 - Efeito da concentração da Lipase CaL B na microemulsão AOT Isooctano

Após a escolha das melhores condições de temperatura e quantidade de água para a formação de MEP catalisada pela lipase CaL B em microemulsão AOT/Isooctano (40° C e $W_0 = 20$, respectivamente), o efeito da concentração da lipase na velocidade inicial de reação foi estudada (figura 86).

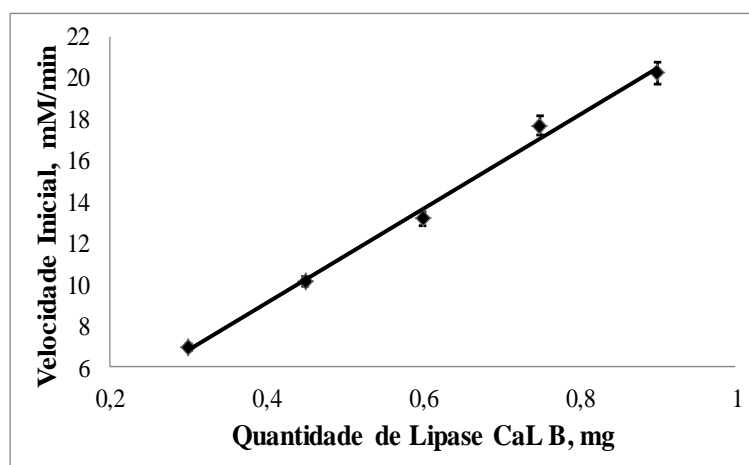


Figura 86: Efeito da quantidade de enzima na velocidade inicial de formação de MEP, catalisada pela lipase CaL B em microemulsão AOT/Iso-octano, a 40°C, com AE e IPG1 1:1 (100mM).

A figura 86 mostra o efeito da variação da concentração de CaL B, calculado em termos de mg de lipase na microemulsão, na taxa de esterificação do IPG com o AE nos sistemas em AOT. Pode ser observada uma relação linear entre o aumento da quantidade de lipase e as velocidades iniciais de reação. Esta linearidade observada em todas as condições estudadas é consistente com uma reação enzimática controlada cineticamente.

5.6 – Estudos Cinéticos e Mecanismo de Esterificação para a Lipase CaL B na Microemulsão AOT/Isooctano

A fim de se investigar a influência da concentração de substrato na velocidade de reação de esterificação do IPG com o AE, diferentes concentrações de AE (25-120mM) foram testadas em variadas concentrações de IPG (40, 60, 80, 100, 150mM). As velocidades iniciais foram calculadas, assumindo a ausência de quantidades significativas de produtos (Figura 87).

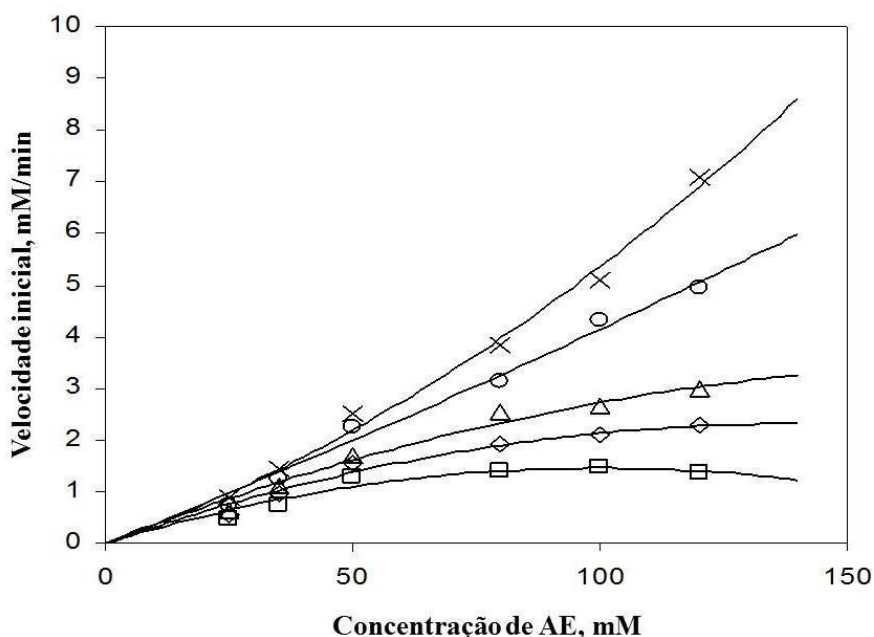


Figura 87: Efeito da concentração de AE na velocidade inicial de reação de esterificação do AE com o IPG em microemulsões AOT/Iso-octano. Concentrações de IPG: 40 mM (□); 60 mM (◇); 80 mM (Δ); 100 mM (○); 150 mM (×).

A figura 87 mostra como a velocidade inicial da reação de esterificação varia em função da concentração do ácido. Em baixas concentrações de álcool, o padrão cinético clássico é seguido, com a velocidade inicial aumentando-se até atingir um *plateau*, a qual depende da concentração fixa de álcool. No entanto, quando as concentrações de IPG são elevadas, um efeito negativo é pronunciado, o que significa que a ligação do primeiro substrato reduz a afinidade da enzima para a ligação do segundo substrato. Este comportamento pode ser atribuído a alguns elementos estruturais específicos que a lipase de *C. antarctica* possui, publicados em trabalhos clássicos da literatura: De acordo com dados de cristalografia de Uppenberg et al (1995), o sítio ativo da referida lipase possui dois canais distintos, que durante a reação de esterificação são ocupados pelos grupamentos acila do ácido, e o álcool respectivamente. Estes canais funcionam quase em paralelo a partir do aminoácido serina do sítio ativo até a superfície da enzima, e são apenas separados por duas cadeias laterais hidrofóbicas. É esperado que um álcool e um ácido graxo de cadeia longa não encaixem-se no sítio ativo sem induzirem uma grande alteração conformacional na proteína. O efeito negativo de atividade enzimática é mais intensa para baixas concentrações do segundo substrato. A medida em que a concentração deste substrato aumenta, esta barreira tende a ser superada. Este mesmo fenômeno já foi observado também há bastante tempo, em trabalhos

de Baccanary et al (1987), para esta mesma enzima, assim como para enzimas do gênero *Sacchamormyces*.

As figuras 88a e 88b mostram os gráficos de duplos recíprocos obtidos através dos dados de velocidade inicial na variação das concentrações de álcool e ácido, respectivamente.

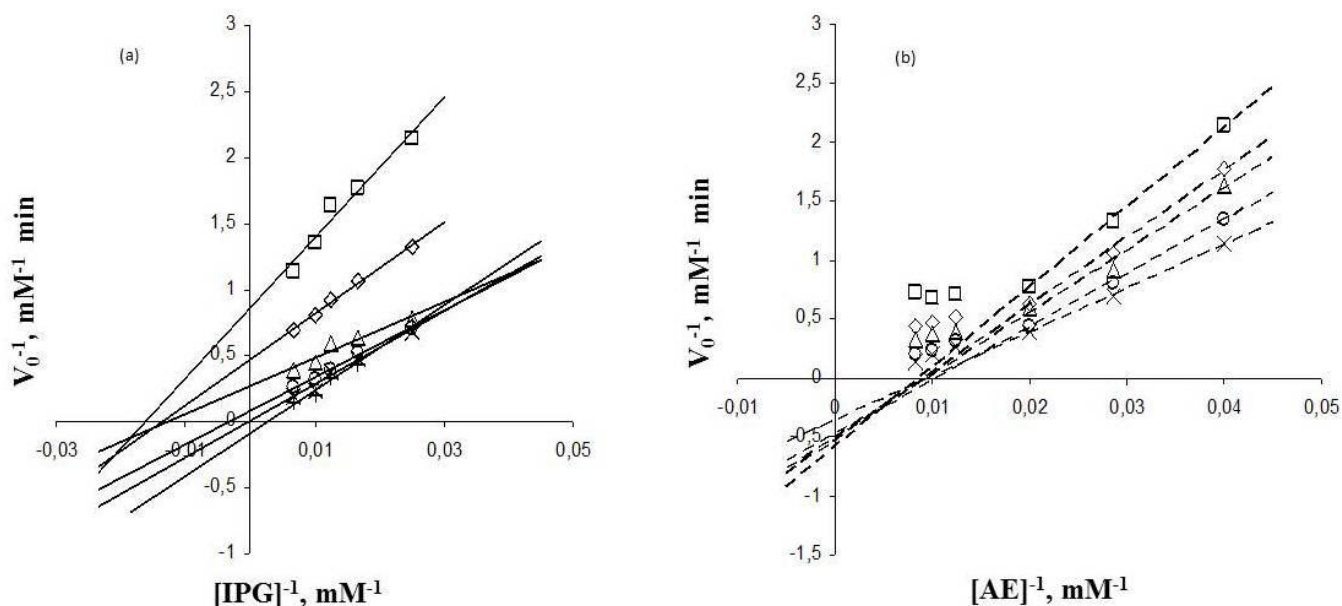


Figura 88: Gráficos de duplos recíprocos da velocidade inicial de esterificação do IPG com o AE em microemulsão em AOT: (a) em função da concentração de IPG, em diferentes concentrações fixas de AE: 25 mM (\square), 35 mM (\diamond), 50 mM (Δ), 80 mM (\circ), 100 mM (\times) e 120 mM ($+$); (b) em função da concentração de AE em diferentes concentrações fixas de IPG: 40 mM (\square); 60 mM (\diamond); 80 mM (Δ); 100 mM (\circ); 150 mM (\times). As linhas de tendência tracejadas foram desenhadas para as menores concentrações de AE.

Um conjunto de linhas estreitas não-paralelas foram obtidas, porém, que se interceptam. Além disso, pode ser observado que o aumento da concentração fixa dos substratos leva a diminuição do declive das retas. A forma específica da inclinação das linhas é influenciada pela concentração fixa do substrato, sendo indicativo de um mecanismo que requer a associação do segundo substrato para a formação do complexo enzima-substrato, antes da dissociação de qualquer produto (os pontos de adição dos dois substratos diferentes, não estão separadas por uma ou mais etapas irreversíveis). Assim, um mecanismo do tipo Bi-bi Ordenado é revelado nesta reação. A forma em curva nas concentrações mais elevadas de AE indica uma inibição pelo substrato. Como pode ser visto a partir da figura 88a, para baixas concentrações de ácido (25, 35 e 50 mM), as linhas se cruzam abaixo do eixo horizontal. Para concentrações mais elevadas, as linhas não se cruzam no mesmo ponto. Isto sugere que tanto a inclinação quanto as interceptações são afetadas em uma inibição não competitiva. Esta inibição é mais forte em baixas concentrações de álcool, como pode ser visto a partir da

forma da curva de 40 mM de álcool (figura 88b) e pode ser desprezada em concentrações elevadas de IPG (a forma das curvas é alterada). As curvas mostradas pelos gráficos de duplos recíprocos demonstram um mecanismo de esterificação bi-bi ordenado, com uma inibição pelo ácido. Trabalhos realizados por Fonseca (2006) também revelaram este tipo de mecanismo para a enzima chiquimato desidrogenase de *Mycobacterium tuberculosis*, demonstrando não ser um resultado inédito na literatura, mas sim, para a enzima CaL B. Deve-se enfatizar que as linhas de tendência apresentadas na figura 88b foram construídas levando-se em conta as menores concentrações (não-inibidoras) de AE, e não levam em conta os pontos relativos às concentrações superiores (inibidoras) do ácido. De acordo com a sequência típica de reações descritas por um mecanismo de esterificação bi-bi ordenado (figura 89), com uma inibição pelo ácido, tem-se que a lipase (E) liga-se ao álcool (A), neste caso, o IPG, para gerar EA, ou pode reagir com o ácido, neste caso, o AE (B) para produzir um complexo inativo, denominado “*Dead-end*” (EB). A sequência de reações pode ser melhor entendida na representação abaixo (figura 89):

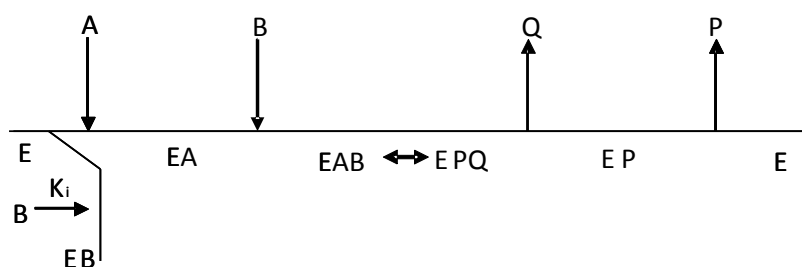


Figura 89: Representação do mecanismo de esterificação bi-bi ordenado com inibição “*dead-end*” pelo AE, na formação de MEP catalisada pela enzima CaL B em microemulsão AOT

onde A é IPG; B é o AE; EA é complexo enzima-álcool (IPG); EB é o complexo “*dead-end*” formado pelo AE-enzima; EAB é o complexo efetivo AE-IPG-enzima; Q é a água e P é o produto de esterificação (MEP).

Trata-se, portanto, de um sistema de dois reagentes ordenados (sistema bi-reagente), com dois produtos (bi-bi ordenado), onde o substrato B (no nosso caso, o AE) reage com a enzima livre para se obter um complexo EB “*dead-end*”. Na equação da velocidade especificada na seção Materiais e Métodos para sistemas bi-bi ordenados (Equação 6), os termos no denominador são correspondentes a enzimas livres, e são multiplicados por $(1 + [B] / K_i)$, onde K_i é a constante de dissociação de EB, e tornando-se a equação XII

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_{ia}K_{mB}\left(1 + \frac{[B]}{K_i}\right) + K_{mA}[B]\left(1 + \frac{[B]}{K_i}\right) + K_{mB}[A] + [A][B]}$$

Equação XII

onde v é a velocidade inicial de reação; V_{\max} é a velocidade máxima; $[A]$ são $[B]$ são as concentrações iniciais de álcool e ácido, respectivamente; K_{mA} é a constante de Michaelis para o álcool IPG; K_{mB} é a constante de Michaelis para o AE; K_i é a constante de dissociação para o EB e K_{ia} é a constante de A.

De posse dos dados obtidos nos gráficos de duplos-recíprocos disponíveis na figura 88a para as concentrações fixas de AE, duas replotagens foram construídas, utilizando o inverso do declive da linha que corresponde a cada concentração fixa do ácido. Em primeira instância, os inversos dos declives foram replotados contra o inverso das concentrações do ácido (figura 90a). O gráfico resultando gerou uma curva, a qual está de acordo com o esperado para uma inibição “*dead-end*” pelo substrato em um sistema bi-reagente ordenado (Segel, 1975).

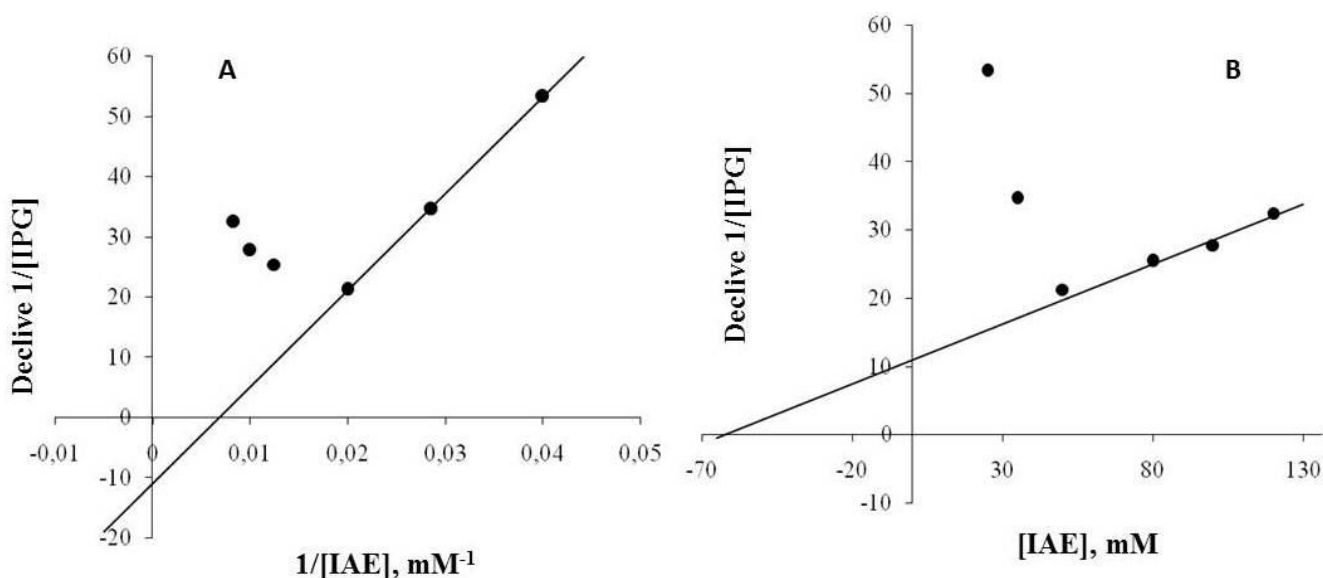


Figura 90: a) Plotagem do Declive 1/[IPG] (calculado a partir da figura 88) contra o inverso de diversas concentrações baixas de AE, onde este atua principalmente como substrato; b) Plotagem 1/[IPG] (calculado a partir da figura 59) contra o inverso de diversas concentrações altas de AE, onde este atua principalmente como inibidor.

De acordo com a variação da concentração de AE, observa-se que há uma relação linear apenas em altos valores de 1/[ácido], ou seja, para baixas concentrações de AE (onde o ácido

atua principalmente como substrato). O coeficiente de correlação da reta gerada para os altos valores de $1/[AE]$ foi 0,999, indicando muito boa linearidade.

A replotagem demonstrada na figura 90b denota novamente uma curva, que está de acordo com o que é esperado para um mecanismo de inibição “dead-end” pelo substrato em um sistema bi-reagente ordenado (Segel, 1975). Neste caso, há somente uma relação linear nos maiores valores de concentração de ácido (o ácido atua principalmente como inibidor). O coeficiente de correlação desta assíntota para valores elevados de concentração de AE foi de 0,965, indicando uma boa linearidade. Pelo fato de os perfis gráficos encontrados nas figuras 88 e 90, estarem de acordo com dados presentes na literatura, apenas em algumas partes, está de acordo com o perfil esperado para um substrato que, em baixas concentrações, atua essencialmente como substrato, enquanto que em concentrações elevadas, atua principalmente como inibidor. Além disso, os dados de $1/V_{\text{máx}}$, obtidos da figura 90a foram plotados na figura 90, sendo confrontados com os inversos das concentrações de AE.

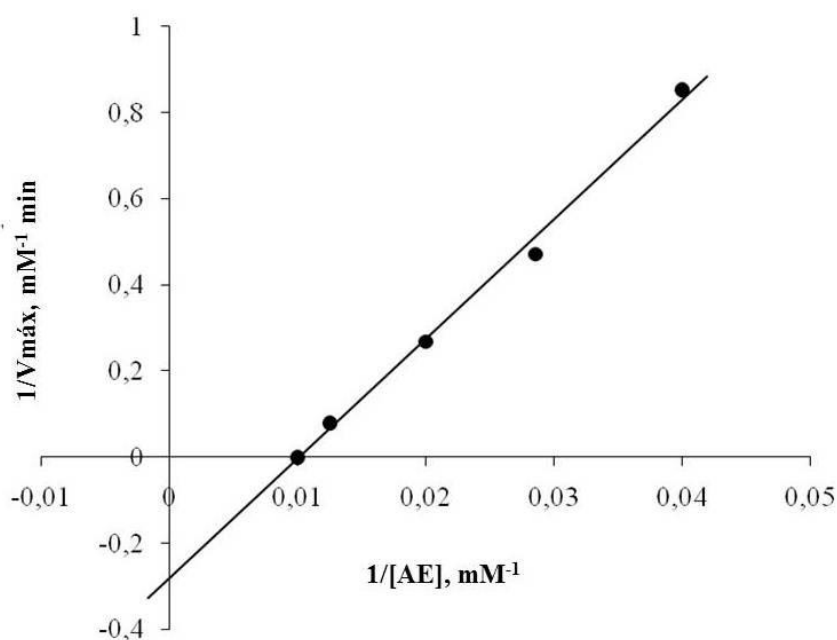


Figura 91: Relação entre $1/V_{\text{máx}}$ contra o inverso das concentrações de ácido esteárico, calculados a partir da figura 90.

A relação encontrada também é linear, com coeficiente de correlação igual a 0,995, indicando novamente uma boa linearidade. A partir desses gráficos gerados, e levando-se em conta os declives, e os pontos de interseção entre os eixos, as constantes cinéticas para o sistema bi-bi ordenado com a inibição pelo substrato pôde ser calculado (Tabela 44).

Tabela 44: Valores das constantes cinéticas determinadas pelos dados experimentais. A e B representam os substratos IPG e AE, respectivamente.

Parâmetros	Valores
V_{max} (mol l ⁻¹ min ⁻¹)	3.6
Km_A (mol l ⁻¹)	43.4
Km_B (mol l ⁻¹)	98.6
K_i (mol l ⁻¹)	69.4
K_{ia} (mol l ⁻¹)	57.8

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar as reações catalisadas por lipase, tendo-se como principal mecanismo aceito, o pingue-pongue bi-bi (Blattner et al, 2006; Zoumpantioti et al, 2010; Yadav & Borkar, 2010; Fiametti et al, 2012, Stergiou et al, 2013). Este mecanismo é uma forma de ilustrar a ligação alternativa de substratos e a liberação de produtos de uma reação de dois substratos com formação de dois produtos (Bezbradica et al, 2013). A primeira etapa deste mecanismo envolve a ligação do doador de acila (como um ácido graxo, por exemplo), resultando na formação de um complexo acil-enzima. Em uma próxima etapa, o primeiro produto (água) é liberado. Em seguida, a molécula aceptora de acila (o álcool) liga-se, e na etapa final, o éster é libertado. No entanto, os mecanismos de pingue-pongue básicos acabam por não descreverem corretamente as reações de esterificação catalisadas por lipases, uma vez que a inibição pelo excesso de um dos substratos é frequentemente relatada, como no caso deste trabalho. Esta inibição pelo substrato ocorre devido a formação de um complexo inativo, denominado de "complexo *dead-end*". Num caso da inibição por um doador de acila, como no caso de nosso trabalho, o AE, um complexo inativo, contendo duas moléculas de AE ligados a enzima é formado (Yadav & Lathi, 2004; Bezbradica et al, 2013). Quando inibição por um excesso de acceptor de acila ocorre, como no caso de inibições pelo álcool, como denotado no trabalho de Bezbradica et al (2013), um complexo inativo enzima-receptor é formado, não sendo então, formado o produto final, no caso, o éster, já que a terceira etapa do mecanismo não ocorre. Nestes casos, como o mecanismo pingue-pongue bi-bi não é totalmente seguido, diz-se que há um mecanismo bi-bi ordenado.

Além do trabalho atual, anteriormente citado, existem descrições na literatura, de reações onde se é comprovado o mecanismo bi-bi ordenado com complexo “dead-end” do substrato, como o de Tramper et al (1992), além daqueles que onde reações de esterificação de ácidos graxos foram estudadas (García et al, 2000; Yadav & Devi, 2002; Yadav & Lathi, 2004). No trabalho de Yadav & Devi, este mecanismo foi proposto para a síntese de ácido perláurico catalisada pela enzima Novozym 435 tendo-se tolueno como solvente. Entretanto, nenhum efeito de inibição foi observado. Já em 2004, Yadav & Lathi publicaram a síntese do laurato de citronelol, tendo-se a mesma lipase como biocatalisador, denotando-se para a reação, um mecanismo bi-bi ordenado, com inibição “dead-end” pelo ácido láurico. Para esta mesma reação citada anteriormente, porém, catalisada pela lipase livre de *Cândida rugosa*, Serri et al (2006), validaram tanto o mecanismo Ping-Pong bi-bi quanto o mecanismo bi-bi ordenado como responsáveis pela formação do laurato de citronelol, concluindo que o último modelo era o que melhor se adequava ao processo. Entretanto, os valores das constantes cinéticas dos dois modelos foram altamente contraditórios, devido às diferenças relativas às condições reacionais (a utilização de diferentes tipos de suporte, já que foram testadas a enzima imobilizada em Amberlite MB-1 e Celite, além de diversas temperaturas e solventes, como (n-hexano, n-heptano, e isooctano)). Garcia e colaboradores (2000) estudaram a cinética da formação de oleato de isopropila catalisada pela lipase por *C. antártica* lipase e os valores calculados para as constantes foram muito mais baixos do que os dos trabalhos discutidos anteriormente nesta seção. No entanto, o modelo aplicado foi um tipo de modelo bi-bi ordenado contendo 13 parâmetros cinéticos, o que gerou elevada incerteza dos dados obtidos. Os valores das constantes cinéticas calculadas neste trabalho foram similares àqueles apresentados por Yadav & Lathi para a síntese do laurato de citronelol ($V_{\max} = 10.5531 \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de enzima, $K_i = 1.6641 \text{ mol L}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de enzima, $K_A = 38.9845 \text{ mol L}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de enzima, $K_B = 25.3566 \text{ mol L}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de enzima) e cerca de dez vezes maior do que aqueles publicados por Garcia et al (2000) para a síntese do oleato de isopropila ($K_i = 1.63 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $K_A = 6.88 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, $K_B = 7.01 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$). São ainda significativamente diferentes daqueles propostos por Serri et al (2006) para a mesma síntese do laurato de citronelol ($V_{\max} = 0.0698 \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de enzima, $K_i = 0.0078 \text{ mol L}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de enzima, $K_A = 0.7471 \text{ mol L}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de enzima, $K_B = 0.3486 \text{ mol L}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de enzima), já que os valores foram calculados foram demonstrados com diferença de 4 ordens de magnitude. Ao comparar estes valores com o de outros trabalhos, tais autores atribuem esta discrepância às diferentes condições operacionais.

5.7 - Imobilização da Microemulsão AOT CaL em Organogel

Esta etapa do trabalho consistiu na investigação do potencial biocatalítico da microemulsão AOT CaL imobilizada em organogel. A grande vantagem deste sistema é a possibilidade de manutenção da atividade catalítica da enzima em microemulsão, imobilizada em um biopolímero que permite a difusão entre substratos e produtos, fazendo com que os produtos sejam recolhidos no solvente reacional, sem a necessidade de separação do surfactante.

O primeiro passo foi a imobilização da microemulsão em gel de HPMC previamente hidratado, nas proporções descritas na seção experimental. A matriz gerada é de aspecto semissólido opaco, como demonstrado na figura 92.



Figura 92: Matriz de Organogel de HPMC contendo a microemulsão AOT CaL imobilizada, evidenciando o aspecto semissólido opaco.

Como no sistema AOT/CaL estudado anteriormente, ótimas conversões foram encontradas em apenas 30 minutos de reação, onde cerca de 80% de MEP foram detectados, decidimos avaliar o perfil reacional deste sistema nas mesmas condições anteriores, com

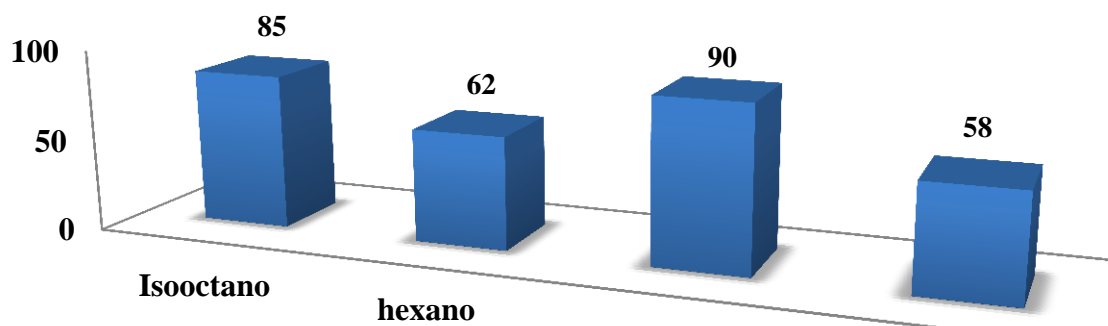


Figura 93: Conversões em MEP demonstradas pelos diferentes solventes testados na reação de esterificação do AE e IPG catalisada pelo sistema AOT/CaL imobilizado em organogel (OG). AE/IPG 1:1 (100mM), 40°C.

razão molar AE:IPG 1:1 (100mM), temperatura 40°C. Como este novo sistema formado é heterogêneo, há a possibilidade de se utilizar diferentes solventes reacionais. Portanto, foram investigadas as conversões geradas para o sistema AOT CaL imobilizado em organogel (OG), tendo-se como solvente o isooctano, além do n-heptano, n-hexano e Ciclohexano (figura 93).

Como observado, as melhores conversões foram encontradas em n-heptano, solvente que proporcionou também os melhores resultados com as enzimas imobilizadas comercialmente, como foi descrito nos capítulos 4 e 5 deste trabalho. Como explicação plausível, têm-se os valores de Log P para cada um deles, que refletem lipofilicidades e viscosidades diferenciadas, influenciando na estabilidade da enzima, e na superfície de contato entre substratos e enzima. Tais valores encontrados nesta etapa corroboram os valores discutidos na tabela 13, onde relações semelhantes entre conversões e solventes foram encontradas. Se levarmos em conta que o sistema AOT CaL gerou uma conversão de 80% em 30 minutos, e o sistema OG, em n-heptano, gerou 90% de MEP, podemos dizer que este último sistema gerou um aumento da performance enzimática. A produtividade gerada no sistema AOT CaL foi de 72,6g de MEP. h⁻¹ . g de enzima⁻¹, enquanto que para o sistema OG, um valor de 101,2 g de MEP. h⁻¹ . g de enzima⁻¹ foi encontrado, confirmando-se a melhoria do sistema. O perfil reacional do sistema OG também foi avaliado (figura 94).

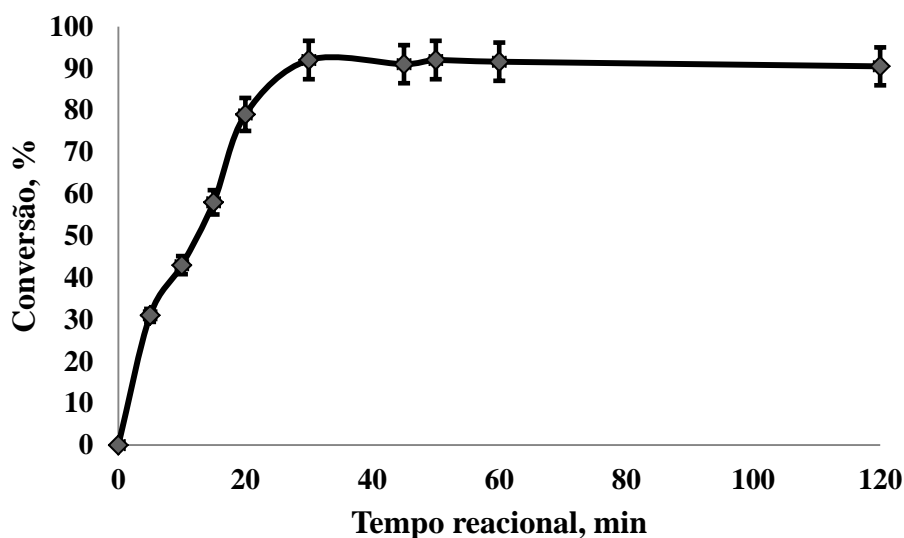


Figura 94: Perfil reacional para a reação de formação de MEP catalisada pelo sistema OG: AE e IPG 1:1 (100mM), 40°C.

Tendo-se em vista a robustez do sistema OG, decidimos investigar a síntese de MEP catalisada pelo sistema OG em condições de fluxo contínuo (figura 95). Para esta etapa, 2g de gel (HPMC) foram hidratados, e a microemulsão AOT CaL, posteriormente incorporada, gerando um sistema OG contendo 1,2mg de lipase no total, o qual foi acondicionado em uma coluna de leito fixo de 5,5mL. Fluxos variando de 0,05 a 1,0mL/minuto foram testados a 40°C, em n-heptano como solvente reacional.

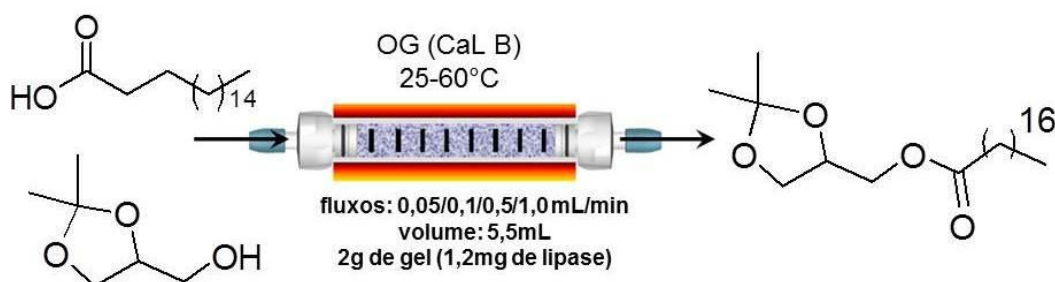


Figura 95: Esquema da investigação do perfil reacional para a formação de MEP catalisada pelo sistema OG em condições de fluxo contínuo.

Os resultados para esta investigação inicial encontram-se na tabela 42:

Tabela 45: Investigação inicial da síntese de MEP catalisada pelo sistema OG em condições de fluxo contínuo. AE: IPG 1:1 (100mM, n-heptano), 1,2mg de lipase CaL B.

Temperatura (°C)	Fluxo (mL/min)/n-heptano			
	1,0	0,5	0,1	0,05
25	8	12	21	25
35	38	42	56	55
40	59	58	81	86
45	69	93	100	77
50	50	54	66	64
55	turbidez	turbidez	turbidez	turbidez
60	turbidez	turbidez	turbidez	turbidez

Como observado na tabela 45, excelentes resultados puderam ser encontrados a 45°C, com em tempos de residência de 88 e 44 minutos, com conversões de 100 e 93% respectivamente. Entretanto, vale a pena ressaltar que, a conversão de 93% é obtida em apenas 11 minutos, e não em 55, quando há conversão total. Em tempo de residência de 11 minutos, uma produtividade de $241 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g de enzima}^{-1}$ é gerada, número muito superior ao encontrado para o sistema OG em condições de batelada. Neste caso, houve uma redução drástica do tempo reacional necessário, além da pequena quantidade de enzima aplicada (apenas 1,2mg), gerando excelentes conversões, e refletindo nos valores de produtividade encontrados, sendo este, um sistema eficiente para a síntese do éster em questão. Tal eficiência do sistema torna-se ainda mais interessante se levarmos em conta as produtividades obtidas na etapa em batelada tendo-se as enzimas comerciais como biocatalisadores, além dos tempos reacionais necessários (4h). Desta forma, o sistema em OG foi o mais eficaz para a produção de MEP.

A partir de 50°C, quedas sucessivas na conversão puderam ser encontradas, e nas temperaturas mais altas, uma grande turbidez das amostras foi detectada. Tal fato pode ser explicada por uma lixiviação da água presente no gel, além da enzima imobilizada, que juntamente com o solvente orgânico empregado, gera-se uma emulsão, a qual foi recolhida. A fim de se investigar a possível lixiviação de proteínas para o meio reacional, novas alíquotas foram recolhidas em todos os fluxos testados, e nas maiores temperaturas (50, 55 e 60°C), e investigadas quanto a quantidade de proteínas no meio, através do método de Bradford (figura 96).

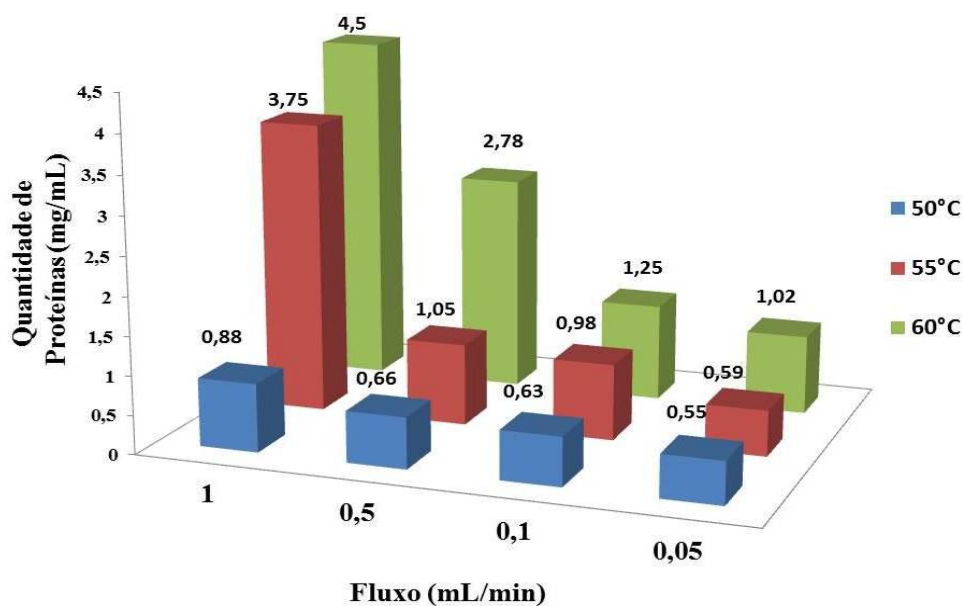


Figura 96: Quantidade de proteínas lixiviadas, em mg/mL das alíquotas de meio reacional retiradas na reação de formação de MEP, catalisada pelo sistema OG em condições de fluxo contínuo.

A figura 96 mostra que, em maiores temperaturas, maiores quantidades de proteínas são encontradas. Esta concentração aumenta ainda mais com o aumento do fluxo de bombeamento dos substratos pela coluna. Segundo Zoumpantioti et al (2008), sistemas de organogel em HPMC se mantêm estáveis em até 50°C, temperatura onde é capaz de manter a capacidade catalítica da enzima. Acima desta temperatura, devido a desnaturação do biopolímero, há a desestruturação da matriz formada, sendo responsável pelo escapamento de proteínas para o meio reacional (Blattner et al, 2006). Em primeira instância, há o fechamento dos poros do gel, como efeito da mudança conformacional do polímero, seguida da desnaturação completa (Zoumpantioti et al, 2006). Aliado a este efeito térmico, fluxos altos de bombeamento aceleram este processo, causando um efeito de lixiviação da enzima imobilizada no sistema.

De modo a melhorar a produtividade gerada por este sistema, a síntese de MEP catalisada por este sistema foi submetida a aumento de concentração de reagentes, variando-se as concentrações dos mesmos, de 100 a 1M em n-heptano, mantendo-se a proporção molar de 1:1 (tabela 46).

Tabela 46: Resultado do aumento de concentração de reagentes para a formação de MEP catalisada pelo sistema OG sob condições de fluxo contínuo, a 0,5mL/min (11 minutos), 45°C.

Concentração de Substrato(mM)	Conversão (%)
100	92
150	91
300	91
500	91
750	54
1000	turbidez

Desta forma, o sistema conseguiu manter boas conversões com concentrações de substratos de até 500mM, gerando uma produtividade final de 996g de MEP . h⁻¹. g de enzima⁻¹, sendo este o sistema mais eficiente para a produção do éster em questão até aqui.

O sistema em questão foi também submetido a investigação quanto a quantidade de reciclos possíveis, para fins de comparação com os sistemas anteriormente estudados (figura 97).

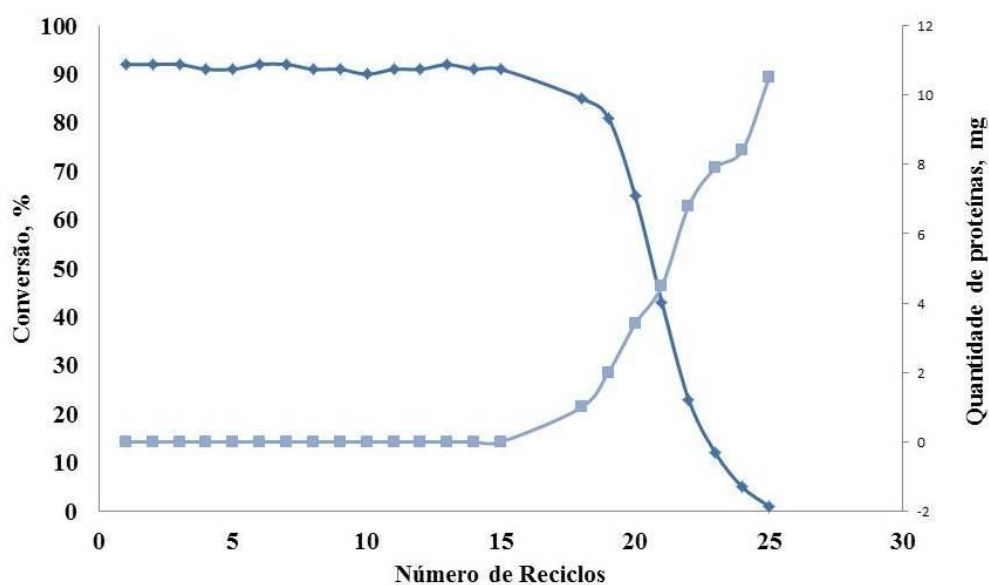


Figura 97: Reciclos possíveis e relação com quantidade de proteínas lixiviadas para a reação de formação de MEP catalisada pelo sistema OG em fluxo contínuo, a 0,5 mL/min, 45°C, AE e IPG 1:1 (500mM) em n-heptano.

Como visto na figura 97, o sistema OG foi capaz de gerar cerca de 15 reciclos possíveis, sem que a enzima imobilizada perdesse sua capacidade catalítica. Além disto, a partir do 16°

reciclo, quedas nas conversões são observadas de forma acentuada e sucessiva, fato o qual está intimamente ligado a lixiviação da enzima para o meio reacional, que é bombeada para o lado de fora do sistema. Esta quantidade de ciclos sem perda de biocatalisador reafirma a robustez e as vantagens da utilização do sistema de OG para a síntese do éster em questão.

CAPÍTULO 7

Considerações Finais Sobre o Trabalho

7.1 – Relação entre Produtividade e Eficiência dos Biorreatores Estudados

Como discutido anteriormente durante o trabalho, uma das formas de se avaliar um biorreator é calcular sua produtividade. Neste trabalho, a produtividade de cada sistema foi calculada através de suas relações entre a quantidade de produto formada, o tempo reacional, e a quantidade de enzima. Deste modo, os valores encontrados foram expressos em g de produto.h⁻¹.g de enzima⁻¹. De posse dos valores de desorção da lipase RM IM (24,26mg de enzima/g de suporte), os valores encontrados com as etapas utilizando a referida enzima puderam ser ajustados (tabela 47).

Tabela 47 : Comparação entre os resultados obtidos em casa rota biotecnológica estudada.

Biorreator	Ácido graxo utilizado	Tempo (minutos)	mg de enzima	P (g produto/h/g de enzima)
Batelada – agitação orbital	AE	4h	0,2426	1,88
Batelada – Agitação Orbital	RAG	4h	0,2426	0,89
Fluxo Contínuo	AE	24min	10,18	518,2
Fluxo Contínuo	RAG	24min	10,18	397,2
Batelada – Livre de Solventes	AE	4h	0,344	2,518
Batelada – Livre de Solventes	RAG	4h	0,310	2,612
Microemulsão AOT/Isooctano	AE	30min	0,9	72,6
Microemulsão AOT/Isooctano em Organogel - Batelada Microemulsão	AE	4h	1,2	101,2

AOT/Isooctano em Organogel – Fluxo Contínuo	AE	4h	1,2 mg	241
--	----	----	--------	-----

Como descrito neste trabalho, as reações em leito fixo demonstraram excelentes resultados em tempo muito inferiores àquelas procedidas em condições de batelada, além de possibilitar maior reciclabilidade do biocatalisador. Embora quantidades muito maiores de enzima tenham sido utilizadas nesta rota, tal quantidade foi melhor aproveitada, já que não houve efeitos de cisalhamento, ocasionado pela agitação dos sistemas em batelada, principalmente naqueles reatores do tipo CSTR, demonstrando que houve, de fato, uma otimização do biorreator.

De acordo com a tabela 47, o sistema em fluxo contínuo ofereceu maiores produtividades, se comparado aos sistemas em batelada, sendo estes com ou sem solventes, expressando maior potencial de aplicação industrial. Portanto, em termos de reaproveitamento, o sistema em fluxo contínuo prevalece, com possibilidade de acoplamento entre as etapas, como demonstrado no capítulo 5. Embora os sistemas sem solventes apresentem uma abordagem mais ecologicamente viável e correta, estes demonstraram produtividades inferiores àquelas demonstradas em sistemas de leito fixo, além de quantidades inferiores de reciclos.

Os valores numéricos encontrados revelam informações interessantes, como no caso do sistema microemulsionado em AOT/Isooctano, onde com quantidades muito menores de enzimas, além de tempos muito reduzidos de reação, se comparados os sistemas com enzimas imobilizadas, ótimas conversões puderam ser encontradas, elevando-se os valores de P calculados. Ainda sobre os sistemas em AOT, a imobilização em organogel gerou um maior reaproveitamento do sistema microemulsionado, visto que micelas reversas apresentam como limitações a dificuldade de separação dos produtos e a ausência de reciclabilidade.

Embora sistemas diferenciados de reação estejam sendo comparados, através de seus valores de P obtidos, deve-se ressaltar que cada resultado de conversão foi obtido em diversas condições reacionais, como temperatura, quantidade de enzima, presença ou ausência de agitação. Deste modo, com o objetivo de se verificar a magnitude dos valores de produtividade, as reações em batelada para a obtenção de MRAG e MEP foram procedidas com a mesma quantidade de enzima utilizada na etapa em fluxo contínuo. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada com este excesso de enzima, tanto nas velocidades iniciais de reação, quanto nas conversões finais. Além disto, as reações em fluxo contínuo foram mantidas sob recirculação de substratos durante 4h, que é o tempo ótimo de

reação em batelada. Entretanto, baixas conversões são obtidas, devido a hidrólise ocorrida no sistema. Desta maneira, os sistemas em fluxo contínuo foram mais atraentes do que aqueles em batelada.

No que diz respeito aos sistemas microemulsionados,

7.2 – Conclusões Finais

- O monoestearato de glicerila (MONOEST), pôde ser produzido via enzimática, por diversas rotas biotecnológicas, dispondo de condições brandas de reação. Estas rotas envolveram as etapas em batelada e em fluxo contínuo, assim como reações em sistemas com e sem solventes, além de microemulsões;
- Através da metodologia de superfície de resposta, as melhores condições reacionais puderam ser encontradas, assim como a estimativa dos efeitos de diversas variáveis reacionais;
- Um resíduo de ácidos graxos, proveniente da indústria de refino de óleo de Palma (RAG) pôde ser utilizado como matéria-prima para a síntese de MAG, agregando-se valor ao produto final;
- As reações em batelada, embora apresentassem altas conversões com a lipase RM IM, demonstraram menor capacidade de reciclos do biocatalisador, como consequência do cisalhamento do suporte;
- Sob condições de fluxo contínuo, a MEP foi produzida em apenas 20 min, em concentrações de 2,0M de reagentes. Já o MRAG, 1,5M de substratos foi a concentração máxima.
- Através da dessorção da lipase RM IM de seu suporte, as produtividades dos sistemas puderam ser calculadas, onde o biorreator em leito fixo demonstrou maiores valores, revelando ser um método viável para a produção dos MAGs de estudo.

- A lipase RM demonstrou baixa atividade em micela reversa de AOT/Isooctano, sendo o sistema AOT/CaL, o mais eficiente, onde em apenas 30 min de reação, cerca de 80% de conversão foram encontrados, com apenas 0,9mg de enzima;
- Estudos cinéticos demonstraram que a formação de MEP em micelas reversas é regida pelo mecanismo Bi-bi ordenado, com uma inibição do tipo “Dead-End” pelo ácido esteárico, além de cooperação negativa do IPG em altas concentrações fixas;
- O sistema AOT/CaL imobilizado em organogel (OG) permitiu a utilização do sistema por 15 vezes, sem a perda de atividade. Entretanto, altas temperaturas e fluxos desnaturam o polímero do gel, e permitem a lixiviação do biocatalisador para o meio reacional.

CAPÍTULO 8

Referências Bibliográficas

Abdulla, R.; Pogaku, R. “Characterization of cross linked *Burkholderia cepacia* lipase in alginate and κ -carrageenan hybrid matrix”. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 44 (4), p. 545-551, 2013.

Abuin, E., Lissi, E., & Duarte, R. “Kinetics of *N*-glutaryl-*L*-phenylalanine *p*-nitroanilide hydrolysis catalyzed by a α -chymotrypsin in aqueous solutions of dodecyltrimethylammonium bromide”. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 283, p. 539-543, 2007.

Adhikari, S.; Adhikari, J. “Detection of interesterified fats in hydrogenated fats”. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, v. 69 (10), p. 1051-1053, 1992.

Anastas, P.; Eghbali, N. “Green Chemistry: Principles and Practice”. *Chemical Society Reviews*, v. 39, p. 301–312, 2010.

Anuar, S. T.; Zhao, Y.; Mugo, S. M.; Curtis, J. M. “The development of a capillary microreactor for transesterification reactions using lipase immobilized onto a silica monolith”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 92, p. 62-70, 2013.

Baccanari, D.P; Tansik, R.L.; Hitchings, G.H. “Substrate-inhibitor cooperative interactions with microbial dihydrofolate reductases”, *Advances in Enzyme Regulation*, v. 26, p. 3-15, 1987.

Araújo, R. S. Desenvolvimento de processos a partir de óleos vegetais: aplicação às reações de sulfatação e epoxidação. 217p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal: DEQ/PPGEQ, 1994.

Athalye, S.; Sharma-Shivappa, R.; Peereti, S.; Kolar, P.; Davis, J. P. “Producing biodiesel from cottonseed oil using *Rhizopus oryzae* ATCC #34612 whole cell biocatalysis: Culture media and cultivation period optimization”. *Energy for Sustainable Development*, v. 17 (4), p. 331-336, 2013.

P.J. Atkinson, P. J.; Grimson, M. J.; Heenan, R. K.; Howe, A. M.; Robinson, B. H. “Structure of microemulsion-based organo-gels”. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, v. 23. p. 1807-1809.

Backlund, S.; Eriksson, F.; Kanerva, L. T.; Rantala, M. “Selective enzymatic reactions using microemulsion-based gels”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 4, p. 121-127, 1995

Backlund, S.; Eriksoon, F.; Hesdrom, G.; Laine, A.; Rantala, M. “Lipase-catalyzed enantioselective esterifications using different microemulsion-based gels”. *Colloid and Polymer Science*, v. 274, p. 540-547, 1996.

Badgujar, K. C.; Dhake, K. P.; Bhanage, B. M. “Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on poly lactic acid, polyvinyl alcohol and chitosan based ternary blend film: Characterization, activity, stability and its application for N-acylation reactions”. *Process Biochemistry*, In Press article.

Batte H. D.; Wright, A. J.; Rush, J. W.; Idziak, S.H.J.; Marangoni, A. G. “Effect of processing conditions on the structure of monostearin–oil–water gels”. *Food Research International* v. 40, p. 982–988, 2007.

Bhandari, K.; Chaurasia, S. P.; Dalai, A. K.; Gupta, A.; Singh, K. “Kinetic study on enzymatic esterification of tuna fish oil fatty acids with butanol”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 94, p. 104-110, 2013.

Bernardo, M.; Pacheco, R.; Serralheiro, M. L. M.; Karlami, A. “Production of hydroxamic acids by immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells: Kinetic analysis in reverse micelles”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 93, p. 28-33, 2013.

Bezbradica, D.; Stojanović, M.; Veličković, D.; Dimitrijević, A.; Carević, M.; Mihailović, M.; Milosavić, N. “Kinetic model of lipase-catalyzed conversion of ascorbic acid and oleic acid to liposoluble vitamin C ester”. *Biochemical Engineering Journal*, v. 71, p. 89-96, 2013.

Blattner, C.; Zoupanioti, M.; Kröner, J.; Schmeer, G.; Xenakis, A.; Kunz, W. “Biocatalysis using lipase encapsulated in microemulsion-based organogels in supercritical carbon dioxide”. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 36, p182–193, 2006.

Bognolo, G. “Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons”. *Colloids and Surfaces A*, v. 170, p. 41-52, 2012.

Bonte, S. Ghinea, O. I.; Baussane, I. Xuereb, J.; Dinica, R.; Demeunynck, M. Investigation of the lipase catalysed reaction of aliphatic amines with ethyl propiolate as a route to *N*-substituted propiolamides. *Tetrahedron*, v 69 (26), p. 5495-5500, 2013.

Boratyński, F.; Smuga, M.; Warwrzeczyk, C. Lactones 42. Stereoselective enzymatic/microbial synthesis of optically active isomers of whisky lactone *Food Chemistry*, v 141 (1), p. 419-427, 2013.

Borges, P. C. Obtenção de intermediários quirais utilizando lipases em reatores assistidos por membranas. Tese de Doutorado, COPPE/UFRJ, Brasil, 2011.

Bornscheuer U. T. “Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis”. *FEMS microbiology reviews*, v. 26, p.73-81, 2002.

Bornscheuer, U. T. “Immobilizing enzymes: how to create more suitable biocatalysts”. *Angewandte Chemie*, v. 42, n. 29, p. 3336–7, 2003.

Bose, A. & Keharia, H. "Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 2 (3), p. 255-266, 2013

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, pp. 248-554, 1976.

Burova, T. V.; Grinberg, N. V.; Grinberg, V. Y.; Usov, V. B.; Tosloguzov, V. B.; de Kruif, C. G. "Conformational changes in *i*- and *k*-carrageenans induced by complex formation with bovine β -casein". *Biomacromolecules*, 8 (2007), pp. 368–375.

Cabrera, Z.; Fernandez-Lorente, G.; Fernandez-Lafuente, R.; Palomo, J. M.; Guisan, J. M. "Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 57, p. 171–176, 2009.

Camacho, F.; Robles, A.; González, P. A.; Camacho, B.; Esteban, L.; Molina, E. "Mechanistic model for the lipase-catalyzed alcoholysis of triacylglycerols". *Applied Catalysis A*, v. 301, p. 158-168, 2006.

Cao L. "Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design". Ed. Wiley, p. 563, 2005.

Capitani, D.; Segre, A. L.; Haering, G.; Luisi, P. L. "Mobility measurements in microemulsion gels". *The Journal of Physical Chemistry*, v. 92, p. 3500 – 3504, 1988.

Carlson, A. & Nagarajan, R. "Release and recovery of porcine pepsin and bovine chymosin from reverse micelles: a New technique based on isopropyl alcohol addiction" . *Biotechnology Progress*, v. 8, p. 85-89, 1992.

Carvalho P. O. Calafati S. A., Marassi M., Silva D. M., Contesini F. J., Bizaco R.; "Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas". *Química Nova*, v. 28, 4, p. 614-621, 2005.

Cetina, D. M.; Giraldo, G. I.; Orrego, C. E. "Application of response surface design to solvent, temperature and lipase selection for optimal monoglyceride production". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 72 (1-2), p. 13-19, 2011.

Cho, K.; Hong, J.; Lee, K. "Monoacylglycerol (MAG)-oleic acid has stronger antioxidant, anti-atherosclerotic, and protein glycation inhibitory activities than MAG-palmitic acid". *Journal of Medicinal Food*, v. 13, n. 1, p. 99-107, 2010.

Compton, S. J.; Jones, C. G. "Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay". *Analytical Biochemistry*, v. 151 (2), p. 369-374, 1985

Correa, M.A.; Scarpa, M. V.; Franzini, M.C.; Oliveira, A.G. "On the incorporation of the non-steroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions". *Colloids and Surfaces B*. v. 43, p. 108-114. 2005.

Corrêa, F.A. ; Sutili, F. K. ; Miranda, L. S.M. ; Leite, S. G.F. ; de Souza, R. O.M.A. ; Leal, I. C.R. “Epoxidation of oleic acid catalyzed by PSCI-Amano lipase optimized by experimental design”. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, v. 81, p. 7-11, 2012.

Costa, V.E.U., Amorin, H.L. “O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influencia do solvente“, *Química Nova*, v. 22, n. 6, pp. 863-873, 1999.

Costa, I. C. R.; Leite, S. G. F.; Leal, I. C. R.; Miranda, L. S. M; de Souza, R. O. M. A. “Thermal Effect on the Microwave Assisted Biodiesel Synthesis Catalyzed by Lipases”. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22(10), p. 1993-1998, 2011.

Cunha A. G., Fernández-Lorente G., Bevilaqua J. V., Destain J., Paiva L. M. C., Freire, D. M. G., Fernández-Lafuente R., Guisán J. M.; “Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase: a comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.146, p.49 -56, 2008.

Da Fonseca, I. “Chiquimato Desidrogenase de *Mycobacterium tuberculosis*: mecanismos cinético e químico da enzima recombinante”. Tese de Doutorado, UFRGS, Brasil, pp 125, 2006.

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.

Damstrup, M. L. Process Development of Enzymatic Glycerolysis for Industrial Monoacylglycerol Production. PhD Thesis, Food Production Engineering, Technical University of Denmark, 2008.

Dandavate, V.; Keharia, H.; Madamwar, D. “Ethyl isovalerate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilized on silica nanoparticles prepared in nonionic reverse micelles”. *Process Biochemistry*, v. 44 (3), p. 349-352, 2009.

Dandavate, V.; Madamwar, D. Novel approach for the synthesis of ethyl isovalerate using surfactant coated *Candida rugosa* lipase immobilized in microemulsion based organogels. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p. 265-270, 2007.

Danisco Corporation. Disponível em <<http://www.danisco.com>>. Acesso em: Novembro de 2011.

Das, K.; Maiti, S.; Ghosh, M.; Mandal, D.; Das, P. K. “Graphene oxide in cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) reverse micelle: A befitting soft nanocomposite for improving efficiency of surface-active enzymes”. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 395, p. 111-118, 2013.

Da Silva, C. X.; Gonçalves, V. L. C.; Mota, C. J. A. “Water-tolerant zeolite catalyst for the acetalisation of glycerol”. *Green Chemistry*, v. 11, p. 38-41, 2009.

Dave, R. & Madamwar, R. “*Cândida rugosa* lipase immobilized in Triton-X100 microemulsion based organogels (MBGs) for ester synthesis”. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 70-75, 2008.

Davies, O . L. The design and Analysis of Industrial Experiments, New York, 1978.

De Castro H. F., Mendes A. A., Santos J. C., Aguiar C. L.; “Modificação de óleos e gorduras por biotransformação”. *Química Nova*, v. 27, 1, p. 146-156, 2004.

De Maria, P.D; Xenakis, A.; Stamatis, H.; Sinistera, J. V. “Unexpected reaction profile observed in the synthesis of propyl laurate when using *Cândida rugosa* lipases immobilized in microemulsion based organogels”. *Biotechnology Letters*, v. 26, p 1517-1520, 2004.

De Miranda, A. S. ; Gomes, Juliana. C.; Jr, M. T. R. ; Costa, I. C.R. ; Lopes, R. O.; Miranda, L. S.M. ; Coelho, F. ; de Souza, Rodrigo O.M.A. “Kinetic Resolution of 5H-Pyrrolo [1,2- α]imidazol-7-ol, 6,7-dihydro Under Continuous Flow Conditions: An Intermediate for Chiral Ionic Liquids Synthesis”. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, v. 91, p. 77-82, 2013.

De Sousa, A. R. S.; Simplicio, A. L.; De Sousa, H. C.; Duarte, C. M. M. “Preparation of glyceryl monostearate-based particles by PGSS®: Application to caffeine”. *Journal of Supercritical Fluids* v. 43, p. 120–125, 2007.

De Souza, R. O. M. A. e Miranda, L. S. M. “Reações Sob Fluxo Contínuo: da Química Verde a um Processo Verde”. *Revista Virtual de Química*, v. 2, p 1-4, 2013.

Del Val, M.; & Otero, C. “Kinetic and spectroscopic behaviour of a lipase-microgel derivative in aqueous and micellar media”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 4, p. 137-147, 1998.

Dos Santos, L. V. Emulsificantes – modo de ação e utilização nos alimentos. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pelotas. Rio Grande Sul, Brasil, 2008.

Duane, H.S. Comparision of Emulsion With Phase Diagrams of Systems in which They Form. In: Schick, M. J.; Fowkes, F. M., Microemulsion Systems, Marcel Dekker Inc., p. 84-85, New York, 1987.

Dukhin, A., Parlia, S. “Ions, ion pairs and inverse micelles in non-polar media”. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 18 (2), p. 93-115, 2013.

Esakkiraj, P.; Rajamony, U.; Palavesam, A.; Immanuel, G. “Solid-state production of esterase using fish processing wastes by *Bacillus altitudinis* AP-MSU”. *Food and Bioproducts Processing*, v. 90 (3), p. 370-376, 2012.

Feltes, M. M. C. Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis ricos em ácidos graxos ômega-3 a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe. Tese de Doutorado. UFSC. Santa Catarina, Brasil. 2011.

Fernandes, M. L. M.; Krieger, N.; Baron, A. M.; Zamora, P. P.; Ramos, L. P.; Mitchell, D. A. "Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system". *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v. 30 (1), p. 43-49, 2004;

Fernandez-Lafuente, R. "Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 62 (3-4), p. 191-212, 2010.

Ferreira, P.; Fonseca, I. M.; Ramos, A. M.; Vital, J.; Castanheiro, J. E. "Valorisation of glycerol by condensation with acetone over silica-included heteropolyacids". *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 98, p. 94-99, 2010.

Fiametti, K.; Ustra, D. O.; Corazza, M. L.; Furigo Jr, A.; J. Vladimir Oliveira. "Kinetics of ultrasound-assisted lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in solvent-free system". *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 19 (3), p. 440-451, 2012.

Formariz, T.P; Urban, M.C.C.; Silva-júnior, A. A.; Gremião, M.P.D.; Oliveira, A. G. O. "Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos". *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41 (3), p. 301-313, 2005.

Fragoso, A.; Pacheco, R.; KArnali, A. Investigation of structural effects and behaviour of *Pseudomonas aeruginosa* amidase encapsulated in reversed micelles. *Process Biochemistry*, v. 47 (2), p. 264-272, 2012.

Franzini, M. C. Complexos de inclusão de anfotericina b com derivados de ciclodextrinas e sua incorporação em microemulsões lipídicas biocompatíveis. Tese de Doutorado. Unesp – Araraquara. São Paulo, Brasil. 2010.

Fredrick, E.; Heyman, B.; Moens, K.; Fischer, S.; Verwijlen, T.; Moldenaers, P.; Van der Meeren, P.; Dewettinck, K. "Monoacylglycerols in dairy recombined cream: II. The effect on partial coalescence and whipping properties". *Food Research International*, v. 51 (2), p. 936-945, 2013.

Fregolente, P.B.L. Obtenção de monoacilglicerol de alta concentração através de glicerólise enzimática e destilação molecular. Tese de Doutorado. Unicamp. São Paulo, Brasil, 2010.

Fregolente, L.V. ; Fregolente, P.B.L. ; Chicuta A.M.; Batistella, C.B.; Maciel Filho R.; Wolf-Maciel, M.R. "Effect of Operating Conditions on the Concentration of Monoglycerides Using Molecular Distillation". *Chemical Engineering Research and Design*, v. 85 (11), p. 1524-1528, 2007.

Freire D. M. G., Castilho, L. R.; "Lipases em biocatálise". *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*, cap. 16, p.369-385, 2008.

Frost, C. G.; Mutton, L. "Heterogeneous catalytic synthesis using microreactor technology". *Green Chemistry* v. 12, p. 1687-1703, 2010.

Fuguet, E.; Rafols, C.; Rosés, M.; Bosch, E., "Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems". *Analytica Chimica Acta* v. 548, p. 95-100, 2005.

Garcia, T.; Coteron, T; Martinez, M.; Aracil, J. “Kinetic model for the esterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst”. *Chemical Engineering Science*. v. 55 (8), p. 1411–1423, 2000.

Gil, S.; Marchena, M.; Sanchez-Silva, L.; Romero, A.; Sanchez, P. “Effect of the operation conditions on the selective oxidation of glycerol with catalysts based on Au supported on carbonaceous materials”. *Chemical Engineering Journal*, v. 178, p. 423-435, 2011.

Godoy, M.G.; Machado, O. L. T; Roussos, S.; Freire, D. M. G. “Degradation of phorbol esters of *Jatropha curcas* cake by solid-state fermentation and simultaneous lipase production”. *New Biotechnology*, v. 29, p. 23-26, 2012.

Guisán, J.M., Sabuquillo, P., Fernandez-Lafuente, R., Fernandez-Lorente, G. “Preparation of new lipases derivatives with high activity-stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 817-824, 2001.

Gutarra, M. L. E.; Romero, O.; Abian, O.; Torres, F. A. G.; Freire, D. M. G.; Castro, A. M., Guisan; J. M. and Paolo, J. M. “Enzyme Surface Glycosylation in the Solid Phase: Improved Activity and Selectivity of *Candida Antarctica* Lipase B”. *ChemCatChem*, v. 3, p. 1902-1910, 2011.

Guth, J.; Lentner, V. Aqueous enzyme delivery system. World Intellectual Property Organization, WO 2006/018048 A1, 2006.

Griffin, W. C.: *Journal Soc. Cosmetics Chemistry*, v.5, p.249, 1954.

Grompone, M.A; Mono- y di-glicéridos (In press) in: Block JM, Barrera-Arellano D, (Eds) Temas Selectos en Aceites y Grasas. Editora Blücher São Paulo, 2010.

Haering, G.; Luisi, P. L. “Hydrocarbon gels from water-in-oil microemulsions”. *Journal of Physical Chemistry*, v. 90, p. 5892-5895, 1986.

Hayes D.G. & Gulari E. “Esterification reactions of lipase in reverse micelles”. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 35, p. 793-801, 1990.

Hayes, D. G.; Alkhatib, M. H.; del Rio, J. G.; Urban, V. S. “Physicochemical characterization of water-in-oil microemulsions formed by a binary 1,3-dioxolane alkyl ethoxylate/Aerosol-OT surfactant system”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 417, p. 99-110, 2013.

Hart, A. E.; Gorosh, S. A.; Kitchens, C. L. “Reverse Micelles synthesis of silver nanoparticles in gas expanded liquids”. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 79, p. 236-243, 2013.

He, W.; Li, J.; Pan, X.; Zhou, Y.; Jia, C.; Zhang, X.; Feng, B. “Lipase-mediated synthesis of water-soluble plant stanol derivatives in tert-butanol”. *Bioresource Technology*, v. 14, p. 1-5, 2012.

Heidt, M.; Bornscheuer, U.; Schmid, R. D. "Studies on the enantioselectivity in the lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerols from the isopropylidene glycerol". *Biotechnology. Technique*, v. 10, p. 25-30, 1996.

Hernaiz, M. J.; Alcantara, A. R.; Garcia, J.I., Sinisterra, J. V. "Applied Biotransformations in Green Solvents". *Chemistry a European Journal*, v. 16, p. 9422–9437;

Hess, R.; Bornscheuer, U.; Capewell, A.; Scheper, T. "Lipase-catalyzed synthesis of monostearoylglycerol in organic solvents from 1,2-O-isopropylidene glycerol". *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 725-728, 1995.

Holmberg, K. "Organic and bioorganic reactions in microemulsions". *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 51, 137-174, 1994.

István T. Horváth, I. T.; Anastas, P. T. "Introduction: Green Chemistry". *Chemical Reviews* v 107 (6), p. 2167–2168, 2007.

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*, v. 85–86, p. 1-9, 2013.

Jaeger K. E., Eggert T.; "Lipases for biotechnology". *Biotechnology*, v. 13, p. 390-397, 2002.

Jaeger, K. E. & Reetz, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology*, v. 16, n. 9, p. 396–403, 1998.

Jaeger, K.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annual Review of Microbiology*, v. 53, p. 315–351, 1999.

John, G.; Zhu, G.; Li, J.; Dordick, J. S. "Enzymatically derived sugar-containing self-assembled organogels with nanostructured morphologies". *Angewandte Chemie International Edition*, v. 45, p. 4772, 4775, 2006.

Joshi, C.; Khare, S. K." Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* lipase produced by SSF of deoiled *Jatropha* seed cake". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 2 (1), p. 32-37, 2013.

Kaewthong, W., H-Kittikun, A. "Glycerolysis of palm olein by immobilized lipase PS in organic solvents". *Enzyme and Microbial Technology* v. 35, p. 218-222, 2004.

Karra-Chaabouni, M.; Ghamghi, H.; Bezzine, S.; Rekik, A.;Gargouri, Y. "Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system". *Process Biochemistry*, v.41, p.1692-1698, 2006.

Kazlauskas R. J., Bornscheuer U. T.; "Biotransformation with Lipases". A Multi Volume Comprehensive Treatise in Biotechnology, (ed.) Rehm, H.J., Pihler G., Stadler, A., Kelly, P. J.W. New York: Wiley VCH Verlag, v. 8, pp. 37-192, 1998.

Khayoon, M.S.; Hameed, B.H. “Solventless acetalization of glycerol with acetone to fuel oxygenates over Ni–Zr supported on mesoporous activated carbon catalyst”. *Applied Catalysis A: General*, v 464– 465, pag 191-199, 2013.

Klibanov, A. M. “Improving enzymes by using them in organic solvents”. *Nature*, v. 409, p. 241, 2001.

Kundu, K. & Paul. B. K. “Physicochemical investigation of mixed surfactant reverse micelles: Water solubilization and conductometric studies”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 433, p. 154-165, 2013.

Kumar, R.; Madras, G.; Modak, J. “Enzymatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide”. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.43, p.1568-1573, 2004.

Ladanyi, B. M. “Computer simulation studies of counterion effects on the properties of surfactant systems” *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v.18 (1), p. 15-25, 2013.

Lago, R. C.; d'Avila, C. C.; Freire, D. M. G., Aranda, D. A. G., & Antunes, O. A. C. Produção de ácidos graxos catalisada por lipases não purificadas de sementes ou frutos vegetais para subsequente esterificação por catálise ácida. PI (Brasil) 0603824-7, 2006.

Laszlo, J.A.; Compton, D. L.; Vermillion, K. “Acyl Migration Kinetics of Vegetable Oil 1,2-Diacylglycerols”. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.v85, p. 307– 312, 2008.

Lawrence, M. J.; Ress, D. G. “Microemulsion-based as a novel drug delivery systems”. *Adv. Drug Delivery Rev.* v.45, p.89-121, 2000.

Lee, K. K. B., Poppenborg L. H., Stuckey D. C. (1998). “Terpene ester production in a solvent phase using a reverse micelle-encapsulated lipase”. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, p. 253–265, 1998.

Lima V. M. G., “. Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos”. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, pp. 140, 2004.

Lopez, F.; Venditti, F.; Cinelli, G.; Ceglie, A. “The novel hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) based organogel as reactor for ester synthesis by entrapped *Candida rugosa* lipase”. *Process Biochemistry*, v. 41 (1), p. 114-119, 2006.

Lowry, O., Rosenbrough, M., Farr, A., Randall, R., “Protein measurement with Folin phenol reagent“, *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, pp. 265-275 , 1951.

Lowry, R.R., Tinsley , J.I. “Rapid colorimetric determination of free fatty acids”. *Journal of American Oil Chemical Society*, v. 53, p. 470-472, 1976.

Lu, R.; Zhu, R.; Zhong, R.; Yu, A. “Locations of methanol in methanol-containing AOT reverse micelles revealed by photophysics of IR125”. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 252, p. 116-123, 2013.

Luisi, P. L.; Wolf, R. "Micellar solubilization of enzymes in hydrocarbon solvents, enzymatic activity and spectroscopic properties of ribonuclease in n-octane". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 89, p. 209-203, 1979.

Luque, R. & Clark, J. H. "Valorisation of food residues: waste to wealth using green chemical technologies". *Sustainable Chemical Processes*, v 1, p. 1-10, 2013.

Machado, C. O.; da Silva, A. A. T.; Borges, C. P.; Simas, A. B. C.; Freire, D. M. G. Kinetic resolution of (*R,S*)-1,2-isopropylidene glycerol (solketal) ester derivatives by lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 69, p. 42-46, 2011.

Mao, L.; O'Kennedy, B. T.; Roos, Y. H.; Hannon, J. A.; Miao, S. "Effect of monoglyceride self-assembled structure on emulsion properties and subsequent flavor release". *Food Research International*, v. 48 (1), p. 233-240, 2012.

Matos, L.M.C. ; Leal, I.C.R. ; de Souza, R.O.M.A. "Diacylglycerol synthesis by lipase-catalyzed partial hydrolysis of palm oil under microwave irradiation and continuous flow conditions". *Journal of Molecular Catalysis B, Enzymatic*. v. 72, p. 36-39, 2011.

Manoel, E. A.; Flores, Marcella C.; Pais, K. C.; Coelho, M. A. Z.; Miranda, L. S. M.; SIMAS, A. B. C.; FREIRE, D. M. G.; de Souza, Rodrigo O.M.A. "Kinetic resolution of a precursor for myo-inositol phosphates under continuous flow conditions". *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, v. 87, p. 139-143, 2013.

Manzocco, L.; Calligaris, S.; Da Pieve, S.; Marzona, S.; Nicoli, M. C. "Effect of monoglyceride-oil-water gels on white bread properties". *Food Research International*, v. 49 (2), p. 778-782, 2012.

Margulis-Goshen, K.; Magdassi, S. "Organic nanoparticles from microemulsions: Formation and applications". *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 17 (5), p. 290-296, 2012.

Mateo C., Palomo J. M., Fernández-Lorente G., Guisán J. M., Fernández-Lafuente R.; "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques". *Enzyme Microbial Technology*, v. 40, p.1451-1463, 2007.

Mazur, A. W.; Hiler, G. D.; El-Nokaly, M. Process for preparing 2-acylglycerols or 1,2-diacyl diglycerides or 2,3- diacyldiglycerides. Patent, U. S. USA: The Procter & Gamble Company. US 5116745 1992.

McNeill, G.P.; Shimizu, S.; Yamane, T. "Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield of monoglyceride". *Journal of the American Oil Chemists'*

Society, v. 67, p. 779 – 783, 1990.

Melero, J. A.; Morales, G.; Paniagua, M.; Moreno, J. M.; Roldan, R.; Ezquerro, A.; Perez, C. “Acid-catalyzed etherification of bio-glycerol and isobutylene over sulfonic mesostructured silicas”. *Applied Catalysis A: General*, v. 346 (1-2), p. 44-51, 2008.

Menger, F. M.; Yamada, K. “Enzyme Catalysis in Water Pools”. *Journal of the American Chemical Society*, v. 1, n. 36, p. 6731, 1979

Michaux, F.; Zoumpanioti, M.; Papamentzelopoulou, M.; Stébé, M. J.; Blin, J. L.; Xenakis, A. “Immobilization and activity of *Rhizomucor miehei* lipase. Effect of the matrix properties prepared from nonionic fluorinated surfactants”. *Process Biochemistry*, v. 45 (1), p. 39-46, 2010.

Mishra, M. K.; Harini, M.; Kumaraguru, T.; Prasanna, L.; Fadnavis, N. W. “A porous vessel bioreactor for gel entrapped biocatalysts: Kinetic resolution of *trans*-methyl (4-methoxyphenyl)glycidate by Lecitase[®] Ultra in gelatin organogel (Gelozyme)”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 71 (1), p. 56-62, 2011.

Moniruzzaman, M.; Hayashi, Y.; Talukder, Md. M. R.; Saito, E.; Kawanishi, T. “Effect of aprotic solvents on the enzymatic activity of lipase in AOT reverse micelles”. *Biochemical Engineering Journal*, v. 30 (25), p. 237-244, 2006.

Mota C. J.A, Silva P. H. R, Gonçalves L. C. V. “Glycerol acetals as anti-freezing additives for biodiesel. *Bioresource Technology*”, vol. 101, p. 6225-6229, 2010.

Motoki, M.; Seguro, K. “Transglutaminase and its use for food processing”. *Trends in Food Science & Technology* v. 9, 201 – 210, 1998.

Moulik, S. P.; Paul, B. K. “Structure, dynamics and transport properties of microemulsions”. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 78, n. 2, p. 99–195, 1998.

Moura, E. F. Síntese de novos tensoativos aminados do óleo de mamona e estudo de soluções micelares e microemulsionadas na inibição de corrosão de aço-carbono. 233p. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal: DEQ/PPGEQ, 2002.

Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A. „Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs”. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 242, p. 121–128, 2002 A;

Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A. „Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations”. *Advances in Drug Delivery Review*, v. 54, p. S131–S155, 2002B

Nagayama, K.; Katakura, R.; Hata, T.; Naoe, K.; Imai, M. Reactivity of *Cândida rugosa* lipase in cetyltrimethylammonium bromide microemulsion-gelatin complex organogels. *Biochemistry Engineering Journal*, v. 38, p. 274-276, 2008.

Nagayama, K.; Karaiwa, K.; Doi, T. “Esterification activity and stability of *Candida rugosa* lipase in AOT microemulsion-based organogels”. *Biochemical Engineering Journal*, v. 2 , p. 121-126, 1998.

Nam, J.; Park, Y. Lee, H. B. “Cloning, expression, purification, and characterization of a thermostable esterase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 94, p. 95-103, 2013.

Naoe, K.; Ohsa, T.; Kawagoe, M.; Imai, M. “Esterification by *Rhizopus delemar* lipase in organic solvent using sugar ester reverse micelles”. *Biochemical Engineering Journal*, v. 9, p. 67–72, 2001.

Naoe, K.; Awatsu, S.; Yamada, Y.; Kawagoe, M., Nagayama, K.; Imai, M. Solvent condition in triolein hydrolysis by *Rhizopus delemar* lipase using an AOT reverse micellar system. *Biochemical Engineering Journal*, v. 18(1), p. 49-55, 2004.

Nakajima-Kambe, T.; Edwinoliver, N. G.; Thirunavukarasu, K.; Gowthaman, M. K.; Masaki, K.; Mahalingam, N. R. “Purification, cloning and expression of an *Aspergillus niger* lipase for degradation of poly(lactic acid) and poly(ϵ -caprolactone)”. *Polymer Degradation and Stability*, v. 97(2), p. 139-144, 2012.

Neang, P. M.; Subileau, M.; Perrier, V.; Dubrecq, E. “Peculiar features of four enzymes of the CaL A superfamily in aqueous media: Differences in substrate specificities and abilities to catalyze alcoholysis”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 94, p. 36-46, 2013.

Nitschke, M.; Pastore, G. M., “Biosurfactantes: propriedades e aplicações”. *Química Nova*, v. 25, p. 772-776, 2002.

Noureddini, H; Medikonduru, V. “Glycerolysis of Fats and Methyl Esters”. *Journal of the American Oil Chemists' Society* v. 74, p. 419 – 425, 1997.

Novo Nordisk, “Lipozyme[®] IM”, *Product sheet*, B 347 C-GB 200, 1992 a.

Novo Nordisk, “Novozym[®] 435”, *Product sheet*, B 606 C-GB 200, 1992 b.

Novo Nordisk, “Lipozyme[®] RM IM”, *Product sheet*, B 347 D-GB, 1999.

Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M. “The α/β hydrolase fold”. *Protein Engineering*, v. 5, n. 3 , 197– 211, 1992.

Papadimitriou, V., Petit, C., Cassin, G., Xenakis, A. and Pileni, M.P. Lipase catalyzed esterification in AOT reverse micelles: a structural study. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 54, p. 1-16, 1995.

Papadimitriou, V.; Tzika, E. D.; Pispas, S.; Sotiroidism T. G.; Xenakis, A. Microemulsions based on virgin olive oil: A model biomimetic system for studying native oxidative enzymatic activities. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 382 (1-3), p. 232-237, 2011.

Paques F. W.; Macedo G.A.; “Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais”. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

Pawongrat, R.; Xu, X.; H-Kittikun, A. “Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK” . *Food Chemistry*, v. 104, p. 251-258, 2007.

Pereira, C.; Silva, M.; Langone, M. A. P. “Enzymatic synthesis of monolaurin”. *Applied biochemistry and biotechnology* v. 7, p. 433 – 445, 2004.

Petit, C.; Zemb, Th.; Pileni, M. P. C. Petit, Th. “Structural study of microemulsion-based gels at the saturation point”. *Langmuir*, v. 7, p. 223-231, 1991.

Pileni, P.; Zemb, T.; Petit, C. “Solubilization by reverse micelles: solute localization and structure perturbation”. *Chemical Physical Letters*, v. 118, p. 414-420, 1985.

Pilissao, C.; Carvalho, P. O.; Nascimento, M. G. “Enantioselective acylation of (*RS*)-phenylethylamine catalysed by lipases”. *Process Biochemistry*, v. 44 (12), p. 1352-1357.

Pouilloux, Y.; Métayer, S.; Barrault, J. “Synthesis of glycerol mono-octadecanoate from octadecanoic acid and glycerol. Influence of solvent on the catalytic properties of basic oxides”. *Chemistry* v. 3, p. 589–594, 2000.

Quellet, C.; Eicke, H. F.; Sager, W. “Formation of microemulsion-based gelatin gels”. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 95, p. 5642-5655, 1991.

Raita, M.; Laothanachareon, T.; Champreda, V.; Laosiripojana, N. “Biocatalytic esterification of palm oil fatty acids for biodiesel production using glycine-based cross-linked protein coated microcrystalline lipase”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 73 (1-4), p. 74-79, 2013.

Ramirez-Silva, L.; Gomez-Puyou, M. T.; Gomes-Puyou, A. Water-induced transitions in the potassium requirements for the activity of pyruvate kinase entrapped in reverse micelles. *Biochemistry*, v. 32 (20), p. 5332-5338, 1993.

Rao, N. N.; Lutz, S. Wurges, K. Monoir, D. “Continuous Biocatalytic Processes”. *Organic. Process Research and Development*, v 13 (3), p. 607-616, 2009.

Ray, J.; Nagy, Z. K.; Smith, K. W.; Bhagga, K. Stapley, A. G. F. “Kinetic study of the acidolysis of high oleic sunflower oil with stearic–palmitic acid mixtures catalysed by immobilised *Rhizopus oryzae* lipase”. *Biochemical Engineering Journal*, v. 73, p. 17-28, 2013.

Reddy, P. S.; Sudarsanam, P.; Mallesham, B.; Raju, G.; Reddy, B. M. “Acetalisation of glycerol with acetone over zirconia and promoted zirconia catalysts under mild reaction conditions”. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v.17, p. 377-381, 2011.

Rees, G. D.; Nascimento, M. G.; Jenta, T. R. J.; Robinson, B. H. "Reverse enzyme synthesis in microemulsion-based organo-gels". *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1073, p. 493-501, 1991.

Reetz, M.T.; "Lipases as practical biocatalysts". *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 6, n. 2, p. 145-150, 2002.

Reis, M. F. T.; Bonomo, R. C. F.; de Souza, A. O.; da Silva, L. H. M.; Veloso, C. M.; Minim, L. A.; Fontan, R. C. I. "Calorimetric studies of microemulsion systems with lecithin, isooctane and butanol". *Food Research International*, v. 49 (2), p. 672-676, 2012.

Rhee, J. S. & Yang, D. Continuous Hydrolysis of Olive Oil by Immobilized Lipase in Organic Solvent. "*Biotechnology and Bioengineering*", v. 40 (6), p. 748-750, 1992.

Richetti, A. "Esterificação Enzimática de Palmitato de 2-etilexila em Sistema Livre de Solvente". Tese de Doutorado, EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

Roche, C. J.; Dantsker, D.; Heller, E. R.; Sabat, J. E.; Friedman, J. M. Reverse Micelles as a tool for probing solvent modulation of protein dynamics: "Reverse encapsulated hemoglobin". *Chemical Physics*, In Press, Corrected Proof, 2013.

Romero, C. M.; PEra, L. M.; Loto, F.; Vallejos, C.; Castro, G.; Baigori, M. D. "Purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Aspergillus niger* MYA 135 and its application in ester synthesis". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v (1), p. 25-31, 2012.

Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R. "Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* v. 64, p. 1–22, 2010.

Ruela, H. S. ; Sutili, F. K. ; Leal, I. C. R. ; Carvalho, N. M. F. ; Miranda, L. S. M. ; de Souza, R. O. M. A. "Lipase-catalyzed synthesis of secondary glucose esters under continuous flow conditions". *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 115, p. 464-467, 2013.

Segel, I. H. Enzyme Kinetics, 1º edição, p. 819-822. Ed. Wiley-Interscience, New York, USA, 1975.

Shen, Y.; Powell, R. L.; Longo, M. L. "Interfacial and stability study of microbubbles coated with a monostearin/monopalmitin-rich food emulsifier and PEG40 stearate". *Journal of Colloid and Interface Science* v. 321, p. 186–194, 2008.

Ruckenstein, E. & Karpe, P. "Enzymatic Super- and Subactivity in Nonionic Reverse Micelles". *The Journal of Physical Chemistry*, v. 95, p. 4869–4882, 1991

Ruiz, M.; Galvis, M.; Barbosa, O.; Ortiz, C.; Torres, R.; Fernandes-Lafuente, R. "Solid-phase modification with succinic polyethyleneglycol of aminated lipase B from *Candida antarctica*: Effect of the immobilization protocol on enzyme catalytic properties". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 87, p. 75-82, 2013.

Saadi, A. A.; Ariffin, H. M.; Ghazali, M. S.; Miskandar, S. M.; Abdulkarin, H. C. "Reverse Micelles: An alternative to organic reactions". *Journal of Food Science*, v. 76, p. 21-31, 2011.

Sarda L., Desnuele P.; "Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion". *Biochimica et Biophysica Acta*, v.58, p. 513-521, 1958.

Schroder, R.; Oba, K. Method for continuous preparation of highly pure monoglyceride. Patent, U. S. USA: Lion Corporation. US 5153126 1992

Secundo, F.; Carrea, G.; Tarabiono, C.; Gatti-lafranconi, P.; Brocca, S.; Lotti, M.; Jaeger, K. - E.; Puls, M.; Eggert, T. "The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 39, n. 1-4, p. 166-170, 2006.

Serri, N. A.; Kamaruddin, A. H. e Long, W. S. "Studies of reaction parameters on synthesis of Citronellyl laurate ester via immobilized *Candida rugosa* lipase in organic media". *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 29 (4), p. 253-260, 2006.

Shimizu M., Moriwaki J., Nishide T., Nakajima Y. "Thermal deterioration of diacylglycerol and triacylglycerol oils during deep-frying". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81, 571-576, 2004.

Shome, A., Roy, S., and Das, P. K. Nonionic surfactants: A key to enhance the enzyme activity at cationic reverse micellar interface. *Langmuir*, v. 23 (8), p. 4130-4136, 2007.

Silva, J.E. S., Jesus, P.C. "Evaluation of the catalytic activity of lipases immobilized on chrysotile for esterification", *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 75, n. 2, pp. 157-162, 2003.

Silva, M. M., Medeiros, V. C.; Langone, M. A. P.; Freire, D. "Synthesis of monocaprin catalyzed by lipase". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p. 757 - 768, 2007.

Sisak, C.; Csanadi, Z.; Ronay, E.; Szajani, B. "Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase". *Enzyme and Microbial Technology* v. 39, 1002 - 1007, 2006.

Sjöblom, I. & Kralova, I. "Surfactants used in food industry: a review". *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 30 (9), 1363-1383, 2009.

Szelag, H.; Zwierzykowski, W. S. "The behaviour of modified monoacylglycerol emulsifiers in emulsion systems". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 155 (2-3), p. 349-357, 2010.

Song, X.; Qi, X.; Qu, Y. "Resolution of (R,S)-(±)-glycidyl butyrate with immobilized Y-11 *Trichosporon capitatum* lipase in gelatin-containing microemulsion-based organogels". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 67 (1), p. 127-131, 2008.

Souza, M.S.; Aguiéiras, E. C. G.; Silva, M. A. P.; Langone, M. A. P. “Biodiesel Synthesis via Esterification of Feedstock with High Content of Free Fatty Acids”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 154, p. 253-267, 2009.

Stamatis, H.; Xenakis, A.; Kolisis, F. N. “Enantiomeric selectivity of a lipase from *Penicillium simplicissimum* in the esterification of menthol in microemulsions”. *Biotechnology Letters*, v. 15, p. 471-476, 1993.

Stamatis, H.; Xenakis, A.; Kolisis, F. N. “Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases”. *Biotechnology Advances*, v. 17, p. 293–318, 1999.

Stergiou, P.; Foukis, A.; Fillipou, M.; Koukouritaki, M.; Parapoul, M.; Theodorou, L. G.; Hatziloukas, E.; Afendra, A.; Pandey, A.; Papamichel, E. “Advances in lipase-catalysed esterification reactions”. *Biotechnology Advances*, In Press, Uncorrected Proof, 2013

Stoscheck, C. M. “Increased uniformity in the response of the Coomassie blue G protein assay to different proteins”. *Analytical Biochemistry*, v. 184, p. 111-116, 1990.

Sutili, F.K.; Leal, I. C. R.; de Souza, R.O.M.A.; Miranda, L. S. M.; Leite, S. G. F.; Ruela, H. S. “Lipase-catalyzed esterification of steric hindered fructose derivative by continuous flow and batch conditions”. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, v. 85-86, p. 37-42, 2013.

Takeo, N.; Shimotoyodome, A.; Meguro, S. Inhibitor of increase in postprandial blood insulin. Patent, U. S. USA: Kao Corporation. US 2009/0124691 A1 2009.

Tamayo, J. J.; Ladero, M.; Santos, V. E.; García-Ochoa, F. Esterification of benzoic acid and glycerol to α -monobenzoate glycerol in solventless media using an industrial free *Candida antarctica* lipase B. *Process Biochemistry*, v. 47; (2), p. 243-250, 2012.

Tamjidi, F.; Shahedi, M.; Jaleh, V. Nasirpour, A. “Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules”. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 19, p. 29-43, 2013.

Tang, S. L. Y.; Smith, R. L.; Poliakoff, M. “Principles of green chemistry: Productively”. *Green Chemistry* v. 7, p 761-762, 2005.

Tapas, T. K. & Maitra, A. “Solution behaviour of Aerosol OT in non-polar solvents”. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 59, p. 95–193, 1995

Thakar, A.; Madamwar, D. A. “Enhanced ethyl butyrate production by surfactant coated lipase immobilized on silica”. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3263-3266, 2005.

Thanki, K.; Gangwal, R. P.; Abhay, T.; Sangamwar, T.; Jain, S. Oral delivery of anticancer drugs: Challenges and opportunities. *Journal of Controlled Release*, v 170 (1), p. 15-40, 2013.

Tramper, J.; Vermue, M.H.; Beefink, H.H.; Von Stockar, U. “Biocatalysis in non-conventional media”. 1^oed., Cap 2, p 35-55. Elsevier Science Publ., Amsterdam, The Netherlands, 1992.

Trivedi, R.; Singh, R. P. “Modifications of oils and fats to produce structured lipids”. *Journal of oil science*, v. 54, p. 423 – 430, 2005.

Tüter, M.; Aksoy, H. A. “Solvent-free glycerolysis of palm and palm kernel oils catalyzed by commercial 1,3-specific lipase from *Humicola lanuginosa* and composition of glycerolysis products”. *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 31–34, 2000.

Uppenberg, J.; Oehrner, M.; Hult, K.; Hult, K.; Kleywegt, G. J.; Patkar, S.; Waagen, V.; Anthonsen, T. Jones, T. “Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols”. *Biochemistry*, v. 34 (51), p. 16838-16851;

Urban, M.C.C. Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea de acetato de dexametasona. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

Uskoković, V.; Drofenik, M. “Reverse micelles: inert nano-reactors or physico-chemically active guides of the capped reactions”. *Advances in Colloid Interface Science*, v. 133, p. 23-24, 2007.

Verger R.; “‘Interfacial activation’ of lipases: facts and artifacts”. *Trends in Biotechnology*, v. 15, p. 32-38, 1997.

Villeneuve P., Muderhwa J. M., Graille J., Haas M. J.; “Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, p. 113-148, 2000.

Wang, X.; Sun, Y.; Shen, X.; Ke, F.; Zhao, H.; Liu, Y.; Xu, L.; Yan, Y. “Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves production of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 in a recombinant *Pichia pastoris*”. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 50 (1), p. 22-28, 2012.

Waraho, T.; Vladimiro, C.; Yudai, N.; Kapila, N.; Decker, E. A. “Antioxidant effects of mono- and diacylglycerols in non-stripped and stripped soybean oil-in-water emulsions”. *Food Research International*, v. 48 (2), p. 353-358, 2012.

Wegner, J.; Cevlan, S.; Kirschning, A. Ten key issues in modern flow chemistry. *Chemical Communication*, v. 47, p. 4583-4592, 2011.

Whitesides, G. M. “The origins and the future of microfluidics,” *Nature*, v. 442, n. 7101, pp. 368–373, 2006.

Wiles, C. e Watts, P. Continuous Flow Reactors, a Tool for the Modern Synthetic Chemist. *European Journal of Organic Chemistry*, v. 2008 (10), p. 1655-1671, 2008.

Wulff-Pérez, M.; Martin-Rodrigues, A.; Galvez-Ruiz, M. J. “Controlling lipolysis through steric surfactants: New insights on the controlled degradation of submicron emulsions after

oral and intravenous administration”. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 423 (2), p. 161-166, 2012.

Xenakis, A., Stamatis, H., Kolisis, F.N., Malliaris A. „Effect of alcohols on the structure of AOT reverse micelles with respect to different enzyme activity.” **Progress in Colloid Polymer Science**, v. 93, p. 373-376, 1993.

Xenakis, A., Avramiotis S., Papadimitriou, V., Cazianis, C.T. “EPR studies of proteolytic enzymes in microemulsions”. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 144, 295–304, 1998.

Xenakis, A.;A. Xenakis, V. Papadimitriou, H. Stamatis, F.N. Kolisis. Biocatalysis in microemulsions. M. Fanun (Ed.), Microemulsions: properties and applications, Surfactant Science Ser., v. 144, Taylor and Francis/CRC Press, Boca Raton (2009), p. 349–385

Xue, L.; Zhao, Y.; Yu, L.; Yanwen, S.; Yan, K.; Li, Y.; Huang, X.; Qu, Y. Choline acetate enhanced the catalytic performance of *Candida rugosa*. Lipase in- AOT reverse micelles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105 (1), p. 81-86, 2013.

Yadav, G. D. & Borkar, I. V. “Lipase -catalyzed hydrazinolysis of phenyl benzoate: Kinetic modeling approach”. **Process Biochemistry**, v. 45 (4), p. 586-592, 2010.

Yadav, G. D. & Lathi, P. S. “Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: kinetic studies”. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27 (2-3), p. 113–119, 2004.

Yadav, G. D. & Devi, K. M. “Enzymatic synthesis of perlauric acid using Novozym 435”. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10 (2), p. 93 – 101;

Yang Z.; Russell A.J. ”Fundamentals of non-aqueous enzymology”. In: Koskinen A. M. P., Klibanov A. M., Enzymatic reactions in organic media. London Blackie Academics and Professional, p.43-69, 1996.

Yahmada, Y.; Kuboi, R.; Komasa, I. “Increased activity of chromobacterium viscosum lipase in aerosol OT reverse micelles in the presence of nonionic surfactants”. **Biotechnology Progress**, v. 9. P. 468-472, 2003.

Yang, Y.-C.; Rebsdorf, M.; Engelrud, U.; Xu, X. “Monoacylglycerol synthesis via enzymatic glycerolysis using a simple and efficient reaction system”. **Journal of Food Lipids**, v. 12, p. 299-312, 2005.

Yao, C.; Tang, S.; Zhang, J.; Yu, Y. “Kinetics of lipase deactivation in AOT/isooctane reversed micelles”. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 18, p. 279–284, 2002.

Yuzbashev, V. T.; Yusbasheva, E. Y.; Vibornaya, T. V.; Sobolevskaya, T. I.; Laptev, I. A.; Gavrikov, A. V.; Sineoky, S. P. “Production of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase by the yeast *Yarrowia lipolytica* results in increased enzymatic thermostability”. **Protein Expression and Purification**, v. 82 (1), p. 83-89, 2012.

Zaia, D. A. M.; Zaia, C. T. B. V.; Lichtig, J. “Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes”. *Química Nova*, v. 21(6), P. 787-793, 1998.

Zaks, A. “New enzymatic properties in organic media” In: *Enzymatic reactions in organic media*, Eds: Koskinen e Klibanov, Ed.Blackie academic & professional, Great Britain, 1996.

Zhao, Y.; Liu, J.; Deng, Li; Wang, F.; Tan, T. “Optimization of *Cândida* sp. 99-125 lipase catalyzed esterification for synthesis of monoglyceride and diglyceride in solvent-free system”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 72 (3-4), p. 157-162, 2011.

Zheng, Y.; Chen, X.; Shen, Y. “Commodity chemicals derived from glycerol, an important biorefinery feedstock”. *Chemical Reviews*, v. 108 (12), p. 5253-5277, 2008.

Zhou, G. W.; Li, J.; Xu, J.; Sheng, Q. G.W. Zhou, G.Z. Li, J. Xu, Q. Sheng. “Kinetic studies of lipase-catalyzed esterification in water-in-oil microemulsions and the catalytic behavior of immobilized lipase in MBGs”. *Colloids and Surfaces. A : Physicochemical. Engineering Aspects*, v. 194, p. 41-47, 2001.

Zimmermann A.; “Aplicação de resolução enzimática na síntese estereoseletiva de feromônios de agregação de insetos praga de palmáceas”. Tese de mestrado em Ciências Químicas, Universidade Federal do Paraná, pp. 102, 2005

Zoumpanioti, M.; Parmaklis, P.; de Maria, P. D.; Stamatis, H.; Sinistera, J. V.; Xenakis, A. P. Parmaklis, P. Dominguez de Maria, H. Stamatis, J.V. Sinistera, A. Xenakis. “Esterification reactions catalyzed by lipases immobilized in organogels. Effect of temperature and substrate diffusion”. *Biotechnology Letters*, v. 30, p. 1627-1631, 2008.

Zoumpánioti, M., Stamatis, H., Papadimitriou, V., & Xenakis, A. “Spectroscopic and catalytic studies of lipases in ternary hexane-1-propanol-water surfactantless microemulsion systems”. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, v. 47 (1), p. 1-9, 2006.

Zoumpánioti, M.; Stamatis, H.; Xenakis, A. “Microemulsion-based organogels as matrices for lipase immobilization”. *Biotechnology Advances*, v. 28 (3), p. 395-406, 2010.

<http://www.bccresearch.com/report/BIO030F.html>, 2012 – acessado em Setembro, 2012.

<http://www.thalesnano.com/products/catcart> acesso: Março 2013.

APÊNDICE A:

Métodos Cromatográficos e Cromatogramas Ilustrativos

Nesta seção, será mostrada a curva de calibração realizada para a quantificação de ácido esteárico em algumas nas amostras em tempo inicial de reação, assim como ao fim do process, de modo a se certificar do método de Lowry-Tinsley para o cálculo das conversões. Além disto, exemplos de cromatogramas obtidos para estas reações, assim como para o RAG também serão mostrados, assim como alguns perfis cromatográficos obtidos nas reações em sistemas microemulsionados em AOT/Isso-octano, através da técnica de CG-FID, realizadas na etapa de colaboração internacional no Nacional Hellenic Research Foundation, em Atenas, Grécia.

AI - Curva de Calibração do AE

A fim de se obter uma quantificação do ácido esteárico presente nas reações iniciais e produtos finais de esterificação, para a formação de MEP, como forma de conferir a validade do método de Lowry-tinsley, diluições do AE em n-heptano, nas concentrações de 0,10; 0,50; 1,0; 5,0; 10mg/ml, foram analisadas via CG-EM, como descrito na seção experimental, a fim de se construir uma curva de calibração.

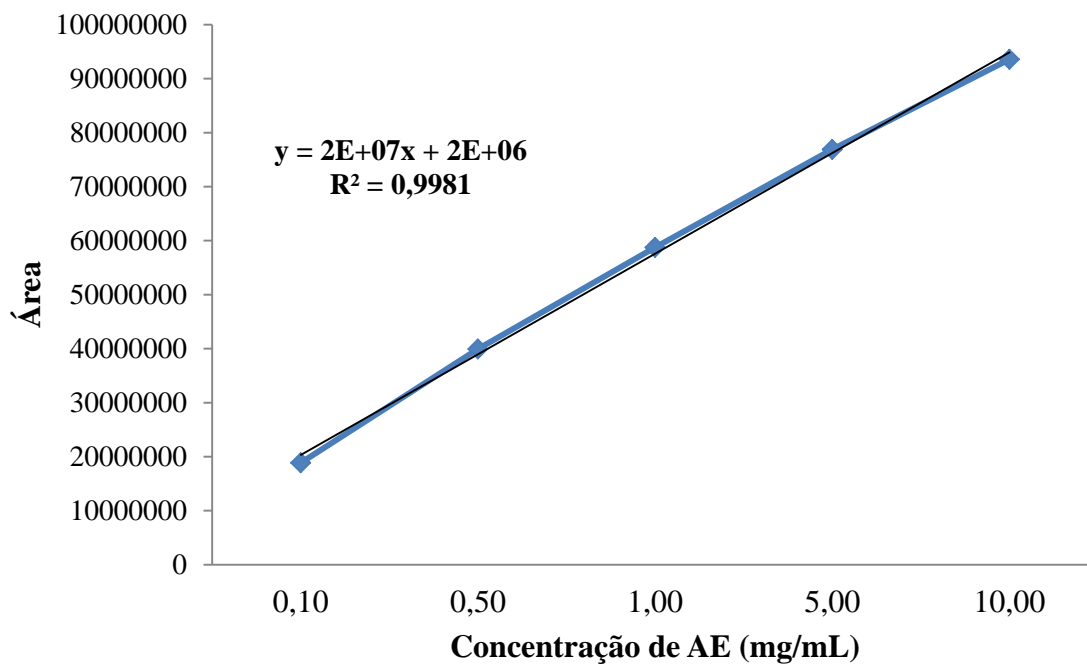


Figura A 1: Curva de calibracao do ácido esteárico

A2 – Cromatogramas Ilustrativos

A seguir, alguns cromatogramas ilustrativos, obtidos nas etapas de maiores conversões em produtos, são mostrados:

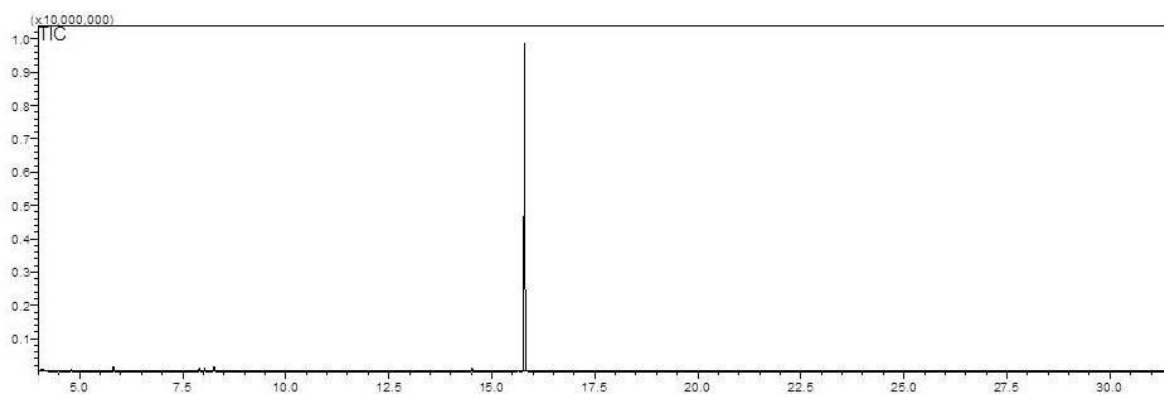


Figura A 2: Cromatograma do Ácido Esteárico, denotando tempo de retenção em 15,76min.

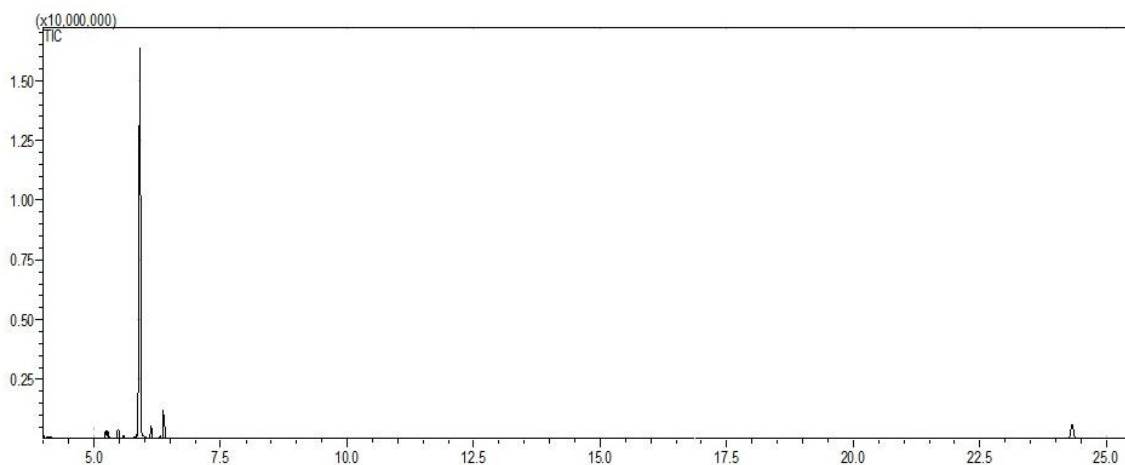


Figura A 3: Cromatograma do IPG, denotando tempo de retenção em 5,96 minutos.

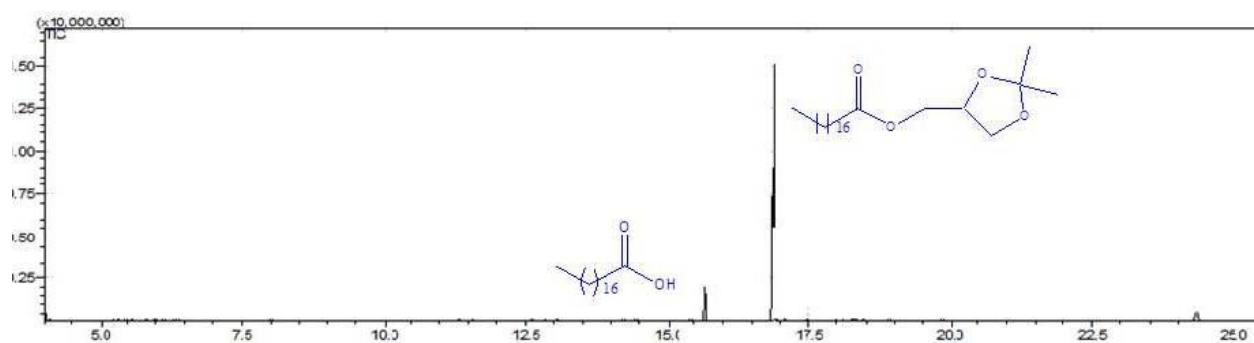


Figura A 4: Cromatograma da reação de formação de MEP em altas concentrações de substratos sob condições de fluxo contínuo. AE:IPG 1:1 (2,5M), 60°C e fluxo de 0,1 mL/min, evidenciando pequenas quantidades de AE e ausência de IPG.

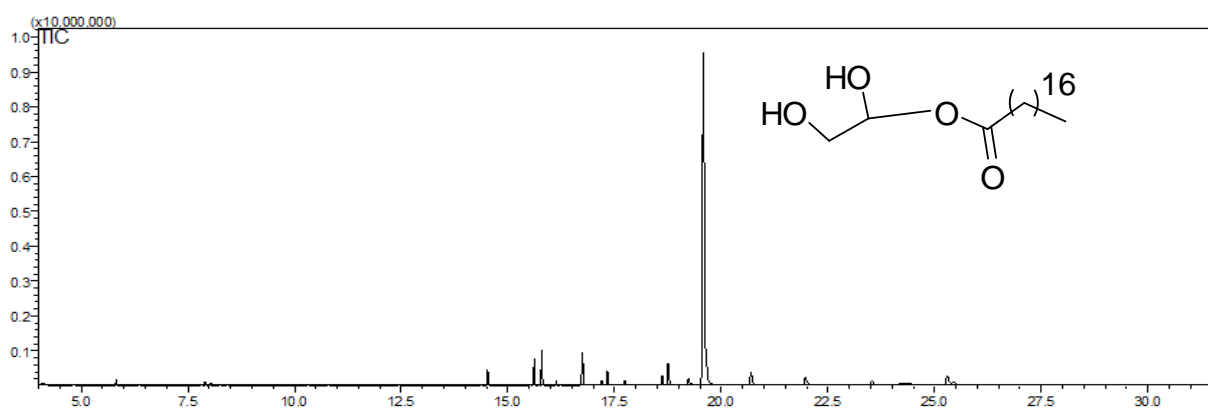


Figura A 5: Cromatograma da Reação de formação de MONOEST, oriunda da quebra do acetal presente na MEP.

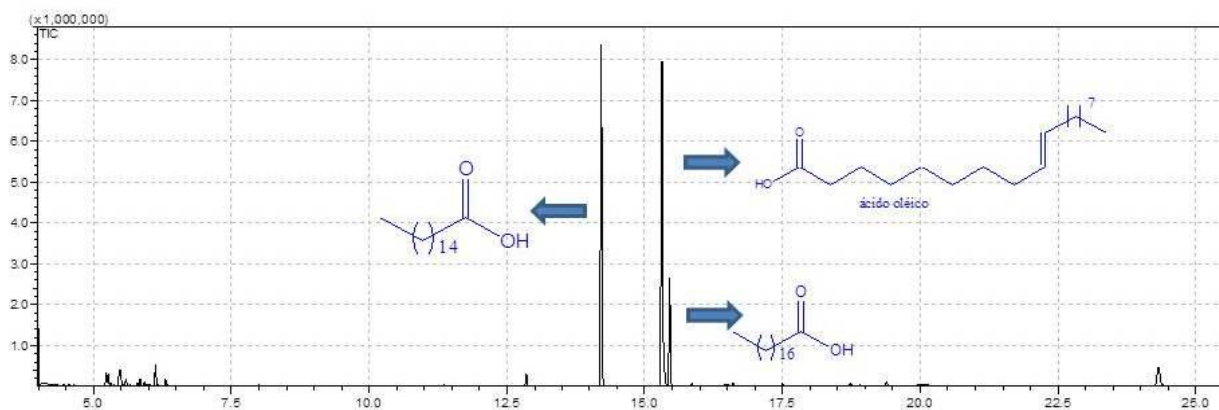


Figura A 6: Cromatograma do RAG, demonstrando a presença dos ácidos Palmítico, esteárico e oleico.

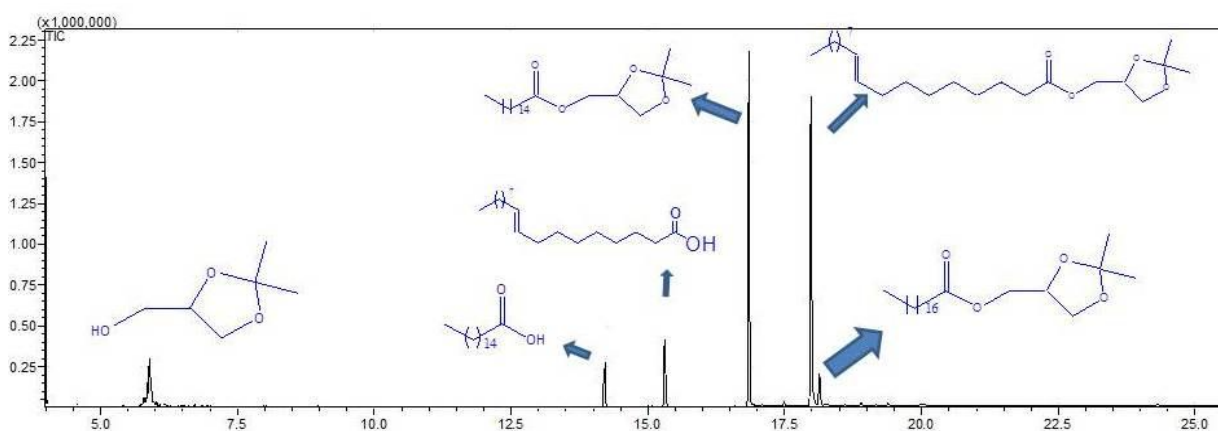


Figura A 7: Cromatograma da reação de formação de MRAG, obtido sob condições de fluxo contínuo. Condições: IPG e RAG 1:1 (1,5mol/L em n-heptano), 60°C, 0,1mL/min.

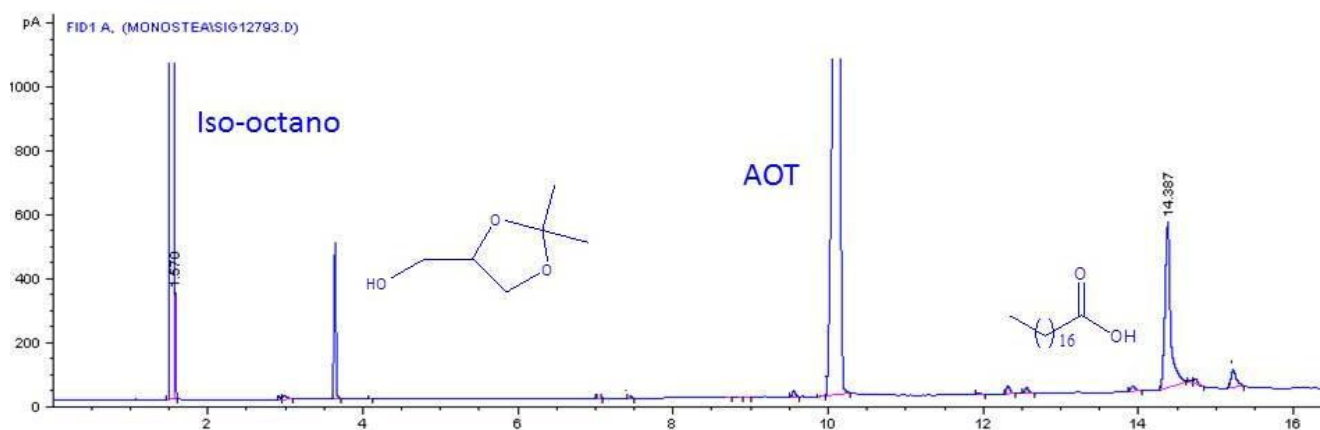


Figura A 8: Cromatograma de CG-FID do início da reação de formação de MRAG, catalisada pelo sistema de microemulsão em AOT/Iso-octano contendo a lipase CaLB sob condições de fluxo contínuo. Condições: IPG e RAG 1:1 (1,5mol/L em n-heptano), 60°C, 0,1mL/min.

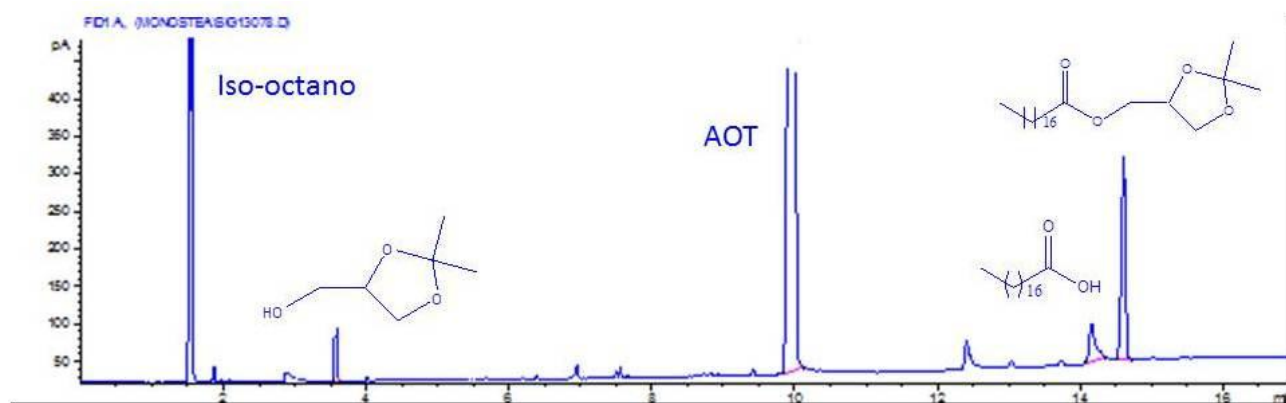


Figura A 9: Cromatograma do melhor resultado obtido em microemulsões AOT/Iso-octano

APÊNDICE B:

Detalhamento dos Resultados

Neste apêndice, serão demonstrados os detalhamentos dos resultados obtidos nos estudos para a formação dos MAGs de estudo.

Tabela B 1: Resultados experimentais obtidos na investigação inicial de lipases na reação de esterificação do AE com o IPG com enzimas livres. Condições: AE (75mM) e IPG (150mM) 2:1 em n-heptano, 250 rpm, 60°C, lipases 1% p/p ou p/v.

Tempo (min)	Conversão (%)			
	TL	RM	CaL B	PS
0	0	0	0	0
5	2,1	2,4	0,37	0,9
10	2,5	4,6	1,01	1,2
15	5,5	17,7	1,9	1,2
30	17,1	24,4	2,3	0,94
45	21,7	33,4	2,3	1,07
60	24,9	41,5	23,4	1,04

Tabela B 2: Resultados experimentais obtidos na investigação inicial de lipases na reação de esterificação do AE com o IPG com enzimas imobilizadas. Condições: AE (75mM) e IPG (150mM) 2:1 em n-heptano, 250 rpm, 60°C, lipases 1% p/p.

Tempo (min)	Conversão (%)			
	TL IM	RM IM	N435	PSIM
0	0	0	0	0
5	30,52	27,46	50,48	4,54
10	48,55	40,98	56,77	5,63
15	63,92	59,78	63,06	8,1
30	68,82	62,97	72,94	8,83
45	69,69	67,19	74,28	9,22
60	79,12	71,47	76,85	9,75

Tabela B 3: Resultados obtidos para a cinética de produção enzimática do MEP em n-heptano, catalisada pelas lipases RM IM e TL IM. Condições: AE (75mM) e IPG (150mM) 2:1 em n-heptano, 250 rpm, 60°C, lipases 1% ou p/v.

Tempo reacional (min)	Conversão, %	
	RM IM	TL IM
0	0	0
1	2	2
2	4	4
3	7	7
4	9	10
5	13	13
10	15	14
11	18	17
12	21	19
13	22	21
14	24	25
15	26	28
30	37	42
45	50	56
60	72	79
120	93	88
240	94	91
300	94	93
360	94	93

Tabela B 4: Resultados experimentais obtidos para a cinética de reação de formação do MEP catalisada pela lipase RM IM em diversos solventes. Condições: AE:IPG 1:2, 60°C, 250 rpm.

Tempo reacional (min)	Conversão, %			
	Iso-octano	Ciclo-Hexano	n-Hexano	n-Heptano
0	0	0	0	0
1	1,87	1,38	1,47	2
2	3,74	2,65	2,89	4
3	6,54	4,87	5,04	7
4	8,41	5,94	6,35	9
5	12,15	8,98	9,44	13
10	14,02	10,45	11,02	15
11	16,82	11,24	12,35	18
12	19,62	13,45	14,27	21
13	20,56	14,52	15,32	22
14	22,42	18,27	17,2	24
15	24,29	19,2	18,2	26
30	34,57	25,17	26	37
45	46,72	38,77	40	50
60	67,28	51,21	53	72

120	86,91	68,41	71	93
240	87,85	74	77	94
300	87,85	74	77	94
360	87,85	74	77	94

Tabela B 5: Resultados experimentais obtidos para a cinética de reação de formação do MEP catalisada pela lipase RM IM em diversos solventes. Condições: AE:IPG 1:2, 60°C, 250 rpm.

Tempo reacional (min)	Conversão, %			
	n-heptano	Ciclo-Hexano	n-Hexano	Isso-octano
0	0	0	0	0
1	2	1	1,38	1,76
2	4	2	2,65	3,62
3	7	3	4,87	6,41
4	10	4	5,99	8,1
5	13	7	8,78	11,44
10	14	8	10,24	13,41
11	17	9	11,78	16,14
12	19	11	13,54	19,01
13	21	12	14,74	19,24
14	25	16	16,14	21,47
15	28	17	17,52	23,1
30	42	24	24	33,01
45	56	36	38	45,77
60	79	50	48	65,1
120	88	66	68	84
240	91	71	68	84
300	93	72	68	86
360	93	73	69	83

Tabela B 6: Efeito da razão molar sobre a conversão de monoestearato de IPG, catalisada pela lipase RM IM à temperatura de 60°C, concentração de enzima de 1% (p/v) e agitação de 250 rpm.

Tempo Reacional (min)	Conversão, %		
	Razão molar 1:1	Razão molar 2:1	Razão molar 3:1
0	0	0	0
1	2	1	0,5
2	5	1,7	1
3	7	3,5	2
4	9	4,5	3
5	13	6	4
10	15	7,2	6
11	18	9	8
12	20	11	9

13	22	13	10
14	24	16	12
15	26	19	13
30	41	33	25
45	60	48	33
60	78	62	44
120	93	75	62
180	94	79	66
240	94	81	68
300	94	82	68
360	94	81	68

Tabela B 7: Efeito da razão molar sobre a conversão de monoestearato de IPG, catalisada pela lipase TL IM à temperatura de 60°C, concentração de enzima de 1% (p/v) e agitação de 250 rpm.

Tempo Reacional (min)	Conversão, %		
	Razão molar 1:1	Razão molar 2:1	Razão molar 3:1
0	0	0	0
1	2	1,54	1,1
2	4	3,08	2,3
3	7	5,39	3,5
4	10	7,7	4,9
5	13	10,01	5,7
10	14	10,78	6,8
11	17	13,09	7,9
12	19	14,63	9,4
13	21	16,17	10,28
14	25	19,25	12,33
15	28	21,56	14,65
30	50	38,5	28
45	69	48	35
60	82	64	45
120	87	77	56
180	91	81	61,88
240	93	80	63,24
300	93	81	63,24
360	93	81,3	62,95

Tabela B 8: Reciclos possíveis para a enzima RM IM e conversões obtidas na reação de formação do MEP, em condições de batelada, com agitação orbital (em shaker), juntamente com a avaliação da quantidade de proteínas lixiviadas para o meio reacional em cada ciclo. Condições: AE:IPG 1:1 (53,6mM), 58,5°C, 225rpm. Quantidade de proteínas doseada pelo método de Bradford (1976).

Reciclos	Conversão (%)	Quantidade de Proteína Lixiviada (mg)
1	94,7	0
2	92,23	0
3	92,09	0
4	91,14	0
5	90,96	0
6	90,19	0
7	90,06	0
8	88,27	0,41
9	85,4	0,60
10	75,29	0,98
11	63,18	1,29
12	54,21	2,49
13	45,4	3,18
14	32,2	3,90
15	25,7	4,18
16	15,9	5,21
17	13,3	6,59
18	6,35	7,54
19	5,37	8,37
20	2,14	8,54

Tabela B 9: Monitoramento da reação de formação da MEP catalisada pela enzima RM IM em reator (CSTR) Easy-max, Mettler Toledo. Condições: AE:IPG 1:1 (53,6mM), 58,5°C, 225rpm.

Tempo Reacional (h)	Conversão (%)
0	0,00
1	89,56
2	91,16
3	92,84
4	93,81
5	93,76
6	93,69

Tabela B 10: Avaliação de reciclos e lixiviação de proteínas. para o meio reacional em cada ciclo. Condições: AE:IPG 1:1 (53,6mM), 58,5°C, 225rpm. Quantidade de proteínas doseada pelo método de Bradford (1976).

Reciclos	Conversão, %	Quantidade de Proteína (mg)
1	95,25	0
2	95,14	0
3	94,44	0
4	91,45	0
5	89	0
6	85	0
7	81	0,45
8	79	0,88
9	73,12	1,32
10	59,34	5,44
11	45,31	12,24
12	32,89	48
13	18	55
14	10,15	64
15	2,65	77
16	0,2	82,3

Tabela B 11: Resultados obtidos para a atividade residual do sobrenadante, de acordo com a concentração de Triton X-100 utilizada no ensaio de dessorção da lipase RM IM de seu suporte, segundo a metodologia descrita por Cabrera et al, 2008.

Concentração de Triton X-100 (%)	Atividade Residual do Sobrenadante (%)
0	0
0,5	10,2
1	30,4
1,5	70,45
2	90,12
2,5	100

Tabela B 12: Reciclos possíveis e quantidade de proteínas presente no sobrenadante na reação de formação de MEP em altas concentrações de substratos sob condições de fluxo contínuo. AE:IPG 1:1 (2,5M), 60°C e fluxo de 0,1 mL/min.

Reciclos	Conversão (%)	Quantidade de proteínas lixiviadas (mg)
1	95,15	0
2	95,17	0
3	95,02	0
4	94,9	0
5	94,31	0
6	94,12	0
7	93,87	0
8	93,2	0
9	93,09	0
10	92,09	0
11	91,08	0
12	91,16	0
13	90,22	0
14	90,01	0
15	89,14	0
16	88,35	0
17	85,37	0
18	80,28	12
19	76,28	16,3
20	72,13	22
21	56,34	27
22	44,26	33,7
23	25,09	40
24	12,22	56,3
25	7,08	67,3
26	1,08	70,8

Tabela B 13: Reciclos possíveis, conversões obtidas e análise da concentração de proteínas nas alíquotas recolhidas na reação de formação do MRAG em condições de fluxo contínuo, catalisada pela lipase RM IM. Condições: IPG e RAG 1:1 (1,5mol/L em n-heptano), 60°C, fluxo de 0,1mL/min.

Reciclo	Conversão (%)	Proteína Lixiviada (mg)
1	90	0
2	90	0
3	89	0
4	89	0
5	90	0
6	90	0
7	90	0
8	90	0
9	90	0
10	90	0
11	90	0
12	90	0
13	90	0
15	90	0
16	90	0
17	90	0
18	90	0
19	90	0
20	90	0
21	84	1,25
22	78	4,32
23	66	5,78
24	52	10,35
25	48	15,68
26	34	35,44
27	28	42,27
28	17	43,34
29	12	45,12
30	5	61,37

Tabela B 14: Efeito da concentração da enzima RM IM (p/v) sobre a conversão do MEP, a razão molar de AE: IPG 1:1, temperatura de 58,5°C, agitação de 250 rpm, em sistema livre de solventes

Tempo Reacional, min	Conversão (%)				
	1% de enzima	3% de enzima	5% de enzima	10% de enzima	15% de enzima
0	0	0	0	0	0
5	2,1	4	9,4	10,3	14
10	3,2	7	14,1	28,3	34
15	5,5	11	23,2	41,5	50
30	13,7	29,14	42,8	72,7	78

60	34,5	51	76,32	83,4	87
120	45	64	84,5	92,15	93
180	55	69	90	93,17	96
240	63	74	96,2	96,5	97,8
300	66	75	95,5	95,2	97
360	65	76,1	95,4	94,23	96,8
420	66	75	94,1	95,3	98,1
480	64	75,4	95,5	97	97,6

Tabela B 15: Efeito da concentração da enzima RM IM sobre a conversão MRAG, a razão molar de RAG: IPG 1:1, temperatura de 58,5°C, agitação de 250 rpm, em sistema livre de solventes

Tempo Reacional, min	Conversão (%)				
	1% de enzima	3% de enzima	5% de enzima	10% de enzima	15% de enzima
0	0	0	0	0	0
5	2,6	4,6	8,6	9,5	12
10	3,8	8,12	13,45	28	34
15	6,5	13,1	21,4	42	50
30	17	33,02	40,21	72	78
60	41	58	74,65	84	87
120	58	73	82,17	86	93
180	70	79	88,64	92,1	96
240	79	85	94,6	96,14	97,8
300	78,21	84	95,14	96,17	97
360	79,3	86,2	96,17	97,21	96,8
420	78,14	85	95,2	96,28	98,1
480	79,17	84,4	95,5	96,44	98,1

Tabela B 16: Resultados das conversões obtidas no Rastreamento inicial das microemulsões em AOT/Iso-octano e em Lecitina/Isopropanol, assim como a comparação com enzimas imobilizadas, para a síntese de MEP. Condições: 0,9mg de lipase (em microemulsões), 1% (p/v) com enzimas imobilizadas; AE e IPG 1:1 (100mm), 40°C.

Tempo Reacional (h)	Sistema Microemulsionado				Enzimas Imobilizadas	
	Lecitina/Isopropanol		AOT/Iso-octano		RM IM	N 435
	CaL	RM	CaL	RM		
0	0	0	0	0	0	0
1	9,13	7,3	70	48	56,3	56,6
2	42	33,8	76,7	69,7	62,9	79,6
3	59	54,5	66,2	64,9	72,4	86,2
4	68,4	57,6	57	60	89,4	96
5	55	50,2	55	54,6	90,24	96

Tabela B 17: Conversões demonstradas no estudo do perfil reacional da microemulsão AOT CaL. Condições: AOT/Iso-octano 0,1M, contendo AE:IPG 1:1 (100mM), 40°C, 0,9mg de lipase CaL B.

Tempo Reacional (min)	Conversão 1	Conversão 2	Conversão 3	Média
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	24,22	24,86	24,54	24,54
2	34,45	34,22	34,34	34,34
3	36,24	36,12	36,18	36,18
4	40,45	40,22	40,34	40,34
5	42,75	42,02	42,39	42,39
7	48,10	48,05	48,08	48,08
10	57,43	57,28	57,36	57,36
15	65,23	62,98	64,11	64,11
30	78,48	78,01	78,25	78,25
45	79,25	79,45	79,35	79,35
60	79,01	78,89	78,95	78,95
90	79,25	79,01	79,13	79,13
120	79,12	79,21	79,04	79,12

Tabela B 18: Resultados obtidos no estudo do efeito da temperatura na conversão demonstrada pela microemulsão AOT/Iso-octano contendo a lipase CaL B para a formação de MEP. Condições: AOT/Iso-octano 1:1 (100mM), 0,9mg de lipase.

Temperatura (°C)	Conversões			
	Conversão 1	Conversão 2	Conversão 3	Média
35	66,35	67,12	67,05	66,84
40	82,65	82,62	82,70	82,66
45	77,05	76,99	77,02	77,02
50	74,85	74,95	74,74	74,85
55	68,98	69,02	69,05	69,02
60	47,12	47,05	47,09	47,09

Tabela B 19: Resultados obtidos no estudo do Efeito da quantidade de água nas taxas iniciais de reação para a formação de MEP, catalisada pela enzima CaL B estruturada em microemulsão AOT/Iso-octano. Condições: AOT/Iso-octano 1:1 (100mM), 0,9mg de lipase, 40°C.

W₀ ([H₂O]/[AOT])	Taxa inicial de Reação (mM/min)
5	2,77
8	4,34
10	6,07
15	8,76
20	13,75

Tabela B 20: Estudo do efeito da da quantidade de enzima na velocidade inicial de formação de MEP, catalisada pela lipase CaL B em microemulsão AOT/Iso-octano, a 40°C, com AE e IPG1 1:1 (100mM).

Quantidade de Lipase CaL B (mg)	Taxa inicial de reação (mM/min)
0,3	6,89
0,45	10,12
0,6	13,15
0,75	17,66
0,9	20,20

Tabela B 21: Conversões encontradas no estudo do Perfil reacional para a reação de formação de MEP catalisada pelo sistema em OG: AE e IPG 1:1 (100mM), 40°C.

Tempo Reacional (min)	Conversão (%)
0	0
5	31
10	43
15	58
20	79
30	92
45	91
50	92
60	91,6
120	90,5

Tabela B 22: Reciclos possíveis e relação com quantidade de proteínas lixiviadas para a reação de formação de MEP catalisada pelo sistema OG em fluxo contínuo, a 0,5 mL/min, 45°C, AE e IPG 1:1 (500mM) em n-heptano.

Reciclos	Conversão (%)	Quantidade de Proteína Lixiviada (mg)
1	92	0
2	92	0
3	92	0
4	91	0
5	91	0
6	92	0

7	92	0
8	91	0
9	91	0
10	90	0
11	91	0
12	91	0
13	92	0
14	91	0
15	91	0
18	85	1
19	81	2
20	65	3,4
21	43	4,5
22	23	6,8
23	12	7,9
24	5	8,4
25	1	10,5

APÊNDICE C:

Espectros de RMN

Nesta seção serão anexados os espectros de Ressonância Magnética nuclear mono(¹³C-RMN e ¹H-RMN) e bi-dimensionais (COSY, APT, HMBC e HSQC) realizados para a confirmação estrutural da MONOEST sintetizada via enzimática

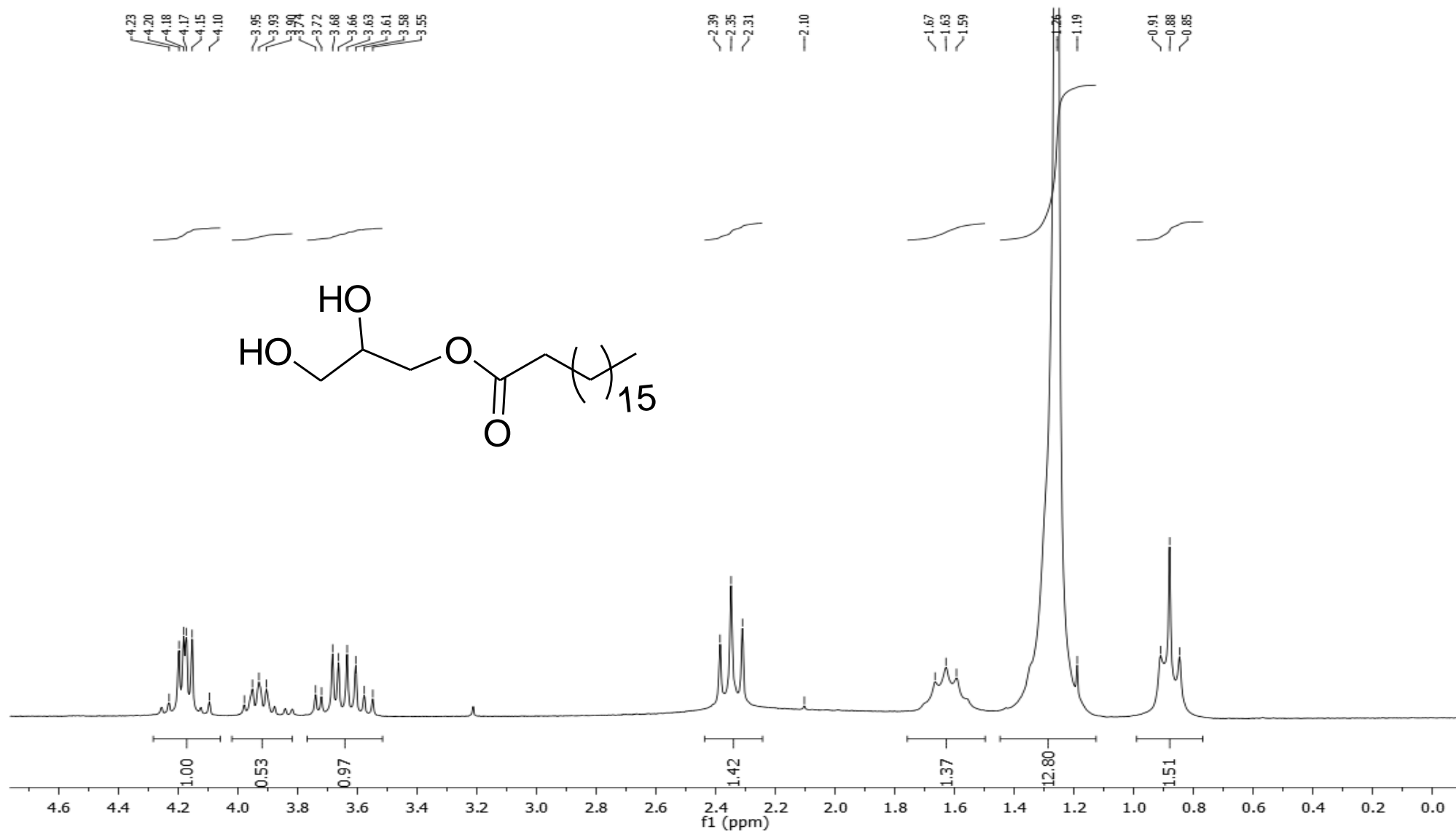


Figura C 1: Espectro de 1H-RMN da MONOEST

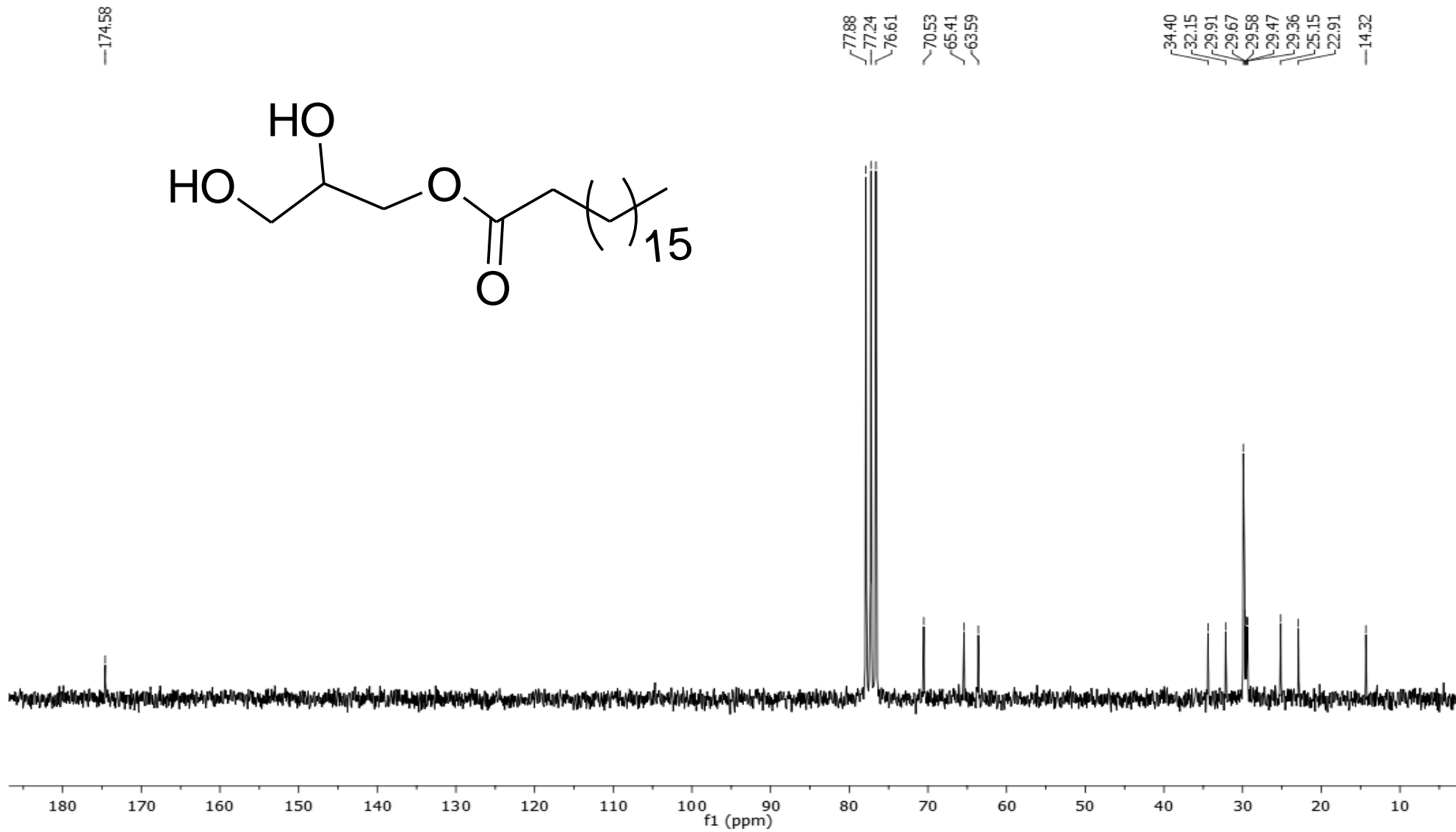


Figura C 2: Espectro de ¹³C-RMN da MONOEST

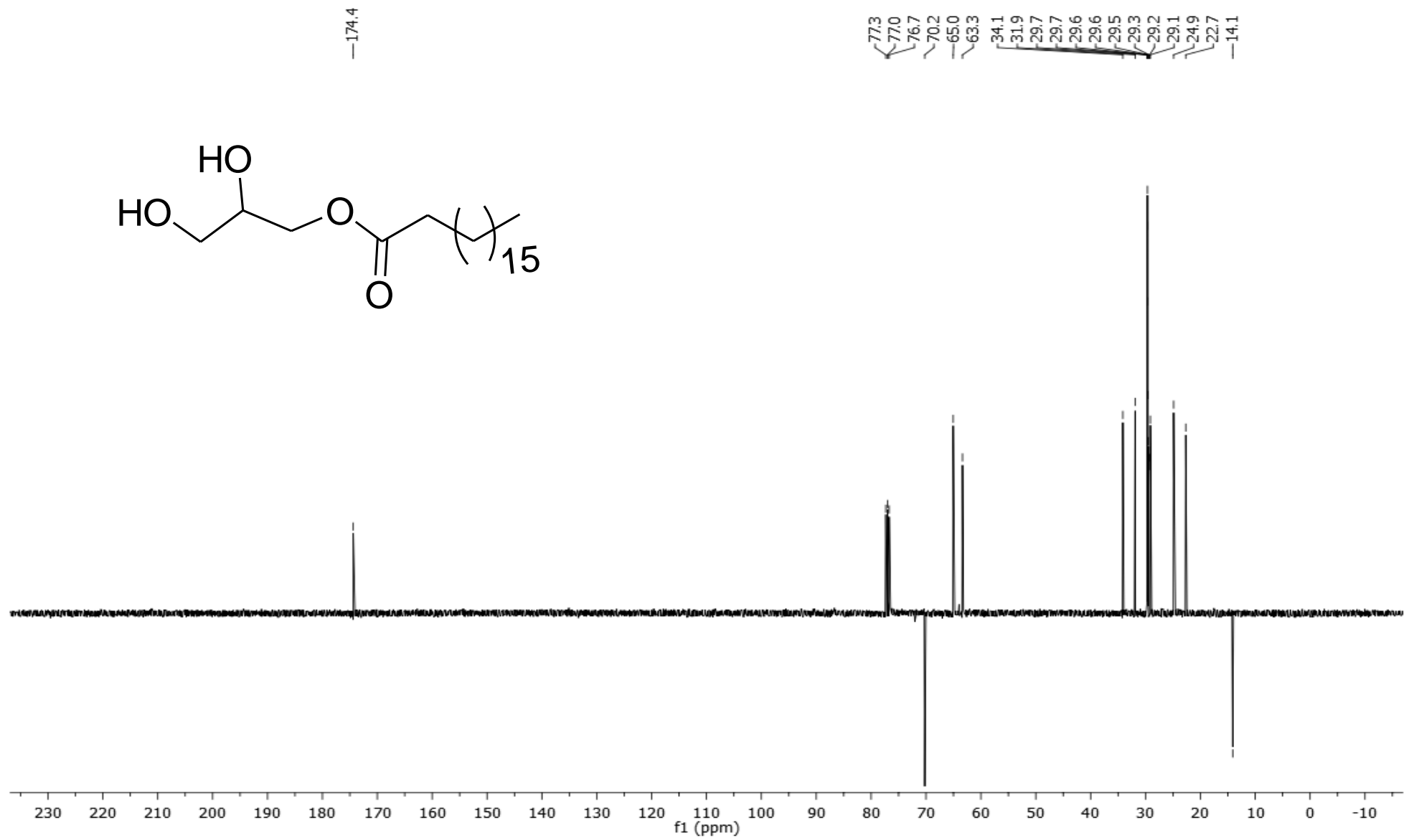


Figura C 3: Espectro de APT da MONOEST

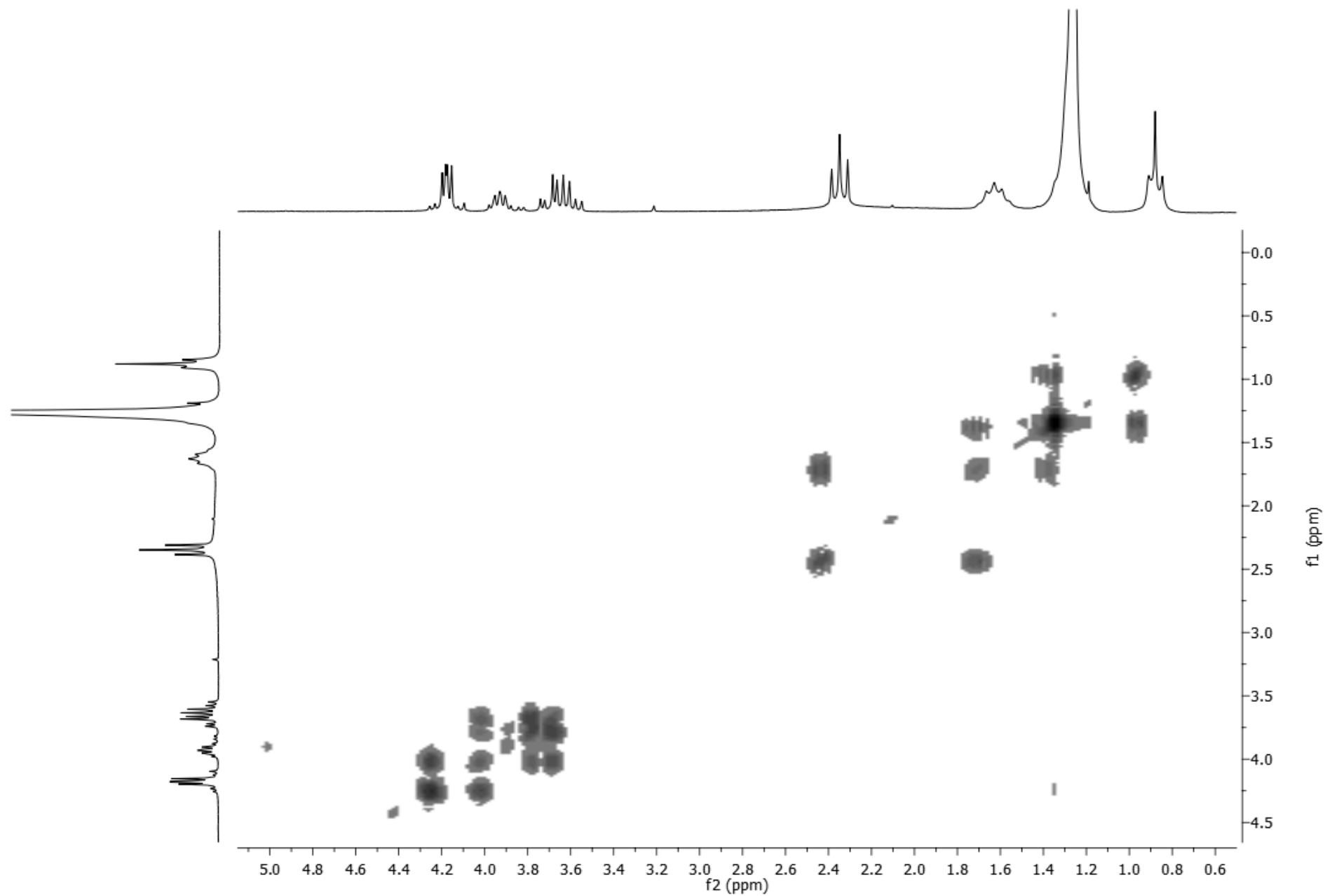


Figura C 4: Espectro de COSY da MONOEST

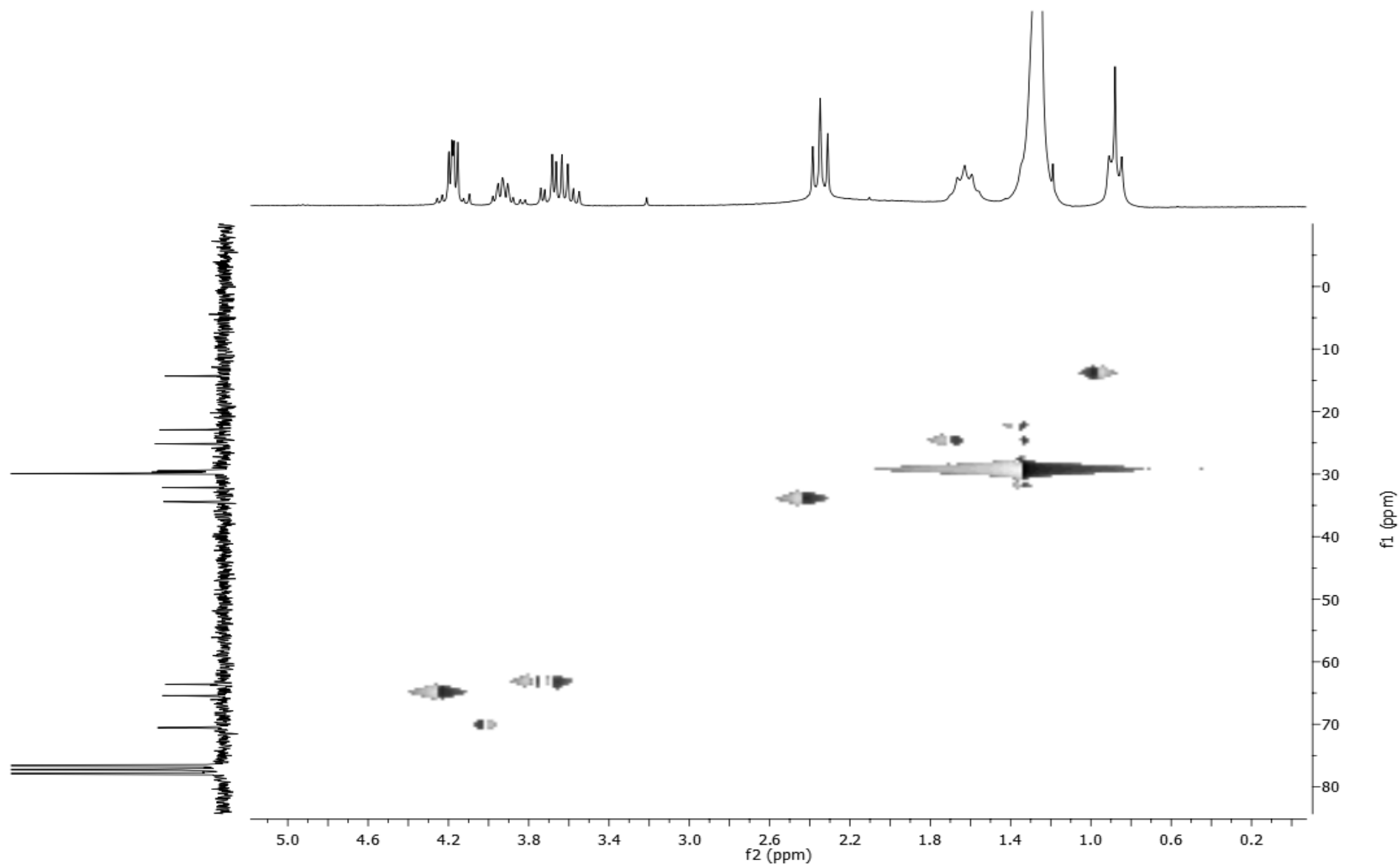


Figura C 5: Espectro de HSQC da MONOEST

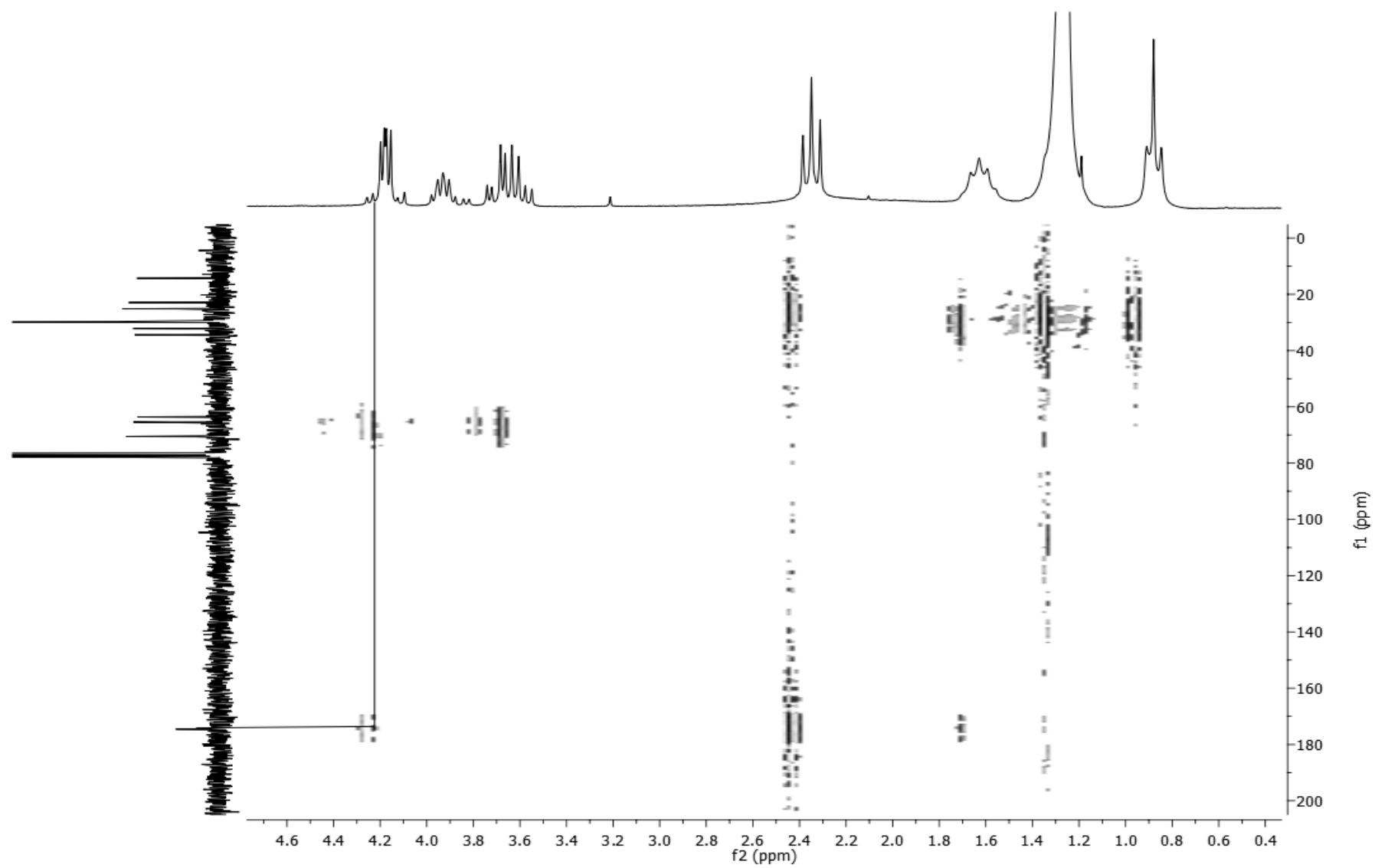


Figura C 6: Espectro de HMBC para a MONOEST

APÊNDICE D

Publicações

Nesta seção, serão anexadas todas as publicações resultantes deste trabalho, além de artigos publicados com resultados não selecionados para compôr esta obra.

Lipase-Catalyzed Monostearin Synthesis under Continuous Flow Conditions

Ivaldo I. Junior,^{†,‡} Marcela C. Flores,[†] Felipe K. Sutili,^{†,§} Selma G. F. Leite,[§] Leandro S. de M. Miranda,[‡] Ivana C. R. Leal,[‡] and Rodrigo O. M. A. de Souza^{*,†}

[†]Biocatalysis and Organic Synthesis Group, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

[‡]Faculdade de Farmácia, Campus Macaé, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

[§]Escola de Química, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

[‡]Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Maracanã, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT: Biodegradable, biocompatible and nontoxic nonionic surfactants are widely used in food, pharmaceutical and industrial applications being commonly produced based on alkaline-catalyzed chemical glycerolysis of natural oil and fats at high temperatures and elevated pressure under nitrogen atmosphere. In this work we have optimized a biocatalytic continuous flow process with packed bed reactor for the esterification reaction between (*R,S*)-1,2-isopropylidene glycerol and stearic acid using response surface methodology (RSM) leading to the desired product in excellent conversion (95%) and short reaction time (40 s of residence time).

1. INTRODUCTION

Partial acylglycerols, mono- and diacylglycerols (MAG and DAG) are well-known biodegradable, biocompatible and nontoxic nonionic surfactants^{1,2} widely used in food, pharmaceutical and industrial applications.^{3,4} The hydrophobic part consists of fatty acid (i.e., lauric, myristic, palmitic, oleic and stearic acid), whereas the hydrophilic part can be formed by of glycerol or one of its ester derivatives from organic acids such as lactic, citric, acetic or tartaric acid.

They are commonly produced on the basis of a batch alkaline-catalyzed chemical glycerolysis of natural oil and fats at high temperatures (220–250 °C) and elevated pressure under nitrogen atmosphere. Besides the high-energy consumption, high temperatures are the responsible for the low yield (<50%) and poor product quality leading to dark-colored and burned-tasting products formation, which requires extensive and costly purification steps.^{5,6} In this way, the use of enzymatic process can overcome these issues and lead to an environmentally friendly approach, employing enzyme-catalyzed synthesis of MAG by selective hydrolysis or alcoholysis using 1,3-regiospecific lipases,⁷ esterification of glycerol with fatty acids⁸ and glycerolysis of fats or oils.⁹

Among the monoacylglycerols, monostearin stands out due to its wide application usually as additive in candy, ice cream, cake and bread, which has functions of emulsifying, dispersing, anti-froth, bulge, antistarch, improving preservation, protecting freshness and controlling lipid to agglutinate in the food. It is also used in chocolate, candy and ice cream to avoid crystallization and prevent separations between oil and water. It can increase shine and exquisite feeling.¹⁰

For industrial purposes, the continuous flow system is preferred to batch reactors due to its greater process control, high productivity and improvement of quality/purity and yield.^{11,12} Several types of reactor can be used in continuous operation,

among these reactors, packed bed reactors (PBR) are the most popular due to high efficiency, low cost and ease of construction, operation and maintenance.^{13–15}

In this work we have optimized a biocatalytic continuous flow process with a packed bed reactor for the esterification reaction between (*R,S*)-1,2-isopropylidene glycerol¹⁶ and stearic acid using response surface methodology (RSM)¹⁷ in a laboratory setting. To the best of our knowledge this is the first report for this reaction under continuous flow conditions. The lipase-catalyzed esterification has been investigated as a potential substitute to the traditional chemical glycerolysis, since lipases as biocatalysts demand milder reaction conditions which minimize energy costs, allow a better reaction control and consequently provide higher-quality products.⁴ RSM is a statistical tool for developing and optimizing processes with one or more responses influenced by several variables. The RSM advantage is that it allows the user to gather large amounts of information from a small number of experiments. Using RSM also enables observation of the effects of individual variables and their combination of interactions on the response.

2. RESULTS AND DISCUSSION

We began our study evaluating the esterification reaction between (*R,S*)-1,2-isopropylidene glycerol and stearic acid catalyzed by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* (RM IM) under continuous-flow conditions. The reaction proceeded at 60 °C and different flow rates (0.2, 0.6, and 1.0 mL/min). To this purpose we have used a 35 mM stock solution containing stearic acid and (*R,S*)-1,2-isopropylidene glycerol (equimolar proportion)

Special Issue: Continuous Processing 2012

Received: May 17, 2011

Published: June 20, 2011



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molcatb

DoE oriented reaction optimization on the lipase-catalyzed monostearin synthesis

Ivaldo I. Junior^{a,b}, Felipe K. Sutili^{a,c}, Selma G.F. Leite^c, Leandro S. de M. Miranda^d, Ivana C.R. Leal^b, Rodrigo O.M.A. de Souza^{a,*}^a Biocatalysis and Organic Synthesis Group, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, CEP22941-909 Rio de Janeiro, Brazil¹^b Faculdade de Farmácia, Federal University of Rio de Janeiro, Campus Macaé, CEP22941 909 Rio de Janeiro, Brazil²^c Escola de Química, Federal University of Rio de Janeiro, CEP22941-909 Rio de Janeiro, Brazil³^d Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Maracanã, CEP20270021 Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 May 2011

Received in revised form 8 July 2011

Accepted 12 July 2011

Available online 21 July 2011

Keywords:

Biocatalysis

Lipases

Monostearin

Design of experiments

ABSTRACT

Recognition that *trans* and saturated fats have negative health effects drive researchers to develop alternative systems that can structure liquid oils into semi-solid plastic pastes for food applications. Monoacylglycerols (MAG) can be used as a promising molecule to achieve this structuring so we have optimized a biocatalytic batch process to the esterification reaction between 1,2-O-isopropylidene glycerol and stearic acid, catalyzed by Lipozyme RM IM, using response surface methodology (RSM) in a laboratory setting with 95% of conversion after 4 h.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

A better understanding of the role of dietary lipids in the coronary heart disease (CHD) continues to give us insights into metabolic effects of individual fatty acids and their impact on surrogate markers of risk [1]. The recognition that *trans* and saturated fats have negative health effects drive researchers to develop alternative systems that can structure liquid oils into semi-solid plastic pastes for food applications because the traditional processes for manufacturing spreads, margarines, and shortenings uses hydrogenation and/or saturated fats to achieve the desired structuring [2,3].

In this way, monoacylglycerols (MAG) can be used as a promising molecule to achieve this structuring by utilizing the properties of gel phases (alpha gel and coagel) [4,5]. These MAG are commonly produced based on alkaline-catalyzed chemical glycerolysis of natural oil and fats at high temperatures (220–250 °C) and elevated pressure under nitrogen atmosphere leading to products with low

yield, poor quality, dark-colored and burned-tasting characteristics [6,7]. To overcome this issues the use of enzymatic process can lead to an environmentally friendly approach, employing enzyme-catalyzed synthesis of MAG by selective hydrolysis or alcoholysis using 1,3-regiospecific lipases [8–10], esterification of glycerol with fatty acids [11,12], and glycerolysis of fats or oils [13].

In this work we have optimized a biocatalytic batch process to the esterification reaction between solketal and stearic acid using response surface methodology (RSM) in a laboratory setting [14]. The lipase-catalyzed esterification [15] has been investigated as a potential substitute to the traditional chemical glycerolysis, since lipases as biocatalysts demand milder reaction conditions which minimize energy costs, allow a better reaction control and consequently provide higher-quality products [16]. RSM is a statistical tool for developing and optimizing processes with one or more responses influenced by several variables. The RSM advantage is that it allows the user to gather large amounts of information from a small number of experiments. The RSM use also enables to observe the effects of individual variables and their combination of interactions on the response.

2. Experimental

Heptane was purchased from Tedia Co. (R,S)-1,2-isopropylidene glycerol from Sigma–Aldrich as well as all chromatographic

* Corresponding author. Fax: +55 2125627001.

E-mail addresses: rodrigossouza@iq.ufrj.br, souzarod21@gmail.com (R.O.M.A. de Souza).¹ Fax: +55 2125627001.² Fax: +55 2125627807.³ Fax: +55 2125627005.



Fatty acids residue from palm oil refining process as feedstock for lipase catalyzed monoacylglycerol production under batch and continuous flow conditions

Ivaldo I. Junior^{a,b,1}, Marcela C. Flores^{a,2}, Felipe K. Sutili^{a,c,3}, Selma G.F. Leite^{c,4}, Leandro S. de M. e Miranda^d, Ivana C.R. Leal^{b,5}, Rodrigo O.M.A. de Souza^{a,*}

^a Biocatalysis and Organic Synthesis Group, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, CEP 22941-909, Rio de Janeiro, Brazil

^b Faculdade de Farmácia, Campus Macaé, Federal University of Rio de Janeiro, CEP 22941-909, Rio de Janeiro, Brazil

^c Escola de Química, Federal University of Rio de Janeiro, CEP 20270021, Rio de Janeiro, Brazil

^d Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Maracanã, CEP 22941-909, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2011

Received in revised form

17 December 2011

Accepted 6 January 2012

Available online xxx

Keywords:

Flow chemistry

Lipases

1,2-O-isopropylidene glycerol

Packed bed reactor

Fatty acids

Palm oil

ABSTRACT

Free fatty acids are used in many cases for the production of soaps, candles and assist processing of rubber products, but we believe that new process technology should be developed to produce products with higher added value. Monoacylglycerols (MAGs) are nonionic surfactant, highly hydrophobic and has been used as controlled release systems for drugs. The results presented here for the lipase-catalyzed MAG production show that both batch and continuous flow conditions can lead to the desired product in short reaction time and high yield (70–95%) but the use of packed bed reactors (PBR) shows higher efficiency when compared to batch reactors.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The Twelve Principles of Green Chemistry reflect the need for definitive action with regard to the development of processes, whether in universities and industry [1]. In this context, the availability of cheap raw material and renewable energy from nature is the basis for industrial sustainability, as well as a better use of industrial waste. In this sense, strategies to develop clean technologies for chemical processes aim to balance economic and environmental aspects [2].

In recent years, the group of four main countries that grow soybeans comprising Brazil, Argentina, Bolivia and Paraguay recorded 92% increase in production and 66% increase in planted area with soybeans and palm oil, which represents several tons fiber and by-products of the refining procedure.

Palm oil has a wide range of applications, about 80% is used for food applications (cooking oil), while the rest is raw material for a series of non-food applications [3]. Among food uses, olein refined, bleached and deodorized is mainly used in cooking and frying oils, fats and margarines. Many mixtures have been developed to produce solid fats with zero content of trans-fatty acids [4].

The refining process removes free fatty acids, phosphatides, odoriferous matter, water and impurities from the crude palm oil to produce high quality edible oil that meets industry standards. To achieve this chemical or physical objective, refining can be used as shown in Scheme 1 and in both cases free fatty acids are obtained as a byproduct of the refining processes.

Free fatty acids are used in many cases for the production of soaps, candles and assist processing of rubber products, but we believe that new process technology should be developed to produce products with higher added value [5]. Monoacylglycerols (MAGs) are important molecules that find applications in different fields. In food industry are widely used in the preparation of bakers, pastry and margarine [6]. They are also used in pharmaceutical [7] and cosmetic industry as drug carriers and to increase the consistency of creams and lotions [8].

Monoacylglycerols (MAGs) are nonionic surfactant, highly hydrophobic and has been used as controlled release systems for

* Corresponding author. Fax: +55 2125627001.

¹ Fax: +55 2125627001/2125627807.

² Fax: +55 2125627001.

³ Fax: +55 2125627001/2125627005.

⁴ Fax: +55 2125627005.

⁵ Fax: +55 2125627807.



Review

Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions

Ivaldo Itabaiana Jr., Leandro Soter de Mariz e Miranda, Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza*

Biocatalysis and Organic Synthesis Group, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, CEP 22941-909, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2012

Received in revised form 31 July 2012

Accepted 8 August 2012

Available online xxx

Keywords:

Packed bed reactor

Continuous flow

Lipases

ABSTRACT

Despite the technological knowledge available for thousands years about fermentation processes, interestingly only in the last two hundred years scientists have developed tools that allow chemists to use the natural power of biocatalysts in the laboratory. The present review has covered the literature from 1991 to 2012 with the most exciting examples of lipase-catalyzed reactions under continuous flow regime. Different types of reactors can be found and in most cases a greater improvement can be observed when working under such conditions compared to the traditional batch reactors.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	1
2. Lipase catalyzed reactions	2
2.1. Esterification	2
2.2. Kinetic resolution	3
2.3. Hydrolysis	4
2.4. Transesterification	5
3. Conclusion	7
Acknowledgments	8
References	8

1. Introduction

Over the centuries mankind has always taken profit from biocatalytic processes in the production of wine, beer and bread. Despite the technological knowledge available for thousands years of these fermentation processes, interestingly only in the last two hundred years scientists have developed the concepts and tools that allow chemists and biochemists to use the natural power of biocatalysts in the laboratory [1,2]. Especially the last 50 years were particularly prolific in the area. Nowadays, due to the developments of new molecular biology tools, it is possible to obtain homemade biocatalysts designed to have optimum performance on a target specific transformation leading to reaction-designed catalysts [3–8].

Despite all these achievements, some drawbacks still persist in the context of their use in the organic chemistry in the laboratory.

When isolated enzymes are used, these drawbacks are related to stability, enzyme purity, availability and the need for co-factors. In addition, many of these enzymes suffer the product inhibition and reactions are run in high diluted media [3,9].

Some of these difficulties in using free enzymes as biocatalysts can be overcome by using whole cells; however, this approach has its own challenges. The viability of the whole cell, the low expression of the needed enzymatic system, as well as the existence of collateral enzymatic reactions in the cell metabolism are some of the problems to be addressed when developing a whole-cell biocatalytic system [4,6].

Therefore, it is not surprisingly that the use of isolated lipases has become by far the most developed transformation in biocatalyzed organic reactions; most of the success is related to their stability in organic solvents, high availability, low cost, no need for co-factors. However, even working on such easy handle biocatalyst, some procedures still have long reaction times and low yields, leading in some cases to the use of high loading catalysts and/or highly diluted media.

* Corresponding author.

E-mail address: souzarod21@gmail.com (R.O.M.A. de Souza).

Continuous flow valorization of fatty acid waste using silica-immobilized lipases†

Cite this: *Green Chem.*, 2013, **15**, 518

Ivaldo Itabaiana Jr.,^{a,b} Felipe K. Sutili,^{a,c} Selma G. F. Leite,^c Karen M. Gonçalves,^{a,b} Yraima Cordeiro,^b Ivana C. R. Leal,^b Leandro S. M. Miranda,^a Manuel Ojeda,^d Rafael Luque^d and Rodrigo O. M. A. de Souza^{*a}

Received 22nd October 2012,
Accepted 26th November 2012

DOI: 10.1039/c2gc36674f

www.rsc.org/greenchem

Silica immobilized lipases have been prepared and utilized in the valorization of fatty acid-derived food waste streams under continuous flow conditions. Findings demonstrate that better conversions could be obtained when compared with commercially available immobilized enzymes.

1. Introduction

Lipases are triacylglycerol hydrolytic enzymes useful for a wide range of reactions including hydrolysis, esterification and transesterification reactions.^{1–4} Upon immobilization, supported enzymes can provide an easily separable and reusable system (together with enhanced product recovery) which is often also more resistant to deactivation as compared to the parent free enzyme.^{5–10} Immobilization has several implications in the generation of more stable biocatalysts compatible with continuous processing technologies. Several ways have been reported to immobilize enzymes on a range of supports. These range from the more extended and widely employed physical methods (*e.g.* adsorption, entrapping and/or electrostatic immobilization) to chemical protocols (*e.g.* covalent immobilization). Compared to conventional and more explored methodologies, a recent novel approach based on enzyme encapsulation by using biomimetic silica mineralization (the so-called biosilicification) was proved to offer the possibility to render highly active and stable biocatalysts entrapped within a silica support.^{8,11–14} This could be carried out in a one-pot reaction by using a silicic acid precursor (*e.g.* tetramethylorthosilicate – TMOS) and a polycationic catalyst

under mild conditions (typically room temperature, close to neutral pH).

Particularly, the activities and (enantio)selectivities of esterases encapsulated in such silica nanoparticles were very recently reported to be significantly influenced by encapsulation in enantioselective esterifications. These relevant findings supported previous theories that suggested complex and unexpected (even unpredictable) structural modifications of enzymes upon physical and/or chemical immobilization on various solid supports.^{15,16} In any case, the development of biosilicification methodologies will pave the way for the encapsulation of a wide range of enzymes with varying activities and specificities which can have significant implications in industrial biocatalysis.

Palm oil is generally obtained by a refining process that removes free fatty acids, odoriferous matter, water and impurities from crude palm oil to produce high quality edible oil.¹⁷ The remaining free fatty acids are currently valorized for the manufacture of rubber, candles and soaps but apart from these, such acidic residues generally find no alternative uses different from the aforementioned first generation recycling. These acidic food-derived residues will significantly benefit from the development of innovative and advanced valorization practices to convert them into high added value chemicals.

In the light of the potential of lipases for esterification reactions and the wide availability of these refined palm oil derived acidic residues in Brazil,^{18–22} we report herein a simple and efficient biosilicification approach to encapsulate lipases which renders highly active and stable biocatalysts in esterification reactions of the aforementioned fatty acid-derived food waste (FAFW) residues under continuous flow as compared to batch conditions. The surface response methodology (RSM) has been employed as a tool to optimize reaction

^aBiocatalysis and Organic Synthesis Group, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, CEP22941-909 Rio de Janeiro, Brazil. Fax: +552125627001; E-mail: rodrigossouza@iq.ufrj.br

^bFaculdade de Farmácia, Federal University of Rio de Janeiro, CEP22941-909 Rio de Janeiro, Brazil. Fax: +552125627807

^cEscola de Química, Federal University of Rio de Janeiro, CEP22941-909, Rio de Janeiro, Brazil. Fax: +552125627005

^dDepartamento de Química Orgánica, Universidad de Córdoba, Edificio Marie Curie (C-3), Ctra Nnal IV-A, Km 396, E14014 Córdoba, Spain

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c2gc36674f



Kinetics and mechanism of lipase catalyzed monoacylglycerols synthesis



I. Itabaiana Jr.^{a,b}, K.M. Gonçalves^{a,b}, Y.M.L. Cordeiro^b, M. Zoumpantioti^c, I.C.R. Leal^{a,b}, L.S.M. Miranda^a, R.O.M.A. de Souza^a, A. Xenakis^{c,*}

^a Biocatalysts and Organic Synthesis Group, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, CEP 22941909, Brazil

^b Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, CEP 21949900, Brazil

^c Institute of Biology Medicinal Chemistry and Biotechnology, The National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2013

Received in revised form 12 June 2013

Accepted 17 June 2013

Available online xxx

Keywords:

Biocatalysis

Lipase

Microemulsion

Monostearin

Ordered bi–bi

Solketal

ABSTRACT

Monoacylglycerols are increasingly used in several industrial applications as effective and cheap emulsifiers. In the present work monostearin synthesis has been studied, using lipase as a biocatalyst of the esterification reaction of stearic acid with (R,S)-1,2-O-iso-propylidene glycerol (solketal). The lipase from *Candida antarctica* (CaL B) was immobilized in AOT/isooctane water in oil microemulsions. Optimization of the reaction conditions have shown that the highest production (80% in 30 min) could be achieved at 40 °C, in microemulsions with relatively low water content ($w_o = 8$). Kinetic studies have shown that the esterification reaction of stearic acid with solketal catalyzed by CaL B occurs via the ordered bi–bi mechanism, in which inhibition by the acid was identified. Moreover, at high fixed solketal concentrations a negative cooperativity is pronounced, which means that binding of the alcohol lowers the affinity of the enzyme for binding of the acid. Values of all kinetic parameters have been determined.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Monoacylglycerides (MAG) of various compositions are widely used as nonionic surfactants [1] for various applications, e.g. as emulsifiers and stabilizers in food, pharmaceutical and other industrial applications [2]. As alternative to classical chemical syntheses (which require toxic metals as catalysts, high temperatures and elevated pressure) hydrolytic enzyme preparations (ester hydrolases, lipases) can be used advantageously. The use of enzymes is an environmentally friendly approach which also overcomes issues such as low yields, poor quality, dark-colored and burned-tasting characteristics caused by alkaline catalyzed procedures [3]. As an additional advantage, monoglycerides formed in aprotic solvents under enzymatic procedures are rather stable towards acyl group migration. In addition, lipases show distinct preferences regarding the position of triglycerides cleavage (1,3-specific, unspecific) and the fatty acid type. However, the large difference in polarity between the substrates used for MAG synthesis raises

difficulties regarding the choice of an ideal solvent able to both solubilize substrates and prevent enzyme denaturation.

As an alternative, microheterogeneous systems such as different types of water-in-oil (w/o) microemulsions have been proposed [4]. W/o microemulsions are thermodynamically stable and optically transparent liquid media with large interfacial area. They provide an aqueous domain where hydrophilic enzymes can be hosted, an interface where the active site of enzymes can be anchored, and a non-polar organic phase where the hydrophobic substrates or products may be dissolved [4,5]. In several cases w/o microemulsions have been shown to improve enzymatic activity, providing high reaction yields with low amounts of biocatalyst [5–8].

Although enzymatic synthesis of monostearin has been accomplished by using commercial immobilized lipases in organic solvents [9–13], the reaction has not been tested in microemulsions yet. Moreover, to the best of our knowledge a detailed kinetic analysis of this type of synthetic reactions has not been carried out so far. Several mechanisms have been proposed to explain lipase catalyzed synthetic reactions, e.g. a sequence of various irreversible consecutive pseudo first order reactions and ordered bi–bi mechanism, with the generally accepted mechanism called “ping pong bi–bi” mechanism [14–18], in which a first product is released between additions of two substrates. However, there is a good deal of publications on alternative mechanisms, such as the ordered bi–bi mechanism with a dead-end complex of the substrate in non

* Corresponding author at: Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, 11653 Athens, Greece.
Tel.: +30 2107273762; fax: +30 2107273677.

E-mail address: arisx@eie.gr (A. Xenakis).