

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**BRUNA JEANNE SOARES PACHECO**

SÍNTESE DE TRIGLICERÍDEOS DIETÉTICOS CATALISADA POR LIPASE  
DE *Rhizopus oryzae* IMOBILIZADA EM PÓ DE SABUGO DE MILHO POR  
ADSORÇÃO FÍSICA

Poços de Caldas / MG

2020

**BRUNA JEANNE SOARES PACHECO**

SÍNTESE DE TRIGLICERÍDEOS DIETÉTICOS CATALISADA POR LIPASE  
DE *Rhizopus oryzae* IMOBILIZADA EM PÓ DE SABUGO DE MILHO POR  
ADSORÇÃO FÍSICA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Engenharia Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ariela Veloso de Paula

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Grazielle Santos Silva Andrade

Poços de Caldas / MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca campus Poços de Caldas

Pacheco, Bruna Jeanne Soares.

P116s Síntese de triglicerídeos dietéticos catalisada por lipase de  
*Rhizopus oryzae* imobilizada em pó de sabugo de milho por adsorção  
física / Bruna Jeanne Soares Pacheco. -- Poços de Caldas/MG, 2020.  
70 f. --

Orientador(a): Ariela Veloso de Paula.  
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade  
Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2020.  
Bibliografia.

1. Triglicerídeos. 2. Lipase. 3. Enzimas imobilizadas. 4. Reatores  
biológicos. I. Paula, Ariela Veloso de. II. Título.

CDD – 660

**BRUNA JEANNE SOARES PACHECO**

**SÍNTESE DE TRIGLICERÍDEOS DIETÉTICOS CATALISADA POR LIPASE DE *Rhizopus oryzae* IMOBILIZADA EM PÓ DE SABUGO DE MILHO POR ADSORÇÃO FÍSICA**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Engenharia Química.

Aprovada em: 14 de dezembro de 2020.

Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula

Instituição: Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Júlio César dos Santos

Instituição: Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Marcel Otávio Cerri

Instituição: Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho



Documento assinado eletronicamente por **Ariela Veloso de Paula, Usuário Externo**, em 14/12/2020, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcel Otavio Cerri, Usuário Externo**, em 14/12/2020, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Júlio César dos Santos, Usuário Externo**, em 16/12/2020, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0428244** e o código CRC **5033C354**.

*Dedico este trabalho a Deus, por todas as  
bênçãos concedidas e à minha família,  
por todo apoio e incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pela vida e por me permitir alcançar mais essa etapa, me fortalecendo e mostrando o caminho em todos os momentos.

Aos meus pais, Vicentina e Braulio, que dedicam tanto a mim. Obrigada por todo amor, por me incentivarem a sempre ir em frente, pela compreensão da saudade, por toda força e exemplo. Vocês são o meu maior motivo.

Às minhas irmãs, cunhados e sobrinhos. Vocês sempre são fonte de estímulo e inspiração, são meu porto seguro. Obrigada por me apoiarem tanto.

À minha família e amigos, por toda palavra de carinho e orações.

À professora Dra. Ariela Veloso de Paula, por compartilhar de seus conhecimentos, pela confiança e incentivo. E também por todo carinho e compreensão.

À professora Dra. Grazielle Santos Silva Andrade, pelos ensinamentos, por toda disponibilidade e auxílios.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Unifal-MG pelos conhecimentos transmitidos.

Agradeço também aos amigos e colegas que somei durante este período. Aos amigos da Unifal - Poços de Caldas, companheiros de curso e aos amigos da Unesp - Araraquara, por me acolherem tão bem. Vocês, sem dúvida, fizeram essa caminhada mais especial.

Aos técnicos dos laboratórios do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Unesp pelo profissionalismo e por toda ajuda prestada.

A todos que generosamente me ajudaram a desenvolver este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

É notado um aumento constante na busca por qualidade de vida, o que tem levado a população a desenvolver hábitos mais saudáveis. Óleos e gorduras, muito presentes na rotina e parte base de uma alimentação têm tomado atenção, e quando consumidos em excesso podem desencadear diversas doenças. O óleo de semente de uva é matéria prima em vários ramos na indústria, rico em vitamina E, antioxidantes e óleos essenciais, corroborando à importância de se desenvolver tecnologias que disseminem seu uso para proveito de seus benefícios. Visto isso, os triglicerídeos dietéticos vêm se destacando devido suas propriedades nutracêuticas, menor valor calórico, maior solubilidade e metabolização facilitada no organismo, comparado aos convencionais. Apesar de seus diversos benefícios, o uso de enzimas pode não ser vantajoso, por elevar custos no processo. Uma alternativa bastante promissora é a imobilização da enzima, já que esse método permite a reutilização do biocatalisador. Para esses processos, os reatores em leito fixo (PBR) são comumente utilizados, devido a sua eficiência e alta produção. Neste trabalho, o objetivo foi sintetizar triglicerídeos dietéticos do tipo MLM em reação de acidólise, utilizando óleo de semente de uva e ácido cáprico (C10), catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada por adsorção física em pó de sabugo de milho. O biocatalisador imobilizado foi caracterizado quanto à temperatura e pH ótimos empregando-se um planejamento experimental de delineamento composto central rotacional (DCCR). Também se avaliou a estabilidade térmica, bem como os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da enzima livre e imobilizada, em diferentes temperaturas. Através de planejamento experimental, delineamento composto central rotacional (DCCR), foram determinados a razão molar, temperatura e quantidade de biocatalisador adequados para maior grau de incorporação (GI). Por fim, a síntese foi realizada em reator de leito fixo e o produto analisado quanto o GI e porcentagens de triglicerídeos. Os resultados obtidos permitiram a seleção das condições reacionais mais eficientes para obtenção dos triglicerídeos dietéticos do tipo MLM, com resultados promissores na área da biotecnologia.

Palavras-chave: Triglicerídeos dietéticos. Óleo de semente de uva. Lipase. Adsorção física. Pó de sabugo de milho. Reator de leito fixo.

## ABSTRACT

There is a constant increase in the search for quality of life, which has led the population to develop healthier habits. Oils and fats, very present in the routine and basic part of a diet, have been paying attention, and when consumed in excess they can trigger several diseases. Grape seed oil is a raw material in several branches in the industry, rich in vitamin E, antioxidants and essential oils, corroborating the importance of developing technologies that disseminate its use to take advantage of its benefits. In view of this, dietary triglycerides have stood out due to their nutraceutical properties, lower caloric value, greater solubility and easier metabolism in the body, compared to conventional ones. Despite its many benefits, the use of enzymes may not be advantageous, as it increases costs in the process. A very promising alternative is the immobilization of the enzyme, since this method allows the reuse of the biocatalyst. For these processes, fixed bed reactors (PBR) are commonly used, due to their efficiency and high production. In this work, the objective was to synthesize dietary triglycerides of the MLM type in acidolysis reaction, using grape seed oil and capric acid (C10), catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase immobilized by physical adsorption in corn cob powder. The immobilized biocatalyst was characterized in terms of optimum temperature and pH using an experimental central rotational composite design (DCCR). It was also evaluated the thermal stability, as well as the kinetic and thermodynamic parameters of the free and immobilized enzyme, at different temperatures. Through experimental design, central rotational composite design (DCCR), the molar ratio, temperature and amount of biocatalyst suitable for a higher degree of incorporation (GI) were determined. Finally, the synthesis was performed in a fixed bed reactor and the product was analyzed for GI and triglyceride percentages. The results obtained allowed the selection of the most efficient reaction conditions for obtaining dietary triglycerides of the MLM type, with promising results in biotechnology.

Keywords: Dietary triglycerides. Grape seed oil. Lipase. Physical adsorption. Corn cob powder. Fixed bed reactor.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparativo entre os métodos de imobilização .....	21
Tabela 2 - Equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho .....	29
Tabela 3 - Valores utilizados para o planejamento experimental para caracterização da enzima imobilizada .....	33
Tabela 4 - Valores utilizados para o planejamento experimental para as reações em batelada .....	36
Tabela 5 - Rendimento de Imobilização, Atividade Recuperada e Atividade do Imobilizado .....	41
Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental da caracterização da enzima imobilizada .....	42
Tabela 7 - Coeficientes de regressão, erros padrão, os valores de t calculado e de p-valor na caracterização da enzima imobilizada .....	43
Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) na caracterização da enzima imobilizada .....	43
Tabela 9 - Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da enzima livre e imobilizada .....	47
Tabela 10 - Matriz do planejamento experimental dos parâmetros reacionais ..	50
Tabela 11 - Coeficientes de regressão, erros padrão, os valores de t calculado e de p-valor dos parâmetros reacionais .....	50
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros reacionais .....	51
Tabela 13 - GI obtido nas reações em leito fixo .....	56
Tabela 14 - Quantificação de mono, di e triglicerídeos presentes no óleo de semente de uva das acidólises em reator de leito fixo .....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reações para modificação de óleos e gorduras .....	15
Figura 2 - Classificação das enzimas imobilizadas segundo a IUPAC .....	20
Figura 3 - Parede celular do pó de sabugo de milho .....	25
Figura 4 - Representação dos biorreatores de tanque agitado e em coluna ...	26
Figura 5 - Superfície de resposta para atividade hidrolítica da enzima imobilizada .....	44
Figura 6 - Perfil de desativação térmica à 35 °C da enzima livre e imobilizada .....	45
Figura 7 - Perfil de desativação térmica à 41 °C da enzima livre e imobilizada .....	46
Figura 8 - Perfil de desativação térmica à 45 °C da enzima livre e imobilizada .....	46
Figura 9 - Superfície de resposta para o grau de incorporação (GI) .....	52
Figura 10 - Curva de calibração do corante .....	53
Figura 11 - Distribuição do tempo de residência do reator de leito fixo empacotado com pó de sabugo de milho .....	54
Figura 12 - GI médio da 1° e 2° reação em reator de leito fixo .....	56

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 OBJETIVOS GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	14
3.1 TRIGLICERÍDEOS .....	14
<b>3.1.1 Óleo de semente de uva</b> .....	16
3.2 ENZIMAS .....	17
<b>3.2.1. Lipase</b> .....	18
3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	20
<b>3.3.1 Suportes para imobilização</b> .....	23
3.3.1.1 Pó de sabugo de milho .....	24
3.4 BIORREATORES E MODO DE OPERAÇÃO .....	26
<b>3.4.1 Reator de leito fixo</b> .....	27
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
4.1 MATERIAIS .....	29
4.2 MÉTODOS .....	30
<b>4.2.1 Tratamento do suporte</b> .....	30
<b>4.2.2 Imobilização por adsorção física</b> .....	30
<b>4.2.3 Determinação da atividade hidrolítica</b> .....	30
<b>4.2.4 Teste de carregamento enzimático</b> .....	32
<b>4.2.5 Caracterização da enzima imobilizada</b> .....	33
<b>4.2.6 Estabilidade térmica</b> .....	33
<b>4.2.7 Cinética e Termodinâmica</b> .....	34
<b>4.2.8 Índice de peróxido</b> .....	35
<b>4.2.9 Reações em tanque agitado em batelada</b> .....	36
<b>4.2.10 Neutralização e separação dos ácidos graxos</b> .....	36
<b>4.2.11 Metilação dos TAGS</b> .....	37
<b>4.2.12 Determinação do perfil de ácidos graxos</b> .....	37
<b>4.2.13 Grau de incorporação dos ácidos graxos</b> .....	38

<b>4.2.14 Curva de calibração do corante</b> .....	38
<b>4.2.15 Teste de traçador</b> .....	39
<b>4.2.16 Reações em leito fixo em reciclo total</b> .....	40
<b>4.2.17 Mono, di e triglicerídeos</b> .....	40
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	41
5.1 IMOBILIZAÇÃO POR ADSORÇÃO FÍSICA .....	41
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA .....	42
5.3 ESTABILIDADE TÉRMICA .....	45
5.4 PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS .....	47
5.5 REAÇÕES EM TANQUE AGITADO EM BATELADA .....	49
5.6 DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA (DTR) .....	53
5.7 REAÇÕES EM LEITO FIXO EM RECICLO TOTAL .....	55
5.8 QUANTIFICAÇÃO DOS MONO-, DI- E TRIGLICERÍDEOS .....	57
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	59
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61

## 1 INTRODUÇÃO

O desejo em ter mais qualidade de vida faz com que a atenção aos hábitos se torne fundamental, o que leva à procura por alimentos mais saudáveis. Óleos e gorduras, apesar de essenciais na alimentação humana, estão relacionados a doenças que afetam milhões, como obesidade, diabetes, colesterol alto, doenças cardiovasculares, entre outras (COSTA *et al.*, 2017).

Visto isso, os triglicerídeos dietéticos, têm se destacado por promoverem um efeito benéfico ao organismo, além de evitar doenças associadas ao consumo excessivo de lipídeos. Evidenciando os triglicerídeos do tipo MLM, caracterizados por apresentarem a conformação de um ácido graxo de cadeia média (M) na posição sn-1 e sn-3 e um ácido graxo de cadeia longa (L) na posição sn-2 do triacilglicerol, potencializando suas propriedades nutracêuticas, dentre elas, menor valor calórico comparado aos triglicerídeos convencionais, e maior facilidade de serem absorvidos e metabolizados pelo organismo (ABED *et al.*, 2018; VAZ; CHOUPINA, 2012).

Motivados pela busca de óleos mais saudáveis, estudos buscam fontes alternativas aos comumente utilizados (SHINAGAWA *et al.*, 2018). O óleo de semente de uva é matéria prima em vários ramos na indústria, rico em vitamina E, antioxidantes e óleos essenciais (CHOI, 2011; DE SOUZA, 2018; MEDINA *et al.*, 2015), corroborando à importância de se desenvolver tecnologias que disseminem seu uso para proveito de seus benefícios.

Dentre os catalisadores utilizados na obtenção destes destacam-se as lipases. Lipases são enzimas que atuam sobre lipídeos, bastante versáteis, podendo ser empregadas em diversos processos industriais, pois diferente da maior parte das enzimas, dispõe do potencial de catalisar variadas reações com diferentes substratos. A catálise enzimática é uma alternativa mais promissora comparadas às metodologias convencionais. Seu uso melhora os processos de produção, reduzindo gastos de energia, matéria-prima e gera menor quantidade de resíduos tóxicos. Porém, o custo das enzimas ainda é o principal obstáculo em relação à exploração total de seu potencial. Uma alternativa é a imobilização desse biocatalisador, sabendo que, com a imobilização a enzima adquire maior estabilidade e é facilmente recuperada do meio reacional, permitindo sua

reutilização (JEGANNATHAN & NIELSEN, 2013; KIM; AKOH, 2015; KORMAN *et al.*, 2013).

A demanda por suportes para a imobilização mais econômicos, em que os resíduos agroindustriais são apontados, se mantém crescente, com objetivo de reduzir os custos no processo de imobilização de enzimas, oferecer uma melhora em seu desempenho, além de trazer novo uso, ecologicamente correto, aos resíduos. O sabugo de milho é um dos resíduos mais abundantes no Brasil (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

Na síntese dos triglicerídeos, reatores de tanque agitado (STR) operados em batelada e reatores de leito fixo (PBR) operando em reciclo total ou contínuo são os mais utilizados (RAMOS *et al.*, 2017). O STR permite maior contato entre reagentes e biocatalisador e é vantajoso em escala de bancada. Porém, devido aos agitadores, pode ocorrer alta tensão de cisalhamento. Além disso, há uma baixa produção e um tempo morto entre as recargas quando operados em modo batelada (FERNANDES, 2010). Para processos enzimáticos em escala industrial o PBR é comumente utilizado, tendo a recuperação do biocatalisador facilitada, além de garantir a eficiência e gerando alta produção (DE FARIA, 2014; GRUBECKI, 2018).

Para a presente pesquisa, o objetivo foi sintetizar triglicerídeos dietéticos do tipo MLM em reação de acidólise, utilizando óleo de semente de uva e ácido cáprico (C10), catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada por adsorção física em pó de sabugo de milho. Os resultados permitirão um avanço na área da biotecnologia, demonstrando boas perspectivas para a produção dos triglicerídeos dietéticos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho teve como objetivo sintetizar triglicerídeos dietéticos do tipo MLM em reação de acidólise, utilizando óleo de semente de uva e ácido cáprico (C10), catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada por adsorção física em pó de sabugo de milho.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar o melhor carregamento enzimático para a imobilização por adsorção física em pó de sabugo de milho;
- b) Imobilizar por adsorção física a lipase de *Rhizopus oryzae* em pó de sabugo de milho;
- c) Caracterizar a enzima imobilizada quanto à temperatura e pH, avaliando o efeito na atividade enzimática;
- d) Avaliar a estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada;
- e) Definir os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da enzima livre e imobilizada;
- f) Sintetizar de triglicerídeos dietéticos por acidólise enzimática em reator de tanque agitado operando em modo batelada;
- g) Definir os melhores parâmetros reacionais (razão molar, temperatura e quantidade de biocatalisador), visando à obtenção de maior grau de incorporação;
- h) Avaliar a distribuição do tempo de residência (DTR) em reator de leito fixo operando em reciclo total;
- i) Realizar a síntese de triglicerídeos dietéticos por acidólise enzimática em reator de leito fixo operando em reciclo total;
- j) Avaliar o grau de incorporação dos triglicerídeos obtidos nas reações em leito lixo e quantificar os mono-, di- e triglicerídeos presentes no produto.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 TRIGLICERÍDEOS

Triglicerídeos, também chamados triacilgliceróis, são moléculas formadas da junção de três ácidos graxos, diferentes entre si ou não, a uma molécula de glicerol, um triálcool de três carbonos. As três hidroxilas do glicerol ligam-se aos radicais carboxílicos dos ácidos graxos, e podem ser diferenciados de acordo com o tamanho de suas cadeias carbônicas (MOLINARO, 2013).

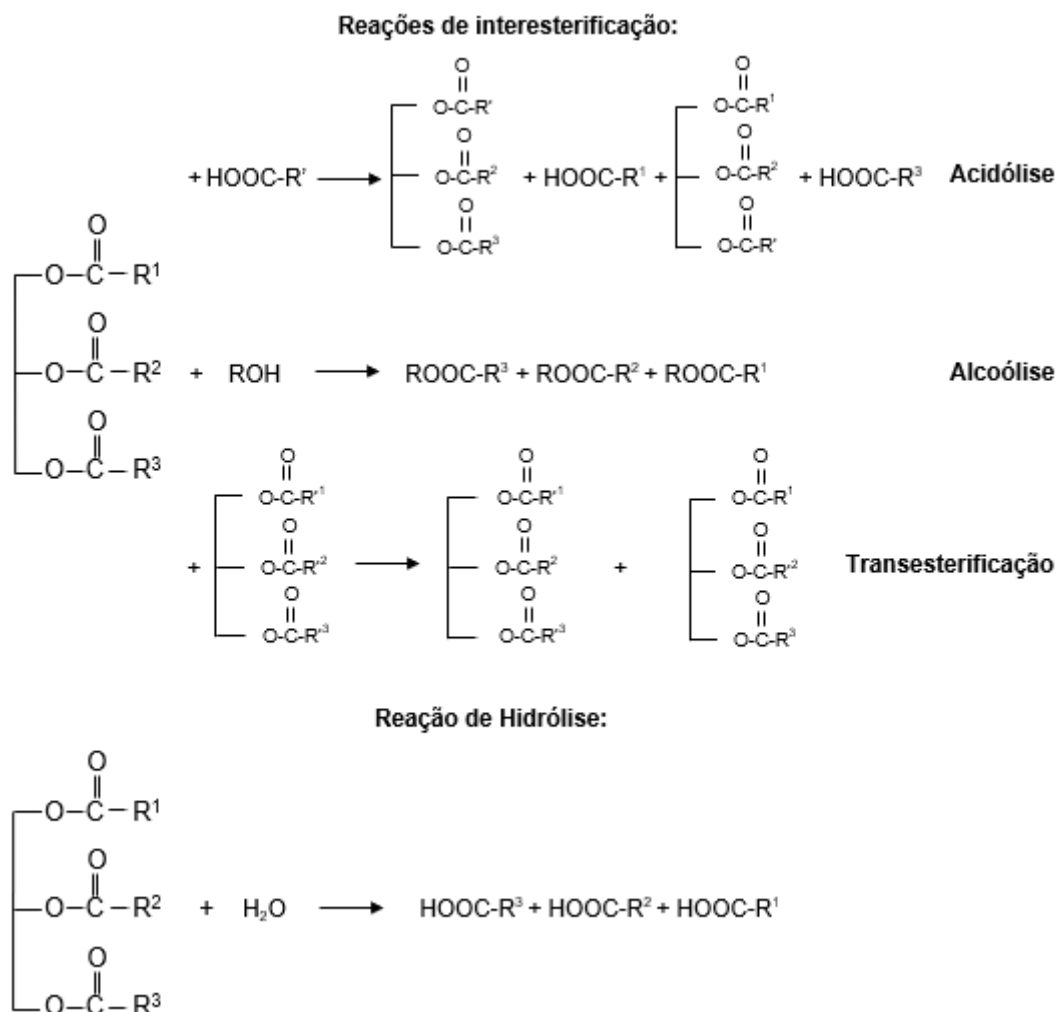
Os triglicerídeos do tipo MLM apresentam ácidos graxos de cadeia média nas posições sn-1 e sn-3 e um ácido graxo de cadeia longa na posição sn-2. Nesta conformação os lipídeos são mais completos e nutricionalmente benéficos, uma vez que são mais facilmente metabolizados pelo organismo. Os ácidos graxos de cadeia longa apresentados na posição sn-2 são mais biodisponíveis, e independente do seu tipo, ainda assim, são facilmente absorvidos pelo organismo. Quando absorvidos através da parede intestinal, os ácidos graxos não passam por uma ressíntese dos triglicerídeos nas células intestinais. Outro benefício é que os triglicerídeos dietéticos do tipo MLM não são estocados nas células adiposas, já que passam por  $\beta$ -oxidação (MING, 2006; MOREIRA, 2016), além de promissor no controle do colesterol, reduzindo os índices das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) sem prejudicar os índices das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (ABED *et al.*, 2018). Logo, constituem uma boa fonte de energia e trazem benefícios à saúde, prevenindo e tratando doenças relacionadas.

A busca por hábitos melhores e qualidade de vida da população vem aumentando, levando então a um crescente interesse industrial por produtos mais saudáveis. Estudos comprovam que seus ácidos graxos e suas respectivas posições na cadeia do triglicerídeo interferem fortemente nas propriedades funcionais e nutricionais dos lipídeos (ABED *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2012). Neste cenário, os triglicerídeos dietéticos do tipo MLM vêm se destacando, por suas maiores propriedades benéficas quando comparado aos convencionais, resultado esse devido ao tamanho e posição de seus ácidos graxos.

Entre as formas mais promissoras de modificação de óleos e gorduras estão: interesterificação, hidrólise, fracionamento e hidrogenação (Figura 1). A

interesterificação, é uma reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal do triglicerídeo, utilizada para modificar suas propriedades físicas e químicas, e compreende em três processos: a acidólise (troca de radicais acil entre um éster e um ácido); alcoólise (troca entre um éster e um álcool); e a transesterificação, (troca entre um éster e um outro éster). Na hidrólise, há o ataque na ligação éster do triglicerídeo na presença de moléculas de água para produzir glicerol e ácidos graxos. No fracionamento, os ácidos graxos e os triacilgliceróis não são alterados, acontece uma separação física entre as frações sólida e líquida. E na hidrogenação, há a modificação química dos ácidos graxos, por saturação, isomerização espacial (cis-trans) ou de posição (mudança das ligações duplas da cadeia), inalterando as ligações éster (CASTRO *et al.*, 2004; GIOIELLI, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Figura 1 – Reações para modificação de óleos e gorduras



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Esses processos quando catalisados por biocatalisadores mostram-se vantajosos, por exemplo, permitindo a obtenção de produtos biodegradáveis, mínima formação de subprodutos, redução da quantidade de resíduos, e emprego de rotas mais acessíveis de produção (ABED *et al.*, 2018; CHOI, 2011, KIM; AKOH 2015).

### 3.1.1 Óleo de semente de uva

Motivados pela busca de óleos mais saudáveis, estudos buscam fontes alternativas aos comumente utilizados, como óleo de soja, canola, milho, girassol e azeite de oliva (SHINAGAWA *et al.*, 2018). O óleo de semente de uva é matéria prima na indústria, destinado à medicina, alimentos e cosméticos. Rico em vitamina E, antioxidantes e óleos essenciais, em destaque o óleo linoleico (C18:2), e oleico (C18:1), contendo traços de linolênico (C18:3) e palmitoleico (C16: 1), sendo linoleico e linolênico essenciais para o bom funcionamento de vários órgãos e por não serem produzidos pelo organismo devem estar presentes na alimentação (CHOI, 2011; DE SOUZA, 2018; MEDINA *et al.*, 2015). Fabricado na Alemanha, França e Itália desde 1930 e bem difundido na Europa (SHINAGAWA, 2015), no Brasil seu uso não é comum, o que leva a profunda importância de se desenvolver tecnologias que disseminem seu uso para aproveitamento de seus benefícios à saúde, além de agregar valor ao resíduo, e diminuindo problemas ambientais e logísticos.

Segundo a Embrapa (2018), a produção de uvas no Brasil alcança 1,5 milhões de toneladas/ano, destinada em sua maioria a vinhos, sucos e para a fruta in natura. O cultivo ocorre em muitos estados no país, mais fortemente na região sul, com destaque para o Rio Grande do Sul. Estima-se que são gerados no Brasil cerca de 210 mil toneladas de resíduos de uva por ano, o que é referente a 16% da uva processada, onde também são encontradas as sementes. 10% da uva constituem-se de sementes. Mundialmente tem-se mais de 3 milhões de toneladas de sementes por ano, 38-52% da matéria seca. Essas apresentam um teor lipídico em torno de 7-20% (OLEGÁRIO *et al.*, 2015; SHINAGAWA, 2015; DE SOUZA, 2018).

Assim, o óleo de semente de uva é uma excelente alternativa como matéria-prima de triglicerídeos para a pesquisa.

### 3.2 ENZIMAS

Enzimas são substâncias orgânicas, de natureza proteica, consideradas catalisadores biológicos que favorecem o acontecimento das reações, que normalmente seriam pouco espontâneas e muito lentas. Isso acontece pelo fato de que em sua presença haver a diminuição da energia de ativação necessária dos reagentes, também denominados substrato (RADZICKA; WOLFENDEN, 1995). Assim, a velocidade da reação é maior e a energia de ativação menor.

Uma das características importante das enzimas quando comparadas a catalisadores químicos é a alta especificidade, o que as tornam mais eficazes. Cada enzima é específica em relação à reação que catalisa e ao substrato presente nesta reação. Essa especificidade está, por exemplo, relacionada ao seu tamanho e forma, o que gera uma complementaridade com o substrato. Carga e características hidrofílicas/hidrofóbicas, níveis de estereoespecificidade, regioseletividade e quimiosseletividade, também são responsáveis por essa especificidade. Existem também fatores que podem alterar a atividade da enzima, resultando em sua inibição ou mesmo desnaturação. São eles: temperatura, pH, concentração da enzima e do substrato, tempo (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; ROCHA, 2010).

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), em 1971, estabeleceu normas de nomenclatura e classificação das enzimas. São classificadas segundo vários critérios, mais comumente de acordo com o tipo de reação que catalisa, divididas em seis classes que são subdivididas e identificadas pelo número da EC. As classes são: oxirredutases (catalisam reações de óxido-redução), transferases (catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra), hidrolases (catalisam reações de hidrólises), liases (catalisam reações de quebra de ligação), isomerases (catalisam reações de mudança intramolecular, em que um substrato se transforma em um produto isômero), ligases (catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia) (ARAÚJO, 2013).

A enzima utilizada nesta pesquisa é uma lipase, pertencente à classe das hidrolases, de *Rhizopus oryzae*.

### 3.2.1 Lipase

As lipases, (triacilglicerol-acil hidrolases, EC 3.1.1.3), pertencentes à classe das hidrolases, são enzimas que catalisam reações de gorduras e óleos (seus substratos naturais), ainda, também são capazes de catalisar diversas reações em ambos os meios, aquosos e não aquosos (MEHTA; BODH; GUPTA, 2017; RAMOS; MALCATA, 2017).

O reconhecimento das vantagens em sua aplicação como catalisadores em processos industriais, entre eles, que envolvem reações de hidrólise, de síntese e de interesterificação de lipídios, e o grande potencial de aplicação das lipases justifica o aumento do interesse industrial por tecnologias enzimáticas. Esse interesse é também justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos, e sua régio e enantiosseletividade (RAMOS; MALCATA, 2017; ROVEDA *et al.*, 2010).

Das características estruturais, isentando as diferenças na massa molecular, na seletividade de substratos, na resposta a ativadores e inibidores, etc., a estrutura da maior parte das lipases é composta por no mínimo cinco estruturas  $\beta$ -pregueadas em paralelo separadas por porções de  $\alpha$ -hélices, com peptídeos helicoidais cobrindo grande parcela de sua superfície (KOBBLITZ, 2003). Pleiss et al. (1998) têm como principal conclusão que a estrutura dos sítios ativos de diversas lipases é normalmente mais largo e profundo, o que poderia explicar a capacidade que as lipases têm de reconhecer substratos mais variados e com cadeias mais longas. Nas lipases, o sítio ativo fica localizado em uma cavidade hidrofóbica, geralmente protegida por uma “tampa” polipeptídica, também conhecida por “lid”, constituída por aminoácidos polares na parte externa e por aminoácidos apolares na parte interna. A lipase permanece numa conformação fechada quando em fase aquosa, abaixo do seu limite de solubilidade ou na ausência de uma emulsão ou em baixa concentração de um substrato lipídico, ficando seu sítio ativo inacessível ao substrato. Em situações contrárias, as lipases sofrem uma mudança conformacional na região da tampa adquirindo uma conformação aberta e expondo o seu sítio ativo, sendo possível que a enzima catalise a reação. Esse aumento de atividade na presença de micelas ou emulsões, deve-se ao fenômeno conhecido como ativação interfacial

(JUNIOR, 2014; MENDES, 2009; VAZ; CHOUPINA, 2012; ZHAO *et al.*, 2019; ZORN *et al.*, 2016).

Em relação à especificidade, as lipases são classificadas em lipases não-específicas, as quais catalisam as reações nas posições sn-1, sn-2 e sn-3 do triglicerídeo de forma aleatória, e lipases 1,3-específicas, atuando nas posições sn-1 e sn-3 do triglicerídeo, com uma catálise mais controlada e obtendo a formação de produtos diferentes das obtidas por lipases não-específicas (CAMPOS, 2010; VAZ; CHOUPINA, 2012).

A grande quantidade de reações que as lipases catalisam conferem-nas relevância entre os biocatalisadores e importância nos processos biotecnológicos. Além de reações de hidrólise (sentido direto), são capazes de catalisar reações reversas de síntese quando em pouca disponibilidade ou ausência de água no meio reacional, como esterificação, transesterificação e interesterificação (DE SOUZA, 2015; LUZ, 2014).

Outra especificidade das lipases é a seletividade de substrato, podendo priorizar um determinado grupo de substratos, distinguindo-os, em geral, ao tamanho da cadeia carbônica ou grau de insaturação do grupo acil em questão (CAMPOS, 2010).

São vastamente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas, porém, as lipases microbianas são mais comumente utilizadas (DE CASTRO *et al.*, 2010). Em estudos prévios do grupo de pesquisa, a lipase de *Rhizopus oryzae* foi selecionada como biocatalisador a ser utilizado nas pesquisas (LASCHI, 2019). O *Rhizopus oryzae* (ROL) é um dos microorganismos mais utilizados para produção de lipases, encontrado em regiões de climas tropical e sub-tropical, possuem rápido crescimento e podem ser isolados de diversas fontes, como frutas, vegetais, sementes e no solo (LONDOÑO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2017; VILAS BÔAS *et al.*, 2018).

Apesar de sua elevada aplicabilidade, não são plenamente utilizadas em escala industrial devido seu alto custo, dificuldade de separação do meio reacional e instabilidade de suas estruturas quando em condições desnaturantes (RODRIGUES, 2009). Uma alternativa, que vem sendo bastante estudada como resposta, é a imobilização da enzima.

### 3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Enzimas imobilizadas são definidas como enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma região do espaço com retenção de sua atividade catalítica e que podem ser utilizadas repetida e continuamente (IUPAC, 1995). Em relação à sua forma livre, as enzimas quando imobilizadas possuem diversas vantagens, tais como: possibilidade de reutilização da preparação enzimática, com redução no custo, possibilidade de utilização em processos contínuos e a fácil separação da enzima dos produtos. Além disso, também podem ser melhorados o desempenho da enzima como atividade, seletividade, estabilidade operacional e ao armazenamento (DUARTE, 2016).

Visto os benefícios, houve uma expansão das técnicas de imobilização objetivando adequar às variabilidades de cada enzima. Apesar da grande diversidade de métodos, não há um aplicável para todas as enzimas. Assim, é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato e que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e estabilidade operacional (MENDES *et al.*, 2011). A eficiência na imobilização depende das características físico-cinéticas da enzima, como também, as características físico-químicas dos diferentes suportes e os objetivos de uso deste derivado.

A forma mais usual de classificar foi a adotada pela IUPAC (1995), onde as enzimas imobilizadas são divididas em duas classes, como é mostrado na Figura 2:

Figura 2 – Classificação das enzimas imobilizadas segundo a IUPAC (1995)



Fonte: BRÍGIDA (2010, p. 21).

A Tabela 1 apresenta um comparativo entre os principais métodos de imobilização:

Tabela 1 – Comparativo entre os métodos de imobilização

<b>Características</b>	<b>Adsorção física</b>	<b>Ligação covalente</b>	<b>Ligação cruzada</b>	<b>Confinamentos</b>
Preparação	Simples	Difícil	Intermediária	Difícil
Força da ligação	Fraca	Forte	Forte	Intermediária
Atividade	Intermediária	Alta	Baixa	Baixa
Recuperação do suporte	Possível	Rara	Impossível	Impossível
Custo	Baixo	Alto	Intermediário	Intermediário
Estabilidade	Baixa	Alta	Alta	Baixa
Aplicabilidade geral	Sim	Não	Não	Sim
Proteção microbiana	Não	Não	Intermediária	Sim

Fonte: Adaptada de PEREIRA, 2019.

A imobilização por encapsulamento consiste em aprisionar a enzima no interior de uma matriz polimérica, dentro de cápsulas ou entre membranas, sem estabelecer qualquer ligação química. Neste método, a enzima não está ligada ao suporte, fazendo com que não haja alteração na estrutura e evitando também a desnaturação (DUTTA, 2008). Porém, significativas dificuldades difusionais, o escape da enzima e a instabilidade dos suportes normalmente utilizados, por exemplo, são fatores limitantes (CARVALHO *et al.*, 2006; DUARTE, 2016).

A imobilização por ligação pode ser realizada por adsorção ou por ligação covalente com o suporte ou ligação cruzada entre enzimas. O método por ligação covalente baseia-se nas ligações covalentes dos grupos funcionais presentes na enzima: grupamento amino, carboxila, hidroxila e/ou sulfidril, à superfície do suporte. É frequentemente realizada na presença de um agente ativador, como o glutaraldeído, em suportes contendo grupamentos amino primários (POPPE *et*

*al.*, 2015). Outros exemplos descritos na literatura para agentes ativadores são a genipina e a epicloridrina (MENDES *et al.*, 2011). A enzima é firmemente ligada ao suporte, evitando sua lixiviação. Essa técnica reduz a flexibilidade conformacional e as vibrações térmicas, evitando o desdobramento e desnaturação da proteína. Como desvantagens, ocorre diminuição da liberdade de movimento, o que pode resultar em diminuição da atividade enzimática (GARMROODI *et al.*, 2016). Além de gerar maiores custos na obtenção de enzima insolúvel, devido ao uso de agentes funcionalizantes na etapa de ativação do suporte, e demandar maiores estudos para seleção das condições de imobilização (BRÍGIDA, 2010).

Outro método é por ligação cruzada (entrecruzamento) ou *cross-linking*, que acontece sem a presença de um suporte sólido, ligadas entre si por meio de agentes reticulantes. Esses agentes químicos utilizados podem ser os mesmos utilizados na imobilização com suporte, sendo o glutaraldeído um dos mais utilizados (LEMOS, 2018). Apesar de ter elevada estabilidade a altas temperaturas e solventes orgânicos, os aglomerados de enzimas possuem baixa estabilidade mecânica. Além disso, esta técnica tem baixa atividade recuperada, pode causar mudanças significativas no sítio ativo da enzima e como as interações ocorrem de forma aleatória, tem baixa reprodutibilidade (CAO 2005; DE CASTRO *et al.*, 2008; LEMOS, 2018). As duas estratégias de ligações cruzadas mais utilizadas são os CLECs - crosslinking enzyme crystals, cristalização de enzimas puras, seguida pela reticulação ou os CLEAs - crosslinking enzyme aggregates, com agregação das enzimas antes da reticulação (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

A imobilização de enzimas por adsorção se dá pela ligação da enzima com o suporte sólido por meio de adsorção física, ligações iônicas, ligações hidrofóbicas e forças atrativas de van de Waals, ou também uma combinação destas. Para reações conduzidas em meio orgânico não são requeridas fortes interações entre enzima e suporte, já que, a enzima é insolúvel no meio apolar (LEMOS 2018; VESCOVI, 2016).

Este método destaca-se por tratar-se de uma técnica simples, rápida, de baixo custo, por não ser necessário a ativação do suporte e permitir fácil reuso, e que, em geral, causa pouca ou nenhuma mudança conformacional na enzima, mantendo sua atividade catalítica. Contudo, pode ocorrer a dessorção da

enzima, sendo sensíveis quanto às condições do meio, quando submetidas às variações de temperatura, pH, força iônica, ou na presença do substrato, (MARUM, 2018; QUEISSADA, SILVA, 2020; SHELDON; VAN PELT, 2013). A eficiência deste método depende de vários parâmetros, entre eles, tamanho da enzima a ser adsorvida, área superficial do adsorvente, porosidade e tamanho do poro, possibilitando o contato da enzima com a superfície interna do suporte (LIMA, 2013; PEREIRA, 2014).

Secundo et al. (2008) relata que o método de adsorção é o mais utilizado para lipases. Devido seu caráter hidrofóbico, geralmente são imobilizadas em suportes hidrofóbicos em um meio de baixa força iônica, possibilitando em uma só etapa a imobilização, a purificação (somente lipases são adsorvidas), a ativação (lipase é imobilizada com a "tampa" aberta) e a estabilização da enzima (LIMA, 2013; PALOMO *et al.*, 2002).

Diferentes materiais podem ser utilizados como suporte para uma imobilização. Pode-se dizer que não há um suporte universal aplicável em todas situações.

### **3.3.1 Suportes para imobilização**

A seleção do suporte de imobilização provém, principalmente, da enzima a ser imobilizada e do processo a ser empregado. Além disso, as principais propriedades físicas e químicas do suporte devem ser analisadas, como: pH, natureza hidrofóbica e hidrofílica, morfologia, composição, resistência ao ataque microbiológico, resistência mecânica, entre outras. Os suportes podem ser porosos, não porosos ou em gel. Quando orgânicos podem ser naturais ou sintéticos e por sua vez, os inorgânicos, minerais ou fabricados (BRÍGIDA, 2010; CABRAL, 2012; FALLEIROS, 2012).

Apesar dos crescentes estudos e benefícios, os custos se tornam o entrave para o aumento de escala em bioprocessos utilizando enzimas imobilizadas. Com isso, pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando suportes mais econômicos, em que os resíduos agroindustriais são apontados como possibilidade, com objetivo de reduzir os custos no processo de imobilização de enzimas, além de oferecer uma melhora em seu desempenho.

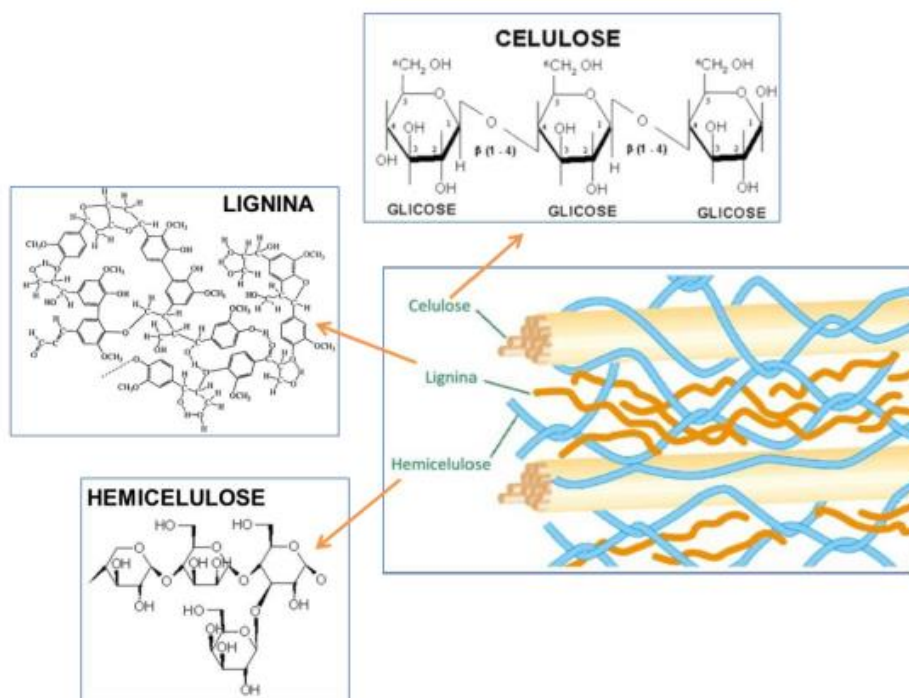
### 3.3.1.1 Pó de sabugo de milho

A demanda por suportes alternativos de natureza orgânica se mantém crescente, motivados pela facilidade, abundância, baixo custo e por serem ecologicamente corretos. Suportes orgânicos naturais provindos de resíduos agroindustriais têm se destacado, devido, também, aos avanços na geração de resíduos causada pela expansão de áreas cultivadas. No Brasil, os resíduos agroindustriais mais abundantes são, bagaço da cana de açúcar, palha de cana, palha de soja, palha de arroz e sabugo de milho (CASTRO; PEREIRA JR., 2010). Estes resíduos, como em sua maioria, são materiais lignocelulósicos, ou seja, constituído principalmente de celulose, hemicelulose e lignina.

O Brasil é o terceiro no ranking de produtores de milho e o segundo em exportação, atrás apenas dos Estados Unidos (EMBRAPA, 2018). Segundo a Conab (2018), a produção do grão no Brasil tem aumentado, com uma produção anual média no país de mais de 80 milhões de toneladas nos últimos anos, decorrente da demanda doméstica e consumo animal, além do crescimento das exportações (CONTINI *et al.*, 2019). A espiga de milho é constituída de três partes: grão, palha e sabugo, sendo os dois últimos resíduos gerados após a retirada do grão da espiga. São gerados, aproximadamente, para cada tonelada de milho, 180 kg de sabugo (TORRE *et al.*, 2008; TSAI, 2001) e 700 kg de palha (HORST, 2013).

A parede celular do sabugo de milho é composta majoritariamente por 32% de celulose, 35% de hemicelulose, 20% de lignina (SILVA *et al.*, 2016), além de outros compostos inorgânicos e moléculas extraíveis, como solventes orgânicos, pectinas, carboidratos simples, terpenos, alcaloides, saponinas, polifenólicos, gamas, resinas, gorduras, graxas, entre outros (SILVA *et al.*, 2009). As fibras naturais vegetais são também denominadas fibras celulósicas, por ter como principal componente a celulose, ou ainda, fibras lignocelulósicas por normalmente serem ligadas a lignina, um polímero fenólico natural (MARINELLI *et al.*, 2008). A representação da estrutura celular de vegetais, como do pó de sabugo de milho, pode ser observada na Figura 3.

Figura 3 – Representação da parede celular do pó de sabugo de milho



Fonte: CRUZ (2017, p. 33).

A etapa de tratamento torna-se, então, parte chave para processos enzimáticos. Com o tratamento, causa-se uma desorganização do complexo lignocelulósico. Assim, quebrando a matriz de lignina e rompendo a estrutura cristalina da celulose, resultando no aumento da área superficial interna do substrato, entre outros objetivos (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; RABELO, 2010).

De acordo com Assumpção (2015), não existe um tratamento específico para as diversas fibras lignocelulósicas existentes, já que sua estrutura e composição química depende de diversos fatores como, idade, parte da planta a ser extraída, condições climáticas e de plantio, entre outras. É necessário avaliar a fibra a ser tratada e a finalidade. Os métodos são classificados em físicos, químicos, físico-químicos, biológicos e podendo haver uma combinação entre eles (BALAT *et al.*, 2008; BRODEUR *et al.*, 2011).

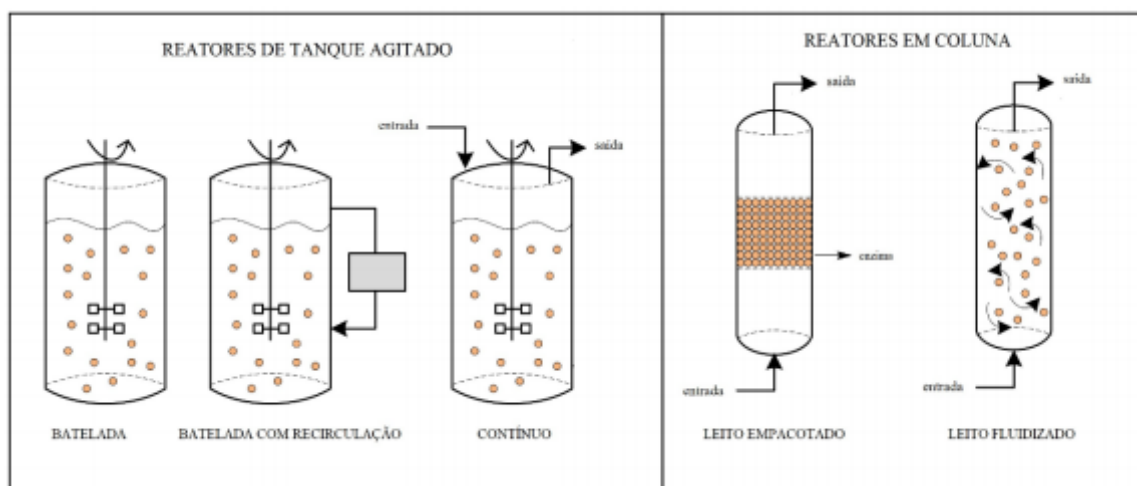
Mostra-se assim que resíduos agroindustriais são uma alternativa eficaz e de baixo custo para o uso como suportes para imobilização de enzimas, trazendo um novo destino ecologicamente correto para esses resíduos e agregando valor.

### 3.4 BIORREATORES E MODO DE OPERAÇÃO

Biorreator ou reator enzimático refere-se aquele equipamento onde há o contato entre enzima e substrato. A seleção do reator a ser utilizado em determinado bioprocessamento depende de certos fatores que estão associados às características da bioconversão e às condições reacionais, como o formato do suporte de imobilização, natureza do substrato, requisitos operacionais, cinética de reação, superfície catalítica, transferência de massa, substituição e regeneração do catalisador, construção do biorreator, custo operacional e modo de operação (PINO *et al.*, 2018; RICO, 2015; TODESCHINI, 2017).

Na síntese dos triglicerídeos, reatores de tanque agitado (STR) operados em batelada e reatores de leito fixo (PBR) operando em reciclo total ou contínuo são os mais utilizados (RAMOS *et al.*, 2017). As reações enzimáticas descritas na literatura são realizadas em sua maioria em reatores de tanque agitado (STR), sendo os reatores de leito fixo (PBR) ainda pouco explorados. A Figura 4 faz a representação dos principais tipos de biorreatores:

Figura 4 – Representação dos biorreatores de tanque agitado e em coluna



Fonte: POPPE *et al.* (2015, p. 7).

Os reatores podem ser operados de dois modos: descontínuo ou contínuo. Nos processos operados no modo descontínuo ou batelada, em geral, enzima e substrato são colocados no reator que são agitados mecanicamente por hélices ou, quando em escala laboratorial, por agitadores magnéticos e

quando alcançada a conversão desejada, todo meio é retirado (FOGLER, 2012; LASCHI, 2020; LEVENSPIEL, 2006). De simples operação, permite maior contato entre reagentes e biocatalisador, este modo é vantajoso em escala de bancada, onde é necessário conhecer o processo e coletar dados, como a cinética da reação. Porém, para processos enzimáticos em escala industrial pode apresentar algumas restrições. Devido aos agitadores, pode ocorrer rupturas na enzima imobilizada, pela alta tensão de cisalhamento. Além disso, há uma baixa produção e um tempo morto maior entre as recargas (FERNANDES, 2010).

O modo contínuo é também utilizado em tanques agitados, porém, característico dos reatores tubulares, onde as reações acontecem de forma contínua enquanto o meio reacional flui pelo reator (FOGLER, 2012; LEVENSPIEL, 2006). O tempo de reação, tempo que as partículas permanecem no reator, é denominado tempo de residência. Em um processo ideal, o tempo de residência é o mesmo do tempo espacial. O tempo espacial ( $\tau$ ) é o tempo que teoricamente o fluido leva para passar completamente pelo reator, baseado nas condições de entrada (FOGLER, 2012). Alta eficiência a um baixo custo operacional, facilidade de operação, proporcionando um controle de temperatura mais eficiente, facilidade de construção, automação e ampliação de escala, redução de perdas durante paradas devido aos períodos de regime transiente mais curtos, menor grau de cisalhamento e requer menor volume de reação levando a um menor tempo de residência, são algumas das vantagens do modo contínuo (CARVALHO, 2008; DE SOUZA, 2013; RICO, 2015).

### **3.4.1 Reator de leito fixo**

Os reatores de leito fixo (PBR), também chamados de reatores de recheio, geralmente apresentam configuração tubular e são considerados heterogêneos (FOGLER, 2012). A coluna interna cilíndrica é preenchida pelo biocatalisador que é mantido compacto e imóvel, e o substrato flui de maneira ascendente ou descendente, sendo esse, líquido ou gasoso (TRAN; CHEN; CHANG, 2016).

Entre as vantagens estão, simples operação que requer um mínimo de equipamentos auxiliares, o que também é um fator para um baixo custo; eficiente, gerando alta produção; apresenta tensões de cisalhamento menores;

como as partículas do biocatalisador estão fixas, a sua recuperação é facilitada, não havendo a necessidade de separação na saída do reator; utilizado para grande escala em indústrias, sendo alguns produtos rentáveis apenas em uso desta configuração. No entanto, em contraponto apresenta limitações difusionais intraparticulares que afetam a velocidade global de reação, disposição à obstrução do leito e aparecimento de caminhos preferenciais, alta queda de pressão no escoamento do fluido do leito e limitações de transferência de massa e calor, visto que a taxa de liberação ou consumo de energia ao longo do reator não é uniforme, podendo ser maior na entrada do reator devido a maior taxa de reação (FOGLER, 2012; DE FARIA, 2014; GRUBECKI, 2018).

O leito fixo é comumente empregado em reações enzimáticas. O tamanho das partículas deve ser analisado de acordo com o processo para ser possível controlar a queda de pressão através do fluxo de alimentação. Este fluxo deve ter baixas velocidades, a fim de aumentar o contato entre enzima e substrato, porém se manter em taxa necessária para minimizar as variações de concentração ao longo do leito. O fluido passa de maneira aleatória entre, ao redor, e no caso de catalisadores porosos, dentro das partículas. A velocidade de fluxo é maior em leitos com maior volume de poros vazios, entretanto a concentração do biocatalisador é menor, o que implica em espaços vagos que poderiam estar preenchidos aumentando o rendimento da reação. Porém, o fluxo é dificultado com a porosidade reduzida (tabe-SILVA, 2013; POPPE *et al.*, 2015; RAMOS, 2015). A distribuição uniforme e constante do fluxo está diretamente relacionada com o tempo de residência da reação.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Os equipamentos utilizados para o desenvolvimento dos experimentos estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho

<b>Equipamento</b>	<b>Fabricante / Modelo</b>
Balança analítica	Shimadzu, Modelo AUX 220
pHmetro	TECNAL, Modelo TEC 2
Balança determinadora de umidade	Shimadzu, Modelo MOC-63U
Autoclave	Phoenix-Luferco®, Modelo AV-75
Estufa de secagem	Quimis, Modelo Q317M-42
Agitador magnético	TECNAL, TE-0851
Agitador mecânico	Kasvi (Julabo Labortechnik), Modelo K40-1810H
Rotaevaporador	BÜCHI, Modelo R-124
Bomba peristáltica	SOLAB, Modelo SL-64
Bomba à vácuo	Prismatec, Modelo 121
Espectrofotômetro	GENESYS™ (Thermo Fisher Scientific), Modelo 10S UV-Vis
Cromatógrafo a gás	Shimadzu, Modelo CG-2014

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Os experimentos do presente trabalho foram efetuados utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*, de grau alimentício, gentilmente cedida pela Prozyn, São Paulo-SP. Como suporte para imobilização, foi utilizado o pó de sabugo de milho, descarte adquirido da empresa Sagraan Indústria e Comércio de Ingredientes Rações Ltda, Andira-PR. Ainda, os reagentes óleo de semente de uva (Distriol, São Paulo), ácido cáprico - C10 (Sigma Aldrich, Alemanha), azeite de oliva comercial, hexano, álcool comercial, acetona. Os demais reagentes foram de grau analítico.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Tratamento do suporte

Após triturado e peneirado, o suporte recolhido entre 42/60 mesh foi tratado termicamente e basicamente.

Tratamento térmico: Foram adicionados sabugo e etanol 70% na proporção 1:10 (m/v) e levados à autoclave à 120 °C por 20 minutos. Após, adicionou-se água destilada na mesma proporção e deixou-se em overnight.

Tratamento básico: Adicionou-se solução de hidróxido de sódio 2 mol/L na proporção 1:10, sabugo:solução (m/v), deixando sob agitação por 24 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, filtrado lavando abundantemente com água destilada morna. O suporte foi, então, seco em estufa, aproximadamente 50 °C e armazenado em câmara fria.

### 4.2.2 Imobilização por adsorção física

Foi adicionado hexano ao suporte na proporção de 1:10 (m/v), deixou-se sob agitação suave por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, para cada grama de suporte, adicionaram-se 20 mL de solução de lipase (solução em tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0). Deixou-se novamente sob agitação suave por 2 horas em temperatura ambiente. Após este período, a suspensão foi incubada por 24 horas em refrigeração, aproximadamente 9 °C. Posteriormente, o biocatalizador imobilizado foi filtrado em papel de filtro e bomba a vácuo e armazenado em refrigeração.

### 4.2.3 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica das preparações enzimáticas foi determinada pelo método de emulsão de azeite, conforme metodologia adaptada de Soares et.al (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 10 gramas de azeite de oliva, 10 gramas de água, 16 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L e pH 7,0 e 14% da água de goma arábica. Em Erlenmeyer foram adicionados 4,5 mL da emulsão e, quando para a enzima em sua forma livre, 1 mL de solução enzimática 0,5

mg/mL; quando imobilizada, 0,25 g. Também foi realizada a incubação de um branco, sem a adição de enzima. Colocados em banho com agitação a 37 °C por 5 minutos. A reação foi cessada adicionando 10 mL da solução de água:acetona:álcool (1:1:1, v/v/v). Adicionou-se 3 gotas de fenolfitaleína, como indicador, e 10 mL de hidróxido de potássio 0,05 M. Os ácidos graxos liberados foram titulados por retrotitulação com ácido clorídrico 0,05 M, previamente padronizado. O cálculo de atividade hidrolítica foi realizado de acordo com a Equação 1:

$$A \left( \frac{U}{g} \right) = \frac{(Vb - Va) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot ms} \quad (1)$$

Onde: Vb é o volume gasto de ácido clorídrico na titulação do branco, em mL; Va é o volume gasto de ácido clorídrico na titulação da amostra, em mL; M é a molaridade do titulante, em mol/L; t é o tempo da reação (5 minutos); ms é a massa seca da enzima, em gramas, expressa pelas Equações 2 e 3.

Para a enzima livre:

$$ms (g) = \frac{mt \cdot 1mL \cdot 100}{vt \cdot (100 - u)} \quad (2)$$

Onde: mt é a massa total de enzima utilizada, em gramas; vt é o volume de tampão utilizado na solução enzimática, em mL; u é a umidade da enzima livre, em %.

Para a enzima imobilizada:

$$ms (g) = \frac{mu \cdot 100}{100 - u} \quad (3)$$

Onde: mu é a massa úmida de enzima utilizada, em gramas; u é a umidade da enzima imobilizada, em %.

#### 4.2.4 Teste de carregamento enzimático

Foram preparadas soluções enzimáticas em tampão fosfato, 0,1 mol/L e pH 7,0, em diferentes concentrações, 10, 15, 20, 30 e 35 mg/mL. Utilizou-se de 1 grama de suporte para a imobilização variando a concentração da solução enzimática utilizada, de acordo com o item 3.2.2. A suspensão passou por etapa de separação em funil para recolher o sobrenadante. Após seguiu-se com a filtração e secagem. Dosou-se a atividade hidrolítica do controle (sem enzima), do sobrenadante e do imobilizado.

Para o comparativo, observou-se o Rendimento de Imobilização e a Atividade Recuperada, calculados pelas seguintes equações:

Para calcular o Rendimento de Imobilização (RI), equação 4:

$$RI (\%) = \frac{At}{A0} \times 100 \quad (4)$$

Para calcular a Atividade Recuperada (AR), equação 5

$$AR (\%) = \frac{Ader}{At} \times 100 \quad (5)$$

Onde: At: atividade teoricamente imobilizada, em U/g. A0: atividade oferecida na imobilização, em U/g. Ader: atividade do derivado imobilizado, em (U/g).

- A0 é a atividade oferecida na imobilização, dosada no controle e calculada pela equação 6:

$$A0 (U/g) = \frac{At0 \times me}{ms} \quad (6)$$

Onde: At0: atividade da solução enzimática, em U/g; me: massa de enzima, em g; ms: massa de suporte, em g.

- At é a atividade teoricamente imobilizada, equação 7:

$$At (U/g) = A0 - Af \quad (7)$$

- Af é a atividade não imobilizada, dosada pelo sobrenadante, equação 8:

$$Af (U/g) = \frac{Atf \times v}{ms} \quad (8)$$

Onde: Atf: atividade final do sobrenadante, em U/mL; v: volume final do sobrenadante, em mL; ms: massa de suporte, em g.

#### 4.2.5 Caracterização da enzima imobilizada

Para a caracterização da enzima imobilizada definiu-se temperatura e pH ótimos realizando um planejamento experimental de delineamento composto central rotacional (DCCR), utilizando o software Protimiza Experimental Design® (2014). A Tabela 3 mostra os valores dos níveis para cada fator utilizado.

Tabela 3 – Valores utilizados no planejamento experimental para a caracterização da enzima imobilizada

	<b>-1,41</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,41</b>
T (°C)	24	30	45	60	66
pH	5,0	5,5	7,75	10,0	10,5

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Os ensaios foram realizados de acordo com o item 3.2.3 para determinar a atividade hidrolítica, diferenciados pela temperatura do banho de incubação e pH da solução tampão utilizada na solução enzimática.

#### 4.2.6 Estabilidade térmica

Para a enzima livre, preparou-se a solução enzimática, 0,5 mg/mL, deixando-a incubada em banho com agitação, variando a temperatura para os diferentes ensaios em, 35, 41 e 45 °C. Para a enzima imobilizada, 0,25 g foram incubadas em 2 mL de tampão fosfato (0,1 mol/L e pH 7,0) nas temperaturas mencionadas.

A cada tempo pré-estabelecido de, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos as amostras eram imediatamente resfriadas em banho de gelo, retirando a alíquota de 1 mL da solução enzimática e a amostra da enzima imobilizada, acrescidas de 2,5 mL de emulsão de azeite de oliva para dosagem da atividade hidrolítica, de acordo com o item 3.2.3.

#### 4.2.7 Cinética e Termodinâmica

Os parâmetros cinéticos e termodinâmicos para enzima livre e imobilizada foram determinados de acordo com as equações, apresentadas a seguir (FARIA, 2019; WALAA, 2018):

A constante de inativação térmica ( $k_d$ ) da enzima livre e imobilizada pôde ser obtida por regressão linear dos dados de atividade hidrolítica versus tempo obtidos com os testes de estabilidade térmica e calculada de acordo com a Equação 9:

$$\ln \frac{A}{A_0} = -K_d \cdot t \quad (9)$$

Sendo: A: atividade enzimática no tempo (U/g) t; A<sub>0</sub>: atividade enzimática inicial (U/g); t: tempo (min)

O tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) foi calculado de acordo com a Equação 10 e é inversamente proporcional à  $K_d$ :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (10)$$

A energia de desativação ( $E_d$ ) foi obtida por regressão linear dos dados de  $K_d$  versus temperatura, calculada de acordo com a equação de Arrhenius, representada pela Equação 11:

$$\ln k_d = -\frac{E_d}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln A \quad (11)$$

Sendo: R: constante universal dos gases (8,314 J/K.mol); T: temperatura (K)

Para determinar a eficiência de imobilização por meio do fator de estabilidade (FE) (Equação 12), é considerado o tempo de meia vida da enzima antes e após um processo de imobilização, calculado pela equação 12.

$$FE = \frac{t_{1/2\text{imobilizada}}}{t_{1/2\text{livre}}} \quad (12)$$

Sendo:  $t_{1/2\text{imobilizada}}$ : tempo de meia vida da enzima imobilizada;  $t_{1/2\text{livre}}$ : tempo de meia vida da enzima livre.

A  $E_d$  também está diretamente relacionada com os parâmetros termodinâmicos. A variação de entropia ( $\Delta S^*$ ), entalpia ( $\Delta H^*$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G^*$ ) de desnaturação térmica podem ser calculadas de acordo com as Equações 13, 14 e 15 a seguir:

$$\Delta H^* = E_d - RT \quad (13)$$

$$\Delta G^* = -RT \cdot \ln \frac{K_d \cdot h}{K_B \cdot T} \quad (14)$$

$$\Delta S^* = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (15)$$

Sendo:  $h$ : constante de Planck ( $6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{min}^{-1}$ );  $K_B$ : constante de Boltzmann ( $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$ )

#### 4.2.8 Índice de peróxido

Em um Erlenmeyer 2 g do óleo foram pesados, adicionaram-se, em seguida, 10 mL de isoctano, 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio, deixando-a descansar por aproximadamente 1 minuto em local escuro. Após, adicionou-se aproximadamente 20 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de amido (1%, m/v) como indicador para a titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,01 N, previamente padronizado. O índice de peróxido do óleo foi definido de acordo com a Equação 16.

$$\text{Peróxido (mEq)} = N \cdot (V_a - V_b) \frac{1000}{m} \quad (16)$$

Sendo: N: normalidade da solução de tiosulfato de sódio;  $V_a$  e  $V_b$ : volumes gastos na titulação da amostra e do branco, respectivamente, em mL; m: massa de óleo, em gramas.

#### 4.2.9 Reações em tanque agitado em batelada

Para definir os melhores parâmetros de razão molar do ácido, temperatura de reação e quantidade de biocatalisador utilizados para a síntese de triglicerídeos, realizou-se um planejamento experimental de delineamento composto central rotacional (DCCR), utilizando o software Protimiza Experimental Design® (2014). A Tabela 4 mostra os valores dos níveis para cada fator utilizado.

Tabela 4 – Valores utilizados para o planejamento experimental para as reações em batelada

	<b>-1,68</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,68</b>
Razão molar v/v	2,64	4	6	8	9,36
Temperatura °C	28,18	35	45	55	61,82
Biocatalisador %	6,59	10	15	20	23,41

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

O meio contendo o óleo de semente de uva e ácido cáprico (C10) foi preparado para um volume final de 20 g para as proporções utilizadas e colocado em reator de tanque agitado com 6 cm de altura e 3 cm de diâmetro, em banho termostático e operando em modo batelada. As reações foram mantidas por 24 horas sob agitação magnética de aproximadamente 200 rpm. Ao fim, separou-se o biocatalisador e recolheu-se o meio, deixando-o em refrigeração para posteriormente seguir as próximas etapas.

#### 4.2.10 Neutralização do meio reacional e separação dos ácidos graxos

Foram pesados 5 g do óleo e diluído em 30 mL de hexano, levados ao funil de separação e adicionados de 10mL de solução de 0,8mol/L de KOH hidroalcolico (30% etanol). Após ser agitada intensamente, houve a separação de fases da mistura: uma fase hidroalcolica contendo os ácidos graxos livres e uma fase de hexano contendo os triglicerídeos. A fase hidroalcolica passou por uma segunda extração com o acréscimo de mais 10mL de hexano. Por fim, as fases com hexano foram levadas em rotaevaporador a 40°C pelo tempo necessário para que o hexano seja evaporado. As amostras foram guardadas em vial de 20 mL em refrigeração.

#### **4.2.11 Metilação dos TAGs**

Em um vial de 20 mL foram adicionados 100 mg da amostra e 2 mL solução metanólica de hidróxido de sódio 0,2M. A mistura de reação foi colocada sob agitação vigorosa com barra de agitação em aquecimento no banho de glicerina previamente aquecido à 80 °C, durante 15 minutos. Após o tempo de reação, esperou-se resfriar a amostra e adicionou-se 2 mL de solução metanólica de ácido sulfúrico 1,0 M, colocando a mistura novamente à 80 °C sob agitação vigorosa por 15 minutos. Após, resfriou-se e adicionou-se 1 mL de solução saturada de NaCl e 2 mL de hexano, agitando a mistura vigorosamente para que haja a separação de fases. Transferiu-se a fase orgânica em outro vial de 20 mL e secou-se o hexano em nitrogênio. Por fim, o produto metilado foi armazenado sob refrigeração para posteriormente analisar a composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa.

#### **4.2.12 Determinação do perfil de ácidos graxos**

A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa, segundo a ISO 12966 (2014), substituindo-se o gás hélio pelo gás nitrogênio. Para estabelecimento do método de determinação de perfil de ácidos graxos (C4 à C24) e alguns ésteres de ácidos graxos, injetaram-se um mix de padrões de ésteres de ácidos graxos (mix de FAMES, Supelco®). Os testes foram realizados em cromatógrafo a gás utilizando injetor Split e detector de ionização por chama (DIC) e coluna Supelcowax (L x I.D. 30 m x 0,32 mm, df 0,5

µm). A temperatura do injetor e do detector foram de 250°C, sendo o modo de injeção Split (1:10) e o gás de arraste utilizado, nitrogênio, na vazão de 0,55 mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 60°C, atingindo 210°C (aquecimento de 20°C/min) e permanecendo por 7 minutos. Após, a temperatura foi elevada a 250 °C (20°C/min), e mantida por 14 minutos, resultando em 30 minutos total de análise. Posteriormente, as áreas dos picos obtidos foram relacionadas para determinação do grau de incorporação dos ácidos graxos.

#### 4.2.13 Grau de incorporação dos ácidos graxos

O grau de incorporação (GI) determina quanto do ácido foi incorporado à molécula do triglicerídeo. Foi calculado de acordo com a Equação 17 (CASAS-GODOY et al., 2013) com modificações:

$$GI (\%) = \frac{MFA}{MT} \cdot 100 \quad (17)$$

Sendo: MFA: número de mols de ácidos graxos de cadeia média (C10:0), MT: número de mols totais de ácidos graxos no triglicerídeo.

Os valores do GI (%) obtidos foram normalizados, de acordo com a Equação 18, uma vez que a lipase utilizada é 1,3 específica, ou seja, a substituição dos ácidos graxos somente ocorre nas posições sn-1 e sn-3 do triglicerídeo, resultando em um grau de incorporação máximo de 66,7%.

$$GI (\%) = \frac{X \cdot 100}{66,7} \quad (18)$$

#### 4.2.14 Curva de calibração do corante

Foram preparadas misturas (óleo de semente de uva e corante) com concentrações de 0,1; 0,15; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70 mg/mL, e as leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 545 nm. Com os resultados da média da triplicata das absorvâncias, construiu-se um gráfico relacionando a absorvância e a

concentração do traçador, obtendo-se a curva de calibração do corante a partir de regressão linear.

#### 4.2.15 Teste do traçador

A caracterização da mistura do reator foi realizada a partir da determinação da dispersão axial, conforme descrita por Zanin (2004). O teste foi realizado em reator de acrílico encamisado, com dimensões de 20,5 cm de altura e 2,2 cm de diâmetro, à 41 °C com auxílio de um banho termostático. O reator foi empacotado com 15 g de sabugo de milho previamente tratado, e alimentado com óleo de semente de uva em fluxo ascendente na vazão de 1 mL/min utilizando uma bomba peristáltica. O traçador utilizado foi uma solução 1% de corante lipossolúvel (corante de grau alimentício, rosa, da marca MIX®) em óleo de semente de uva. Inicialmente o reator foi operado até que haja a estabilização das condições de temperatura, vazão e altura do leito. Em seguida, foi aplicado o pulso de traçador injetando 0,5 ml na linha de alimentação do reator com o auxílio de uma seringa. Na saída do reator foram coletadas amostras com intervalo de 10 minutos, durante 150 minutos, sendo as absorvâncias de cada amostra determinada através do espectrofotômetro.

O Tempo Espacial ( $\tau$ ) foi calculado de acordo com Levenspiel (1972), conforme as Equações 18 e 19:

$$\tau = \frac{V_{\text{útil}}}{v_0} \quad (18)$$

Onde:  $V_{\text{útil}}$ : volume útil de reator,  $Q$ : vazão da bomba (mL.min<sup>-1</sup>).

$$V_{\text{útil}} = V_{\text{reator}} - V_{\text{enzima}} \quad (19)$$

Onde:  $V_{\text{reator}}$ : volume total do reator,  $V_{\text{enzima}}$ : volume ocupado pela enzima (determinado por densidade cristalina).

Por meio dos valores de concentração e tempo determinados, a função de Distribuição de Tempo de Residência (DTR),  $E(t)$ , foi calculada de acordo com a Equação 20, considerando a vazão volumétrica constante:

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t) dt} \quad (20)$$

Onde: C(t): concentração em cada tempo e o denominador a área sob a curva de concentração de traçador em função do tempo dada pela integral.

O tempo de residência médio ( $t_m$ ) foi calculado de acordo com a Equação 21.

$$t_m = \int_0^{\infty} E(t) \cdot t dt \quad (21)$$

#### 4.2.16 Reações em leito fixo com reciclo total

Para a síntese dos TAGs em reator de leito fixo, foi utilizado reator de acrílico encamisado com 20,5 cm de altura e 2,2 cm de diâmetro, operado à temperatura de 41 °C, vazão de alimentação de 1 mL/min em fluxo ascendente e sendo a reação mantida por 96 horas. O meio reacional era composto por óleo de semente de uva e ácido cáprico (C10) na proporção de 1:3 e o leito preenchido de 15 g do biocatalisador imobilizado. Foram coletadas alíquotas em 0, 1, 2, 4, 8, 24, 46, 72 e 96 horas.

#### 4.2.17 Mono-, di- e triglicerídeos

O ensaio para determinação do mono-, di- e triacilglicerol por cromatografia a gás foi realizado no CEMPEQC conforme a ABNT NBR 15908-15 adaptada. Foram pesados aproximadamente 10 mg de amostra, foram adicionados 100 mg de, 100 µL de MSTFA e 8 mL de heptano. Uma alíquota foi transferida para o vial e analisada em cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-2010, com injetor On-column à 380°C, detector de ionização por chama (DIC) e coluna cromatográfica Zebron ZB-5HT INFERNO (30m×0,32mm×10 µm), com temperatura inicial de 50 °C, mantida por 1 minuto, e aquecendo 15 °C/ min até 180 °C e após, 7 °C/ min até 230°C e então, 20 °C/ min até 380 °C, mantida por 10 minutos. Utilizando como gás de arraste o gás Hélio com velocidade linear de 54,0 cm/s, fluxo de 2,0 mL/min e pressão 1001,1 kPa. A análise teve o tempo total de 30 minutos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 IMOBILIZAÇÃO POR ADSORÇÃO FÍSICA

Na imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* optou-se por verificar o melhor carregamento enzimático para determinar quanto de enzima seria necessário para a saturação do suporte utilizado, objetivando explorar o melhor desempenho do biocatalizador sem utilizá-lo demasiadamente. Na Tabela 5 são apresentados os resultados de Rendimento de Imobilização (RI), Atividade Recuperada (AR) e Atividade do Imobilizado (AI) para cada Solução Enzimática (SE).

Tabela 5 – Rendimento de Imobilização, Atividade Recuperada e Atividade do Imobilizado

SE (mg/mL)	10	15	20	30	35
RI (%)	90,4 ±0,9	90,6 ±0,9	82,3 ±0,2	90,8 ±0,5	90,6 ±0,2
AR (%)	2,8 ±0,2	2,4 ±0,2	5,5 ±0,4	6,1 ±0,3	6,5 ±0,1
AI (U/g)	91,1 ±3,6	99,2 ±5,1	175,5 ±11,6	251,6 ±10,3	273,8 ±11,2

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

O carregamento de 30 mg/mL foi considerado o melhor resultado, visto que apresentou bom rendimento de imobilização (90,8%) e uma considerável atividade recuperada (6,1%). Apesar da baixa atividade recuperada esperada, possivelmente ligada ao método de imobilização ou suporte escolhidos (Barancelli, 2019), pode-se observar um aumento na atividade do imobilizado, fator esse de maior interesse, determinante para monitorar a presença de lipase ativa. Além disso, manteve-se próxima da apresentada pela solução de maior concentração. Bolina e colaboradores (2012) relatam que a máxima concentração de lipases de *Thermomyces lanuginosus* e de pâncreas de porco imobilizadas em partículas hidrofóbicas de poli-hidróxibutirato (PHB) por adsorção física foi de  $26,5 \pm 1,80$  e  $26,4 \pm 2,30$  mg de proteína/g de suporte, respectivamente. Rodrigues (2018) apresentou em seus resultados rendimento de imobilização por adsorção física da enzima comercial Lecitase® Ultra em derivados celulósicos com valor máximo de 56,93%, obtidos em maiores

concentrações de solução enzimática. Por tanto, nota-se o potencial demonstrado do sabugo de milho como suporte, assim como o método de imobilização. Além disso, os resultados mostram não ser necessário um carregamento maior e que possivelmente se atingiu ou esteja próximo à saturação do suporte.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

Para avaliar a influência da temperatura e do pH na atividade hidrolítica da enzima imobilizada foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR). O planejamento experimental  $2^2$  com 2 variáveis independentes, temperatura (T) (°C) e pH, sendo 4 experimentos fatoriais, 4 axiais e 3 repetições do ponto central, totalizando 11 experimentos, obtendo a atividade hidrolítica (U/g) da enzima imobilizada como resposta. A Tabela 6 apresenta a matriz do planejamento experimental.

Tabela 6 – Matriz do planejamento experimental da caracterização da enzima imobilizada

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais		Resposta
	T(°C)	pH	T(°C)	pH	Atividade (U/g)
1	-1	-1	30	5,5	93,45
2	1	-1	60	5,5	83,10
3	-1	1	30	10	121,52
4	1	1	60	10	83,19
5	-1,41	0	23,79	7,75	112,14
6	1,41	0	66,21	7,75	95,01
7	0	-1,41	45	4,57	104,79
8	0	1,41	45	10,93	83,01
9	0	0	45	7,75	154,44
10	0	0	45	7,75	158,47
11	0	0	45	7,75	158,41

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Pelo software Protimiza Experimental Design® (2014), obteve-se uma tabela com os coeficientes de regressão, erros padrão, os valores de t calculado e de p-valor para as variáveis significativas (Tabela 7). Além disso, gerou-se a ANOVA (Tabela 8), com nível de significância  $\alpha = 5\%$ , em que os efeitos

quadráticos das variáveis temperatura ( $x_1^2$ ) e pH ( $x_2^2$ ) e o efeito linear da variável temperatura ( $x_1$ ) apresentaram-se significativos ( $p$ -valor  $< 0,05$ ).

Tabela 7 - Coeficientes de regressão, erros padrão, os valores de t calculado e de p-valor na caracterização da enzima imobilizada

Nome	Coeficiente	Erro Padrão	t-calculado	p-valor
Média	157,11	5,94	26,47	0,0000
$x_1$	-9,11	3,64	-2,51	0,0406
$x_1^2$	-27,62	4,33	-6,38	0,0004
$x_2^2$	-32,46	4,33	-7,50	0,0001

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) na caracterização da enzima imobilizada

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
Regressão	8633,6	3	2877,9	27,2	0,00031
Resíduos	740,0	7	105,7	-	-
Falta de Ajuste	729,3	5	145,9	27,3	0,03565
Erro Puro	10,7	2	5,3	-	-
Total	9373,6	10	-	-	-

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

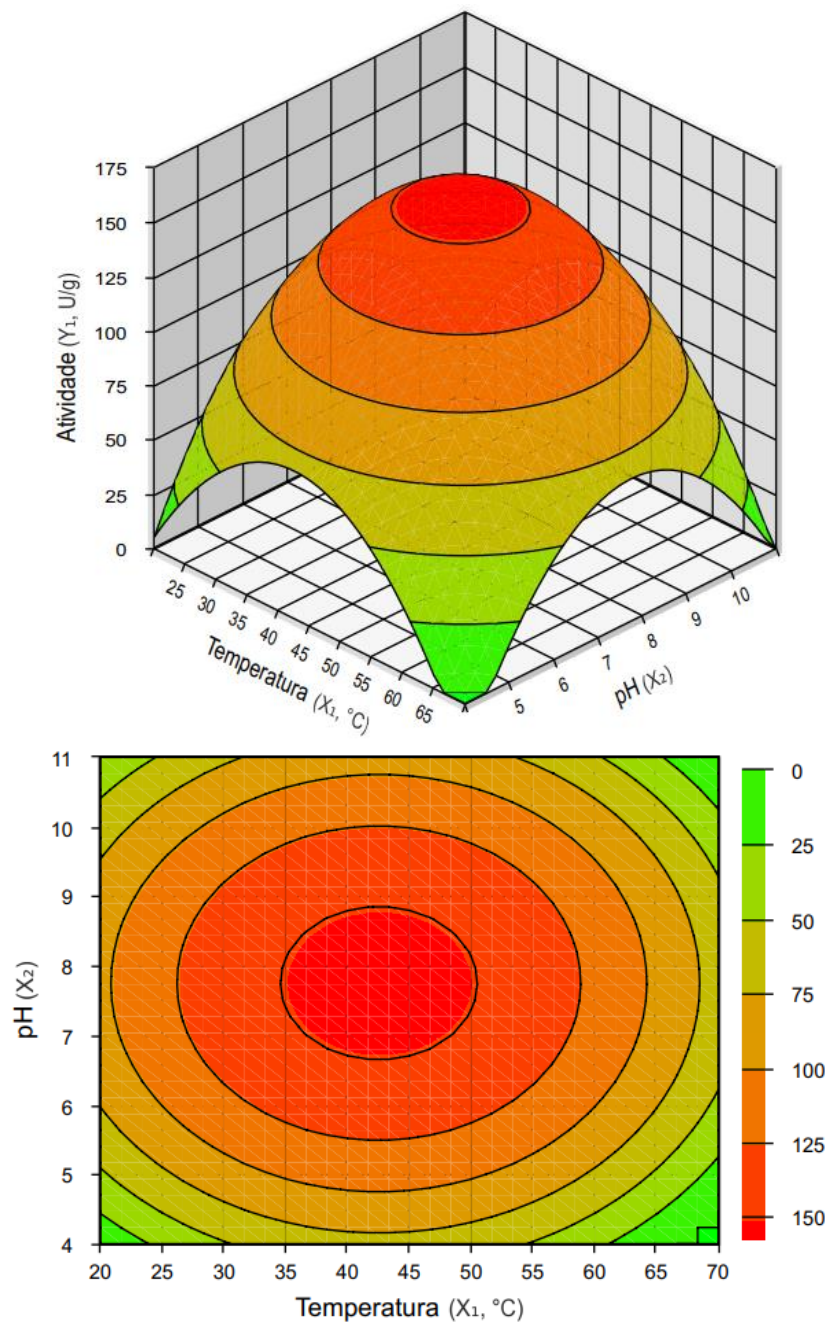
Como  $F_{\text{calc}} > F_{\text{Tabelado}}$  e  $R^2 = 92,11\%$ , o modelo pôde ser considerado estatisticamente significativo, ou seja, os valores experimentais se ajustam aos valores preditos. Pelo planejamento experimental, obteve-se o seguinte modelo matemático.

$$Y_1 = 157,11 - 9,11 x_1 - 27,62 x_1^2 - 32,46 x_2^2$$

Onde:  $Y_1$ : atividade enzimática (U/g);  $x_1$ : temperatura (°C);  $x_2$ : pH

Após a validação do modelo matemático, as superfícies de resposta foram geradas. A Figura 5 apresenta o gráfico de superfície da atividade enzimática em função da temperatura e pH.

Figura 5 – Superfície de resposta para atividade hidrolítica da enzima imobilizada.



Fonte: Dados da pesquisa (2020).

No gráfico (Figura 5), pode ser observado uma região ótima entre 35 e 50 °C e pH 6,7 a 8,9. O ponto ótimo obtido foi de 41 °C e pH de 7,75, confirmado em triplicata, com atividade hidrolítica média de  $158,4 \pm 20$  U/g, para o valor predito pelo modelo de  $157,57 \pm 6,02$  U/g. Estes valores foram confirmados na literatura, pois segundo Brígida (2010), lipases se apresentam ativas numa faixa de pH 4 a 10, sendo em sua maioria entre 7 e 9, e temperatura de 20 a 50 °C,

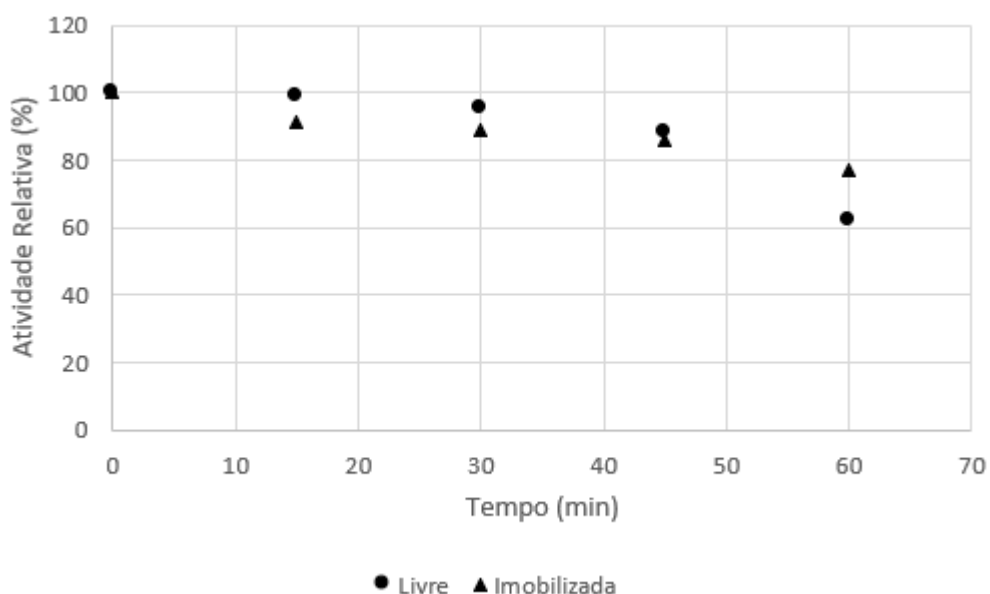
com valores ótimos entre 35 e 45 °C. Este resultado foi próximo pelo relatado por Facchini *et. al* (2018) que obtiveram 40 °C como a temperatura ótima para atividade de duas lipases de *Fusarium Verticillioides* imobilizadas em suportes hidrofóbicos. Pashangeh e colaboradores (2017) relataram também uma atividade catalítica máxima da lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em nanopartículas magnéticas em pH 8,0 e temperatura a 40 °C.

### 5.3 ESTABILIDADE TÉRMICA

Ao aumentar a temperatura, a taxa reacional também é aumentada, assim, em baixas temperaturas as enzimas movimentam-se lentamente, comprometendo a catálise. Entretanto, a elevação da temperatura e o tempo de exposição podem comprometer a estrutura da enzima e promover o aumento da taxa de desativação térmica, reduzindo a formação de produto (ALTARUGIO, 2016; GOMES, 2006).

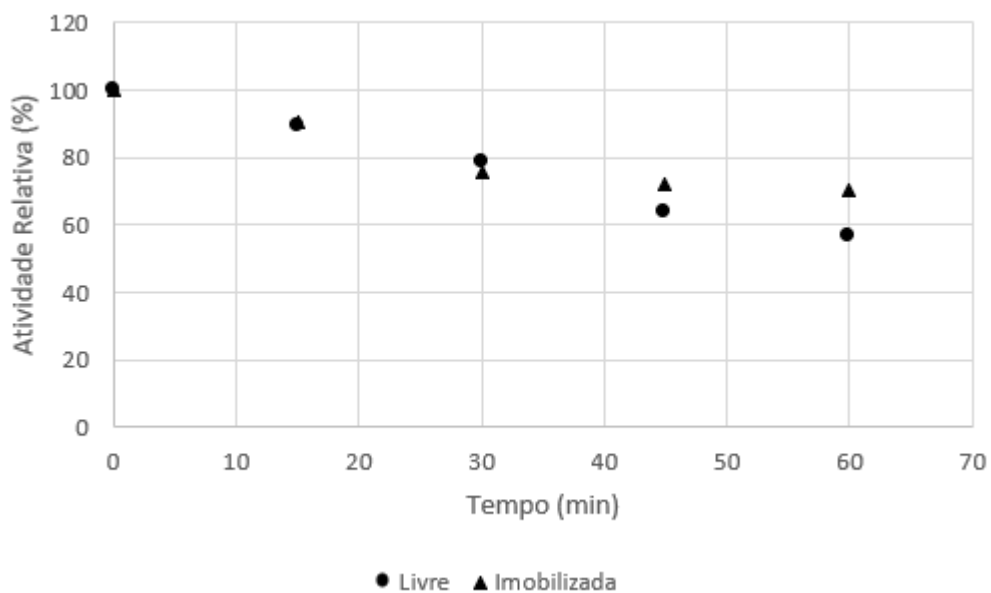
Para caracterizar a enzima imobilizada e livre quanto à estabilidade em diferentes temperaturas foi proposto o teste de estabilidade térmica nas temperaturas de 35 °C, 41 °C (temperatura definida como ótima) e 45 °C realizados de acordo com o item. Os perfis de inativação térmica são demonstrados nas Figura 6, 7 e 8.

Figura 6 – Perfil de desativação térmica à 35°C da enzima livre e imobilizada.



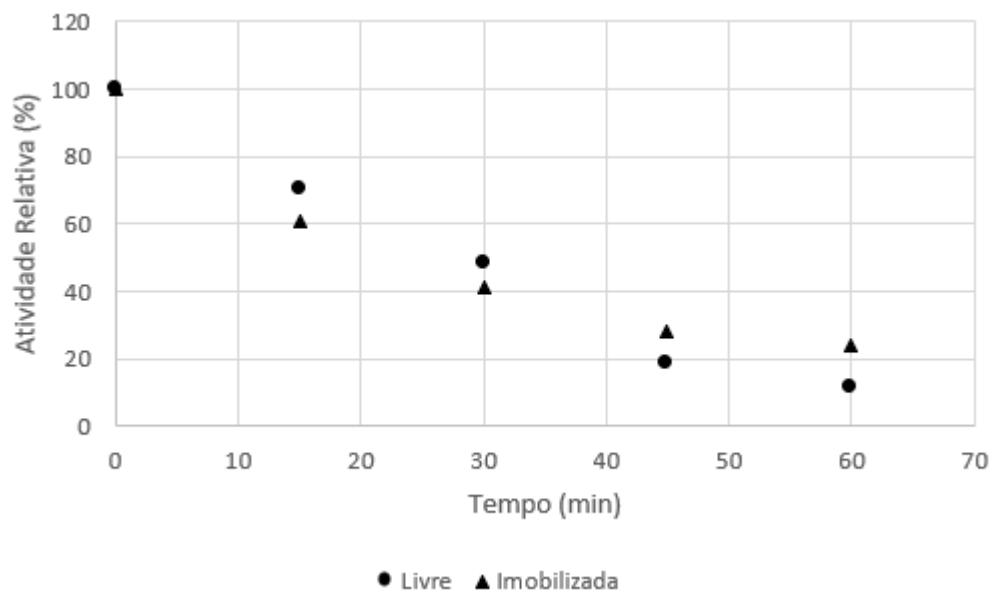
Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Figura 7 – Perfil de desativação térmica à 41 °C da enzima livre e imobilizada.



Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Figura 8 – Perfil de desativação térmica à 45 °C da enzima livre e imobilizada.



Fonte: Dados da pesquisa (2020).

A partir dos resultados apresentados nas Figuras 6, 7 e 8 pôde-se observar que a atividade relativa diminui com o aumento da temperatura, indicando que temperaturas superiores à 45 °C aceleram a inativação da enzima. As atividades relativas em 35 °C são, praticamente, constantes com o passar do tempo, demonstrando estável a temperaturas mais brandas. Ao final de 1h as atividades relativas dos derivados se apresentaram 15,07%, 13,48% e 12,82%

maiores na enzima imobilizada comparada à livre. Altarugio (2016) também encontrou resultados semelhantes onde a lipase de *Candida rugosa* livre e imobilizada por adsorção física são termicamente instáveis acima de 45 °C durante o período de 1 hora. Bueno e colaboradores (201?), após tratamento térmico por 1 hora, indicaram que todas as preparações de lipases testadas são termicamente instáveis acima de 40°C. Os resultados demonstram a estabilidade térmica, nas temperaturas estudadas, conferida à enzima após a imobilização.

#### 5.4 PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS

Através da influência da temperatura na estabilidade da enzima estudada no item anterior, foram calculados os parâmetros cinéticos e termodinâmicos, de acordo com o item 3.2.7. A Tabela 9 apresenta os resultados.

Tabela 9 – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da enzima livre e imobilizada

Parâmetro	Enzima	35 °C	41°C	45°C
Kd (min <sup>-1</sup> )	Livre	0,0099	0,0105	0,0433
	Imobilizada	0,0036	0,0054	0,0212
R <sup>2</sup>	Livre	0,80	0,99	0,97
	Imobilizada	0,90	0,84	0,97
t <sub>1/2</sub> (min)	Livre	70,02	66,01	16,01
	Imobilizada	192,54	128,36	32,70
FE		2,75	1,95	2,04
Ed (KJ/mol)	Livre		110,63	
	Imobilizada		136,78	
ΔH* (KJ/mol)	Livre	108,07	108,02	107,99
	Imobilizada	134,22	134,17	134,14
ΔG* (KJ/mol)	Livre	97,87	99,67	97,22
	Imobilizada	100,46	101,41	99,11
ΔS* (KJ/mol)	Livre	0,03	0,03	0,03
	Imobilizada	0,11	0,11	0,11

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

A estimativa dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos é de extrema importância em processos enzimáticos, auxiliando na compreensão do provável comportamento de desnaturação da enzima (OLIVEIRA, 2015).

De forma geral, os resultados mostram que o aumento da temperatura acelera a desativação térmica da enzima em sua forma livre ou imobilizada, visto que a constante de desativação térmica ( $K_d$ ) é crescente. Entretanto, há uma diminuição dos valores de  $K_d$  quando imobilizada, demonstrando que o processo de imobilização conferiu estabilidade à enzima.

O tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) corresponde ao tempo necessário para reduzir à metade a atividade enzimática inicial (LEVENSPIEL, 2000). Com a imobilização, a lipase mostrou-se mais estável, obtendo maiores valores. O que é também demonstrado pelo fator de estabilidade (FE), onde a enzima imobilizada apresentou 2,75; 1,95 e 2,04 vezes mais estabilidade que quando na forma livre, nas temperaturas avaliadas, 35 °C, 41 °C e 45 °C, respectivamente. Faria (2019), também reportou valores do fator de estabilidade na faixa de 1,4 a 2,5 para a FTase imobilizada.

O aumento na energia de desativação ( $E_d$ ) para enzima imobilizada (136,78 KJ/mol) indica que a mesma requer uma maior energia para iniciar o processo de inativação térmica, quando comparada à livre (110,63 KJ/mol), evidenciando a melhoria na termoestabilidade da enzima. O valor de  $E_d$  representa a barreira de energia a ser transposta para a inativação da enzima, por tanto, quanto maior o valor, maior é a energia necessária, indicando uma melhor estabilidade (LEMES, 2015).

A entalpia ( $\Delta H^*$ ), variação de calor, fornece o número de ligações não covalentes quebradas, e representa uma medida da barreira energética a ser superada para que as moléculas comecem a reagir. Assim, entende-se que a enzima imobilizada, a qual apresentou maiores valores de  $\Delta H^*$ , precisa de mais energia para o alongamento, a compressão ou a quebra de ligações para atingir a mudança do estado nativo ao desnaturado (VARGAS, 2017).

A entropia ( $\Delta S^*$ ) mede a desordem da estrutura enzimática e está associada com a formação do estado de transição. Os valores positivos de  $\Delta S^*$ , indicam que a desordem do sistema aumenta conforme a enzima se desnatura (SOUZA et al., 2015). Segundo Ustok et al. (2010), valores de  $\Delta S^*$  próximos a zero, demonstram que a inativação térmica não incide em alteração relevante na

estrutura terciária da enzima, ou seja, a maioria das pontes de hidrogênio responsáveis pela estrutura ativa do sítio catalítico da enzima ainda está presente no complexo ativado. Campello (2010) também relata valores de  $\Delta S^*$  baixos (em torno de 0,5 e 0,29 para as enzimas livre e imobilizada, respectivamente) e que não houve uma variação clara com a temperatura. Em termos de estabilidade enzimática há uma relação entre os valores de  $\Delta H^*$  e  $\Delta S^*$ , em que, altos valores de  $\Delta H^*$  e baixos  $\Delta S^*$  mostram um aumento na estabilidade da enzima (VARGAS, 2017).

A energia livre de Gibbs ( $\Delta G^*$ ) expressa a espontaneidade da perda de estabilidade da enzima, assim, valores menores evidenciam maior tendência à desnaturação. Os valores maiores para a lipase imobilizada indicam que a imobilização conferiu maior estabilidade à enzima (GARCIA, 2018). Os valores positivos de  $\Delta G^*$  mostraram que o processo de inativação térmica da enzima é termodinamicamente não espontâneo (VARGAS, 2017). A diminuição da  $\Delta G^*$  nas temperaturas de 41 °C para 45 °C pode estar relacionada à diminuição da disponibilidade de sítios reativos pela desnaturação e à mudança na sua conformação inicial (CAMPELLO, 2010).

Por tanto, de acordo com o observado entende-se que a imobilização da lipase conferiu estabilidade térmica à enzima, tal como um aumento no tempo de meia-vida.

## 5.5 REAÇÕES EM TANQUE AGITADO EM BATELADA

Para a síntese dos triglicerídeos avaliou-se a influência dos parâmetros da reação visando otimizar as condições reacionais. Desse modo, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliar a influência da razão molar do ácido ( $r_m$ ), temperatura (T) (°C) e quantidade de biocatalisador (Biocat) (m/m), massa de biocatalisador para massa de óleo, em %. Realizou-se um planejamento experimental  $2^3$  com 3 variáveis independentes, sendo 8 experimentos fatoriais, 6 experimentos axiais e 3 repetições do ponto central, totalizando 17 experimentos. O grau de incorporação (GI) do ácido cáprico à molécula do triglicerídeo, calculado pela Equação, foi obtido como resposta. A Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento experimental.

Tabela 10 – Matriz do planejamento experimental dos parâmetros reacionais

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais			Resposta
	RM	T (°C)	Biocat (%)	RM	T (°C)	Biocat (%)	GI (%)
1	-1	-1	-1	4	35	10	55,38 ±1,82
2	1	-1	-1	8	35	10	72,16 ±3,47
3	-1	1	-1	4	55	10	49,85 ±1,49
4	1	1	-1	8	55	10	73,15 ±0,80
5	-1	-1	1	4	35	20	54,33 ±4,26
6	1	-1	1	8	35	20	81,27 ±2,06
7	-1	1	1	4	55	20	58,16 ±1,73
8	1	1	1	8	55	20	84,68 ±2,14
9	-1,68	0	0	2,63	45	15	42,62 ±0,17
10	1,68	0	0	9,36	45	15	86,93 ±2,25
11	0	-1,68	0	6	28,18	15	61,83 ±2,15
12	0	1,68	0	6	61,81	15	66,07 ±2,63
13	0	0	-1,68	6	45	6,59	59,94 ±0,94
14	0	0	1,68	6	45	23,40	72,10 ±2,06
15	0	0	0	6	45	15	66,34 ±0,91
16	0	0	0	6	45	15	64,41 ±1,73
17	0	0	0	6	45	15	66,85 ±2,63

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Através do software Protimiza Experimental Design® (2014) foram geradas as tabelas com os coeficientes de regressão, erros padrão, os valores de t calculado e de p-valor para as variáveis significativas (Tabela 11) e ANOVA com nível de significância  $\alpha = 5\%$  (Tabela 12). Os efeitos lineares das variáveis razão molar ( $x_1$ ) e quantidade de biocatalisador ( $x_3$ ) foram altamente significativos e também a combinação dessas, ao nível de significância de 5% ( $p\text{-valor} < 0,05$ ).

Tabela 11 - Coeficientes de regressão, erros padrão, os valores de t calculado e de p-valor para os parâmetros reacionais

Nome	Coeficiente	Erro Padrão	t-calculado	p-valor
Média	65,65	0,45	146,96	0,0000
$x_1$	12,30	0,50	24,69	0,0000
$x_3$	3,54	0,50	7,10	0,0000
$x_1 \cdot x_3$	1,67	0,65	2,57	0,0246
$x_2 \cdot x_3$	1,47	0,65	2,26	0,0433

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros reacionais

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
Regressão	2278,7	4	569,7	167,9	0,00000
Resíduos	40,7	12	3,4	-	-
Falta de Ajuste	37,4	10	3,7	2,2	0,34680
Erro Puro	3,3	2	1,7	-	-
Total	2319,4	16	-	-	-

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Como  $F_{\text{calc}} > F_{\text{Tabelado}}$  e  $R^2 = 98,24\%$ , apesar da falta de ajuste apresentada, o modelo pôde ser considerado estatisticamente significativo, ou seja, os valores experimentais se ajustam aos valores preditos. O modelo matemático gerado pelo planejamento experimental é apresentado a seguir.

$$Y_1 = 65,65 + 12,30 x_1 + 3,54 x_3 + 1,67 x_1 x_3 + 1,47 x_2 x_3$$

Onde:  $Y_1$ : atividade enzimática (U/g),  $x_1$ : razão molar,  $x_2$ : temperatura (°C),  $x_3$ : biocatalisador (%).

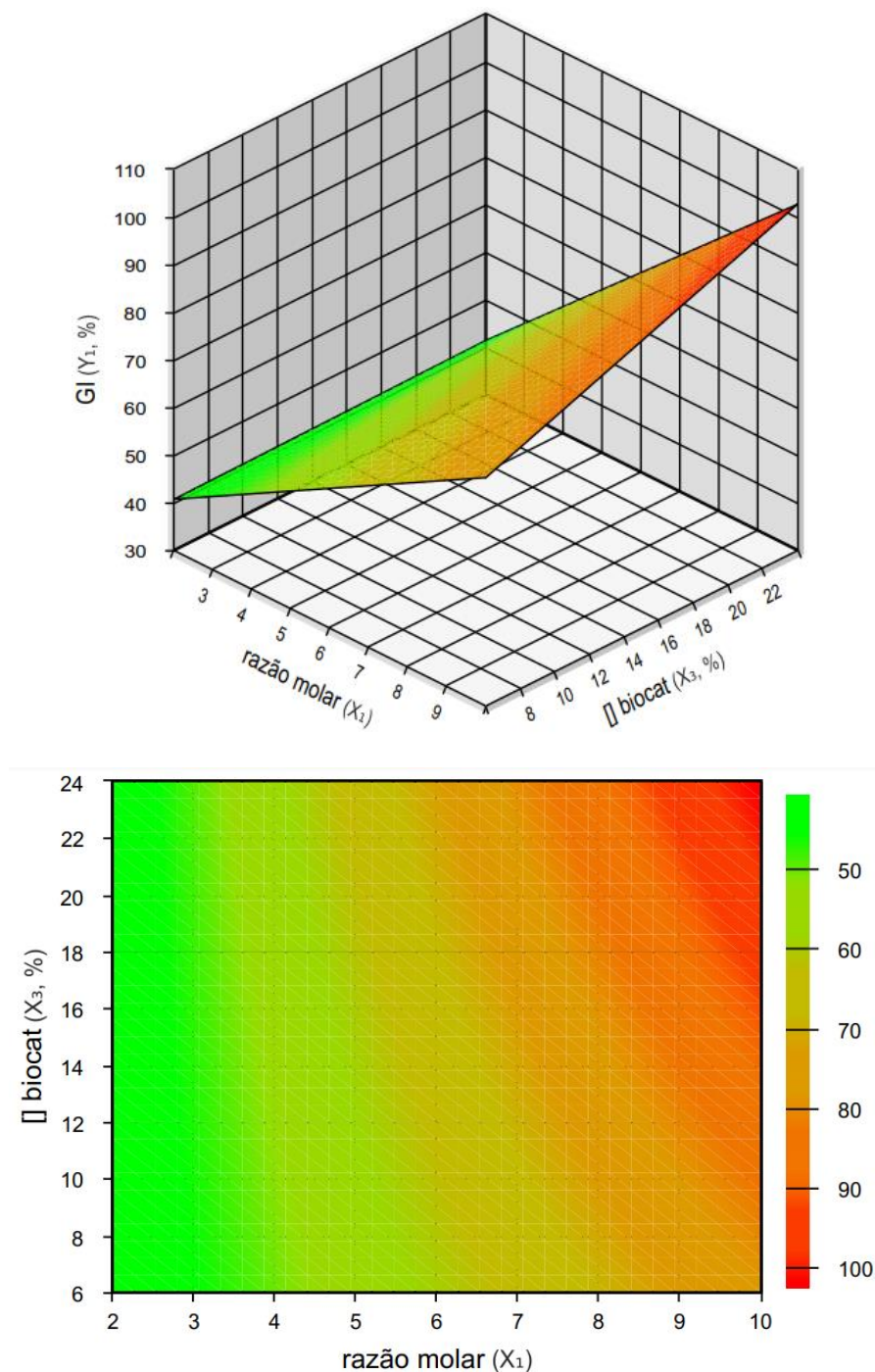
A Figura 9 apresenta o gráfico de superfície de resposta do grau de incorporação (GI) em função da razão molar e biocatalisador.

A partir das reações realizadas obteve-se grau de incorporação (GI) do C10 no óleo de semente de uva entre 42,62 e 86,93%. Foi observado que o GI era crescente de acordo com o aumento da razão molar. Tal circunstância pode estar associada ao fato de que mais ácido graxo foi ofertado no meio reacional. Além disso, o planejamento de experimentos demonstrou a alta significância da variável razão molar, assim como a quantidade de biocatalisador.

Bassan (2017) obteve o óleo com grau de incorporação (GI) na faixa de 34,40% a 54,36%, empregando óleo de semente de uva e C10 catalisada pela lipase comercial Lipozyme RM IM, onde a razão molar também apresentou maior influência. Costa *et al.* (2017) imobilizaram a lipase de ROL em Amberlite IRA96 para reação de óleo de semente de uva e ácidos graxos de cadeia média e obtiveram GI de  $52,4\% \pm 6,6$ . Laschi (2020) também realizou a acidólise enzimática do óleo de semente de uva, porém empregando a lipase de ROL

imobilizada covalentemente em pó de sabugo de milho, obtendo GI máximo de  $55\% \pm 0,3$ .

Figura 9 – Superfície de resposta para o grau de incorporação (GI).



Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Após os resultados constatados, realizou-se um ensaio empregando as condições reacionais que maximizariam o GI, de acordo com o planejamento experimental. O meio reacional era composto por 1:10 (óleo:ácido) e 24% de

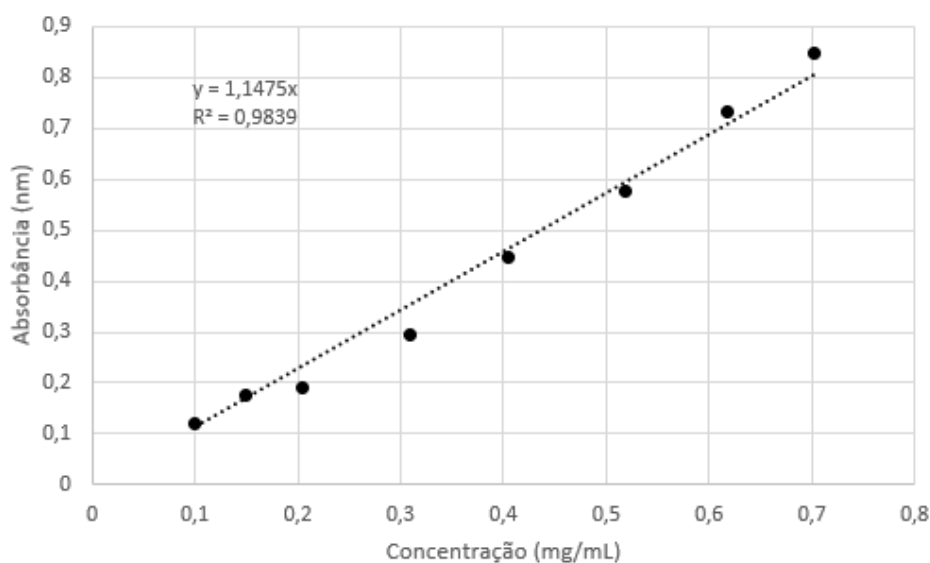
biocatalizador, e a reação foi conduzida à 45 °C. O GI médio da reação foi de 86,44%  $\pm$  0,68. Um desvio padrão de 9,59% do valor esperado (100%). Para essa reação usou-se um novo lote de biocatalizador imobilizado, o qual forneceu atividade hidrolítica menor que do utilizado nos experimentos do planejamento. Houve diferença de 95,07 U  $\pm$  8,35 oferecidos nessa reação e esta condição pode ter influenciado no resultado obtido. Apesar de não ter resultado em um grau de incorporação máximo, o obtido é bastante expressivo.

## 5.6 DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA (DTR)

Em um reator ideal de escoamento uniforme ou descontínuo, todos os átomos permanecem exatamente o mesmo tempo dentro dele. Esse período em que os átomos permanecem dentro do reator é chamado de tempo de residência. Em todos os outros reatores os átomos da alimentação permanecem tempos diferentes dentro do reator, isto é, há uma distribuição do tempo de residência (DTR) do material. Por tanto, a DTR em um reator é uma característica da mistura que ocorre em seu interior (FOGLER, 2002).

A Figura 10 mostra a curva de calibração obtida para a solução do corante lipossolúvel, em diferentes concentrações, empregado no teste de traçador. A curva relaciona a absorbância com a concentração do corante.

Figura 10 – Curva de calibração do corante.



Fonte: Dados da pesquisa (2020).

A equação da reta é apresentada pela Equação 22.

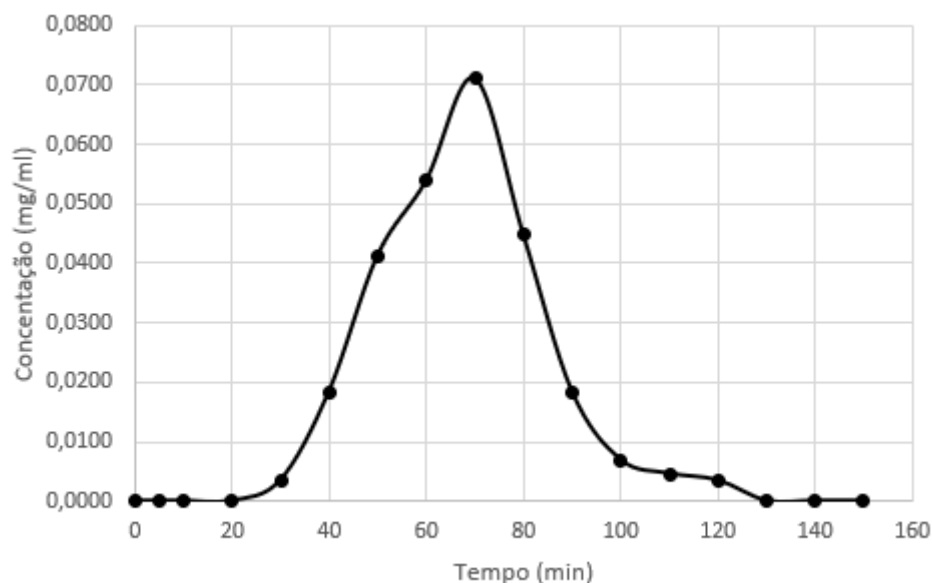
$$y = 1,1475 \cdot x \quad (22)$$

$$R^2 = 0,9839.$$

Onde: y: Absorbância (nm), x: concentração de corante (mg/mL).

Após a injeção do corante na linha de alimentação do reator e coletadas as amostras, as medidas de absorbância foram determinadas no espectrofotômetro. Assim, as concentrações de corante em cada tempo foram calculadas pelo modelo matemático obtido pela curva de calibração do corante (Equação 22). Para cálculo da função  $E(t)$ , o denominador da Equação foi determinado por meio do software OriginPro 8®, da área sob a curva do gráfico de concentração em função do tempo. A função  $E(t)$  foi calculada para cada tempo e com auxílio do software OriginPro 8® determinou-se a área sob o gráfico da distribuição do tempo de residência (Figura 11), obtendo o tempo médio de residência através da Equação 21.

Figura 11 – Distribuição do tempo de residência do reator de leito fixo empacotado com pó de sabugo de milho.



Fonte: Dados da pesquisa (2020).

O tempo médio de residência ( $t_m$ ) calculado foi de 67,46 minutos. Com o volume útil do reator definido e a vazão empregada, obteve-se o tempo espacial ( $\tau$ ) de 51,11 minutos.

É válido mencionar que o conceito de tempo espacial considera apenas o volume ocupado pelo leito catalítico, não levando em consideração o volume restante e conexões do reator (SILVA, 2013). Com as considerações, o tempo espacial recalculado ( $\tau^*$ ) é demonstrado pela equação 23:

$$\tau^* = \frac{V_{total} + V_c}{v} \quad (23)$$

Sendo:  $V_{total}$  = volume total do reator (mL),  $V_c$  = volume das conexões (mL),  
 $v$  = vazão (mL/min).

O tempo espacial recalculado foi de 68 minutos. A similaridade entre os tempos indica a inexistência de caminhos preferenciais ou zonas de estagnação, bem como um bom empacotamento do leito e boa hidrodinâmica do reator (FOGLER, 2002; SILVA, 2013).

## 5.7 REAÇÕES EM LEITO FIXO EM RECICLO TOTAL

Uma vez avaliada a influência dos parâmetros reacionais com as reações em tanque agitado, seguiu-se por avaliar os resultados para a síntese dos TAGs quando em reator de leito fixo.

De acordo com o item 5.5, resultados mais expressivos quanto ao GI são obtidos em reações com maior presença de ácido cáprico (C10) no meio reacional; porém, devido às dificuldades operacionais (solidificação) manteve-se a proporção de 1:3 (óleo:ácido). Sendo o biocatalisador um parâmetro também influente e para efeito de comparação, foi realizada uma segunda reação diferenciada pela quantidade de U do biocatalisador imobilizado por grama de meio reacional, em que foram ofertados 17,5 U/g de meio, o triplo de U, sendo na primeira reação fornecidos 5,6 U/g de meio. A Tabela 13 apresenta a média dos resultados para os GI obtidos e os respectivos desvios padrões.

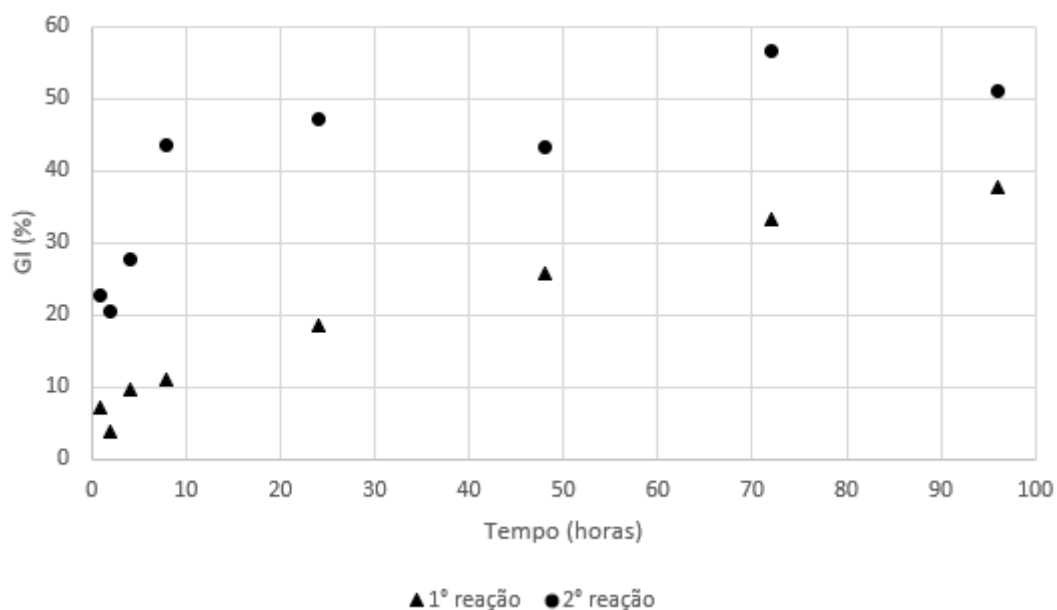
Tabela 13 – GI obtido nas reações em leito fixo

Tempo (horas)	GI (%) 1° reação	GI (%) 2° reação
1	7,11 ± 1,69	22,85 ± 6,14
2	3,84 ± 0,79	20,54 ± 1,30
4	9,58 ± 0,12	27,59 ± 1,29
8	10,98 ± 0,07	43,55 ± 4,04
24	18,43 ± 0,22	47,27 ± 0,48
48	25,81 ± 0,73	43,14 ± 0,19
72	33,25 ± 1,05	56,59 ± 0,02
96	37,72 ± 0,28	51,13 ± 0,77

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Os valores médios dos GI da 1° e 2° reação de acidólise são representados na Figura 12.

Figura 12 – GI médio da 1° e 2° reação em reator de leito fixo.



Fonte: Dados da pesquisa (2020).

O GI é um importante indicativo da eficiência da reação, uma vez que demonstra quanto do ácido foi incorporado à molécula do óleo. Como pode ser observado, já na primeira hora há um aumento no GI quando comparadas as

duas reações. Assim, sendo necessário menos de 8 horas para alcançar o GI máximo obtido na primeira reação. Nessa o GI aumentou linearmente, apresentando indícios de que necessitaria de mais tempo de reação para alcançar uma estabilização. Enquanto que, na segunda reação houve um aumento mais expressivo até o tempo de 8 horas, e após há a tendência a um estado estacionário. Conseqüentemente, indicando uma redução do tempo de reação necessário para alcançar o estado estacionário, bem como um resultado objetivado.

Laschi (2020) obteve GI máximo de 54,4% para a acidólise enzimática do óleo de semente de uva em reator de leito fixo, empregando a lipase de ROL imobilizada covalentemente em pó de sabugo de milho. Rodrigues e colaboradores (2019) realizaram a acidólise entre o óleo de uva e o ácido cáprico em reator de leito fixo catalisada pela lipase imobilizada Lipozyme RM IM e apresentaram GI médio de 36,6%.

As atividades hidrolíticas do biocatalisador imobilizado foram quantificadas antes e após as reações de acidólise. Na primeira reação a atividade hidrolítica média da enzima imobilizada foi de  $93,03 \pm 3,1037$  U/g, e após  $85,30 \pm 1,5170$  U/g. Na segunda reação o biocatalisador apresentava atividade hidrolítica média de  $116,91 \pm 3,8197$  U/g e após,  $96,66 \pm 4,2504$  U/g. Assim mantendo 91,7% e 82,7% da atividade hidrolítica, respectivamente, evidenciando as vantagens da imobilização.

Foi também avaliado o índice de peróxido (IP) do óleo de semente de uva antes e após as reações. O óleo inicial tinha IP de  $1,04 \pm 0,4494$  mEq/Kg, e após 96 horas de reação o produto da primeira acidólise apresentou IP de  $2,32 \pm 0,3846$  mEq/Kg, e na segunda  $1,64 \pm 0,5403$  mEq/Kg. Estes resultados estão em conformidade com o permitido pela ANVISA para óleos refinados e prensados a frio, 10 mEq/Kg, como o óleo de semente de uva (ANVISA, 1999).

## 5.8 QUANTIFICAÇÃO DOS MONO-, DI- E TRIGLICERÍDEOS

Para quantificar os triglicerídeos foi realizada a análise descrita pelo item 4.2.17. Os resultados das amostras finais das reações realizadas em reator de leito fixo são expostos na Tabela 14.

Tabela 14 – Quantificação de mono-, di- e triglicerídeos presentes no óleo de semente de uva das acidólises em reator de leito fixo

<b>Amostra</b>	<b>Monoglicerídeos (%)</b>	<b>Diglicerídeos (%)</b>	<b>Triglicerídeos (%)</b>
1° reação	14,2	35,9	49,9
2° reação	4,8	53,8	41,4

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Tratando de uma lipase 1,3 específica utilizada na reação de acidólise, sabe-se que há a modificação nas posições sn-1 e sn-3 do triglicerídeo. Observado um grau de incorporação na primeira reação de  $37,72\% \pm 0,28$ , entende-se que houve menor incorporação do ácido cáprico à molécula, resultando na porcentagem de monoglicerídeos apresentada. Dessa forma, com o aumento do grau de incorporação na segunda reação,  $51,13\% \pm 0,77$ , é notado a diminuição na formação de monoglicerídeos, entretanto, um aumento dos diglicerídeos.

Os diglicerídeos têm propriedades estabilizantes, emolientes e ligantes. São utilizados, assim como os monoglicerídeos, na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Além disso, em termos nutricionais, apresentam características semelhantes aos triglicerídeos (FINCO, 2018).

O alto percentual de diglicerídeos pode estar relacionado ao tempo de reação, o qual pode não ter favorecido a formação dos triglicerídeos. Entretanto, as duas reações tenderam a quantidades semelhantes de triglicerídeos, 49,9% e 41,4%.

## 6 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo sintetizar triglicerídeos dietéticos do tipo MLM em reação de acidólise enzimática utilizando óleo de semente de uva e ácido cáprico (C10). Para isso, foi proposto a imobilização por adsorção física da lipase de *Rhizopus oryzae* em pó de sabugo de milho, além de avaliar as melhores condições para o processo.

O melhor carregamento enzimático para a imobilização por adsorção física em pó de sabugo de milho foi 30 mg/ml, tendo em vista os melhores resultados para o rendimento de imobilização ( $90,8\% \pm 0,5$ ), atividade recuperada ( $6,1\% \pm 0,3$ ) e atividade do imobilizado ( $251,6 \text{ U/g} \pm 10,3$ ). Por tanto, o potencial do resíduo agroindustrial utilizado como suporte de imobilização, sabugo de milho, foi constatado, assim como o método de imobilização.

Avaliando a atividade enzimática da enzima imobilizada, determinou-se através do planejamento experimental a temperatura e pH ótimos,  $41 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $7,75$ , respectivamente, resultando na atividade enzimática média de  $158,4 \pm 20 \text{ U/g}$ . Os efeitos linear e quadrático da variável temperatura e o efeito quadrático da variável pH apresentaram-se significativos.

As atividades relativas do derivado imobilizado, foram  $15,07\%$ ,  $13,48\%$  e  $12,82\%$  maiores comparada à livre, ao final de 1h, nas temperaturas de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $41 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. Na temperatura ótima para atividade enzimática obtida pelo planejamento ( $41^\circ\text{C}$ ), o biocatalisador imobilizado manteve  $70,19\%$  de sua atividade inicial, enquanto em sua forma livre,  $56,71\%$ . Logo, entende-se que o processo de imobilização conferiu estabilidade térmica à enzima.

Quanto aos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da enzima livre e imobilizada, os resultados mostram que o aumento da temperatura acelera a desativação térmica da enzima. Entretanto, quando imobilizada os valores da constante de desativação ( $K_d$ ) são menores, sugerindo que a velocidade de desativação da enzima diminuiu. Outro fato foi que o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima aumentou após a imobilização para todas as temperaturas estudadas. Com a imobilização do biocatalisador houve o aumento da energia de desativação ( $E_d$ ), ou seja, maior é a energia necessária para a inativação. Os valores maiores para o imobilizado da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) e entalpia ( $\Delta H$ ), indicam que a imobilização conferiu estabilidade à enzima. Observou-se

também que o aumento na temperatura não foi relevante para entropia ( $\Delta S$ ), que manteve os valores.

No planejamento experimental, utilizado para definir os melhores parâmetros da síntese dos triglicerídeos em reatores de tanque agitado operando em modo batelada, o grau de incorporação (GI) máximo foi de 86,94%  $\pm$  2,25, nas condições de: razão molar 1:9,36 (óleo:ácido), à 45 °C e 15% de biocatalisador. Os efeitos lineares das variáveis razão molar ( $x_1$ ), temperatura ( $x_2$ ) e quantidade de biocatalisador ( $x_3$ ) foram significativos e também as combinações dessas, a p-valor < 0,05. Os resultados do planejamento experimental sugerem que o GI aumenta gradualmente de acordo com o aumento de ácido e biocatalisador presente no meio reacional.

Para a distribuição do tempo de residência (DTR) em reator de leito fixo operando em modo contínuo, o tempo médio de residência ( $t_m$ ) calculado foi de 67,46 minutos e o tempo espacial ( $\tau$ ) de 51,11 minutos. A diferença entre os tempos teórico e experimental está possivelmente relacionada a formação de zonas de estagnação.

A síntese realizada em reator de leito fixo apresentou maior grau de incorporação final, de 51,13%  $\pm$  0,77, quando ofertados maior quantidade de U por grama de meio reacional, resultando em 41,4% de triglicerídeos formados.

Dessa forma, em virtude do apresentado, a imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* por adsorção física, utilizando de pó de sabugo de milho como suporte, mostra-se promissora para a obtenção de triglicerídeos do tipo MLM da síntese do óleo de semente de uva e ácido cáprico.

## REFERÊNCIAS

- ABED, S. M. et al. Synthesis of structured lipids enriched with medium-chain fatty acids via solvent-free acidolysis of microbial oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. *Lwt – Food Science and Technology*, v. 93, p. 306–315, 2018.
- ARAÚJO, M. L. **Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de enzima**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2013.
- ASSUMPÇÃO, S. M. N. de. **Pré-Tratamento Químico combinado do bagaço da Cana visando a produção de Etanol de Segunda Geração**. 2015. 99 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2015.
- BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in Bioethanol Processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 34, p. 551-573, 2008.
- BRÍGIDA, A. I. S. **Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais**. 220 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2010.
- BRITO, R. R. **Imobilização de lipase com atividade de transesterificação produzida pelo novo isolado Acremonium-like rog 2.1.9 em matrizes a base de resíduos agroindustriais e aplicação na produção de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto, SP, 2016.
- BRODEUR, G. *et al.* Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Enzyme Research*, v.2011, p.1-17, 2011.
- BASSAN, N. **Modificação enzimática de óleos vegetais visando à obtenção de triglicerídeos dietéticos através do emprego de reatores de tanque agitado e leito fixo**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2017.
- BATISTA, V. G; SILVA, B.M; GALAN J.P.M; MONTI, R; PAULA; A.V. Síntese de lipídeos estruturados empregando lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em pó de sabugo de milho. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA*. 2019, Uberlândia. **Anais [...]**. Uberlândia, 2019. p. 2485-2491.
- CABRAL, B. V. **Hidrólise de Sacarose por Invertase imobilizada em Duolite A-568 por adsorção e ligação cruzada**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG 2012.

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 217-226, 2005.

CAMPOS, P. R. B. **Acidólise enzimática de óleo de soja para obtenção de triacilgliceróis estruturados funcionais**. 2010. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP 2010.

CARVALHO, A. C. S. M. **Desenvolvimento de processo contínuo de copolimerização em emulsão em reator tubular**. Tese (Doutorado em Engenharia) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, SP, 2008.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, v. 23, p. 60-70, 2006.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulase na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CASTRO, H. F. *et al.* Modificações de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n.1, p. 146-156, 2004.

CAMPELLO, G. S. **Imobilização de  $\beta$ -galactosidase (Lactozym®) em Eupergit® c e sua caracterização**. 81 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2010.

CHOI, J. H. *et al.* Lipase-catalysed production of triacylglycerols enriched in pinolenic acid at the sn-2 position from pine nut oil. **Wiley Online Library**, v. 92, n. 4, p. 870-876, 2011.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Boletim da safra de grãos**. Disponível em: <<https://www.Conab.gov.br/info-agro/safra/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 28 jan. 2020.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Série histórica das safras**. Disponível em: <<https://www.Conab.gov.br/info-agro/safra/serie-historica-das-safra>>. Acesso em: 28 jan. 2020.

CONTINI, E. *et al.* **Milho - Caracterização e desafios tecnológicos**. Série de desafios do agronegócio brasileiro (NT2). 34 p. Embrapa. 2019.

COSTA, C. M *et al.* Production of MLM Type Structured Lipids From Grapeseed Oil Catalyzed by Non-Commercial Lipases. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 120, 2017.

COSTA, D. M. **Sabugo de milho como suporte para imobilização de lipase**. Aracaju, 2015. 157 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes – UNIT, Aracaju, SE, 2015.

COSTA-SILVA, W. **Produção enzimática de biodiesel a partir de óleos láuricos em reatores de leito fixo duplo estágio incorporando coluna extratora do glicerol formado como subproduto.** 120 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2013.

CRUZ, C. Z. P. **Imobilização de Alcalase® em pó de sabugo de milho: hidrólise das proteínas do soro de queijo bovino e obtenção de peptídeos bioativos.** 58 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, SP, 2017.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C. Modificação enzimática de óleos e gorduras para a obtenção de biocombustíveis e produtos de interesse do setor alimentício. *In*: MARSAIOLI, A. J., PORTO, A. L. M. **Biocatálise e biotransformação: fundamentos e aplicação.** São Paulo: Schoba, 2010, v. 1. p. 275-317.

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

DUARTE, L. S., **Imobilização de  $\beta$ -galactosidase de *Bacillus circulans* em macroesferas de quitosana para a produção de lactosacarose.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2016.

DUTTA, R. **Fundamentals of Biochemical Engineering.** Nova York: Springer Berlin Heidelberg, 2008.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. **Inteligência e mercado da uva e vinho.** 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-uva-e-vinho/a-viticultura-no-brasil>> Acesso em: 30 jan. 2020.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. **Produção de milho no Brasil – um novo cenário.** 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1006426/producao-de-milho-no-brasil---um-novo-cenario>> Acesso em: 28 jan. 2020.

FACCHINI, F. D. A. *et al.* Immobilization Effects on the Catalytic Properties of Two *Fusarium Verticillioides* Lipases: Stability, Hydrolysis, Transesterification and Enantioselectivity Improvement. **Catalysts**, v. 8, p. 84, 2018.

FALLEIROS, L. N. S. S. **Imobilização e estabilização de  $\beta$ -galactosidase por ligações multipontuais em Duolite A568.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, 2012.

FARIA, E. L. P. de. **Síntese enzimática de monoésteres de etila catalisada por células íntegras imobilizadas com elevada atividade lipolítica em reator de leito fixo operando em fluxo contínuo.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena. Lorena, SP, 2014.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research**, v. 2, p. 19, 2010.

FOGLER, S. C. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**, 3ª ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2002.

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

GARCIA, R. L. **Imobilização da biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301, caracterização e aplicação na produção de frutooligossacarídeos.** 85 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2018.

GARMROODI, M. *et al.* Covalent binding of hyper-activated Rhizomucor miehei lipase (RML) on hetero-functionalized siliceous supports. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 208–215, 2016.

GIOIELLI, L. A. Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia. **Rev. Bras. Farmacogn.**, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 211-232, 1996.

GRUBECKI, I. Optimal feed temperature for an immobilized enzyme fixed-bed reactor: A case study on hydrogen peroxide decomposition by commercial catalase. **Chemical and Process Engineering**. v. 39, n. 1, p. 39–57, 2018.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

HORST, D. J. **Avaliação da produção energética a partir de ligninas contidas em biomassas.** 103p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, PR, 2013.

IUPAC, Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, p. 597-600, 1995.

JEGANNATHAN, K.R.; NIELSEN, P.H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228- 240, 2013.

KIM, B. H.; AKOH, C. C. Recent Research Trends on the Enzymatic Synthesis of Structured Lipids. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. C1713–C1724, 2015.

KOBLITZ, M. G. B. **Purificação e Caracterização de Lipase de *Rhizopus sp.* e sua Aplicação na Síntese de Monoacilgliceróis**. 129 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2003.

KORMAN, T. P.; SAHACHARTSIRI, B.; CHARBONNEAU, D.M.; HUANG, G.L.; BEAUREGARD, M.; BOWIE, J.U. Dieselzymes: development of a stable and metanol tolerant lipase for biodiesel production by directed evolution. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, 2013.

LASCHI, J. B. B. **Obtenção de lipídeos estruturados por acidólise enzimática em reatores de tanque agitado e leito fixo**. 77 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2020.

LEMES, A. C. **Obtenção e caracterização de queratinase de *Bacillus sp. p45* a partir de coprodutos e aplicação na produção de queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa**. 209 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2015.

LEMOS, G. P. M. **Imobilização de enzimas em membranas para hidrólise da lactose**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2018.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**, Tradução da 3ª ed., São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2000.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**, Vols. 1 e 2, São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1972.

LIMA, L. N. **Síntese enzimática de ésteres catalisada por lipases imobilizadas em diferentes suportes**. 154 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de São Carlos, São Carlos, SP, 2013.

LONDOÑO-HERNÁNDEZ, L. *et al.* *Rhizopus oryzae* – Ancient microbial resource with importance in modern food industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, n. May, p. 110–127, 2017.

LUZ, B. D. S. **Produção de lipase visando-se aplicações industriais visando-se micro-organismos selecionados na bioprospecção realizada no Parque Estadual Serra do Ouro Branco/MG**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de São João Del Rei. Ouro Branco, MG, 2014.

MARINELLI, A. L. *et al.* Desenvolvimento de compósitos poliméricos com fibras vegetais naturais da biodiversidade: uma contribuição para a sustentabilidade amazônica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 2, p. 92-99, 2008.

MARUM, D. S. **Formulação de biocatalisadores com propriedades magnéticas utilizados no processo de imobilização da enzima *amano ak (pseudomonas fluorescens)***. 135 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goytacazes, RJ, 2018.

MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: A review. **Journal of Biotech Research**, v. 8, n. 1, p. 58–77, 2017.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para síntese enzimática de biodiesel**. 225 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2009.

MENDES, A. A.; DE OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. D. L. C. Application of chitosan as support for immobilization of enzymes of industrial interest. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MEDINA, Sofia Perrone et al. Caracterização de óleos vegetais de semente de uva e algodão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 1, p.1-1, 2015.

MING, C. C. **Síntese de lipídeos estruturados por interesterificação de gordura de frango e triacilgliceróis de cadeia média**. 205 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) - Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, 2006.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org.). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. v. 3. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2013.

MOREIRA, D. K. T. **Síntese, caracterização e avaliação nutricional in vivo de lipídios de baixo valor calórico por incorporação de ácido behênico**. 117 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Campinas. Campinas, SP, 2016.

OLEGÁRIO, L. S; TRAVÁLIA, B. M; DOS SANTOS, J. A. B.; DA SILVA, M. A. A. P. Estudo prospectivo sobre óleo de semente de uva. *In*: Internacional Symposium on Technological Innovation, 2015, Aracaju. **Anais [...]**, Aracaju, 2015, p.306-316.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; FACCIO, C. MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C. Influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática de óleo de mamona. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 24(2), p. 178-182, 2004.

OLIVEIRA, R. L; GOMES, M. H. G; PORTO, T. S. Determinação dos parâmetros cinéticos da protease de *Aspergillus Niger* URM 5741. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**. v. 5, n. 1, 2015.

PALOMO, J. M. *et al.* Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.19, p. 279-286, 2002.

PASHANGEH, K. H; AKHOND, M; KARBALAEI-HEIDARI, H. R; ABSALAN, G. Biochemical characterization and stability assessment of *Rhizopus oryzae* lipase covalently immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**. 105(1), p. 300-307, 2017.

PEREIRA, M. B. **Imobilização de biocatalisadores para hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO, 2019.

PEREIRA, R. M. **Técnicas de imobilização e estabilização de lipases obtidas a partir de diferentes fontes microbianas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciência e Tecnologia. Poços de Caldas, MG, 2014.

PINO, M. S. *et al.* Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. **Chemical Engineering Journal**, v. 347, p. 119–136, 2018.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R.D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chem. Phys. Lipids**, 93, p. 67-80, 1998.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, 2015.

QUEISSADA, D. D; SILVA, J. A. Imobilização enzimática em suportes orgânicos e inorgânicos: vantagens e desvantagens. **Holos Environment**, 20 (2), p. 272-286, 2020.

QUILLES JUNIOR, J. C. **Imobilização de lipases por adsorção e ligação covalente em derivados de agarose e quitosana e a aplicação em biocatálise**. 105 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista – Unesp. São José do Rio Preto, SP, 2014.

RABELO, S. C. **Avaliação e Otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a Produção de Etanol de Segunda Geração**. 447 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.

RADZICKA, A., WOLFENDEN, R. A proficient enzyme. **Science**, 6(267), p. 90-931. 1995.

RAMOS, L. **Produção enzimática de biodiesel a partir do óleo de macaúba em reatores de leito fixo duplo estágio**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena. Lorena, SP, 2015.

RAMOS, O. L.; MALCATA, F. X. Food-Grade Enzymes. **Reference Module in Life Sciences**, n. April 2016, p. 1–17, 2017.

RICO, A. L. L. **Produção enzimática de biodiesel etílico em reator de leito fixo e regime de fluxo contínuo utilizando células íntegras de *Mucor circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2015.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, 2010.

RODRIGUES, L. P. **Emprego de derivados celulósicos esterificados na imobilização da fosfolipase Lecitase® Ultra**. 70 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2018.

RODRIGUES, M. F.; COZENTINO, I. S. C.; CAVALLINI, D. C. U.; PAULA, A. V. Síntese de lipídeos estruturados em reator de leito fixo empregando *Lipozyme RM IM*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2019, Uberlândia. **Anais [...]**. Uberlândia, 2019, p. 2506-2512.

RODRIGUES, R. S. B. **Produção e caracterização de um biocatalisador heterogêneo para ser utilizado em aplicações industriais**. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2009.

ROVEDA, M; HEMKEMEIER, M; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 30(1), p. 126-131, 2010.

SECUNDO, F. *et al.* Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, n. 1–3, p. 350–361, 2008.

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

SHINAGAWA, F. B. **Avaliação da composição química de óleos brasileiros de semente de uva (*Vitis vinífera* L) e seu efeito sobre parâmetros**

**bioquímicos e inflamatórios em ratos.** 179 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo-USP. São Paulo, SP, 2015.

SHINAGAWA, F. B. et al. Grape seed oil: a potential functional food? **Food Science and Technology**, v. 35, n. 3, p. 399–406, 2015.

SHINAGAWA, F. B. et al. Chemical composition of cold pressed Brazilian grape seed oil. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 164-171, 2018.

SILVA, H. S. et al. Adição de cinza de sabugo de milho em formulações de cerâmica vermelha. *In*: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2016, Natal. **Anais [...]** Natal, 2016, p. 2617–2624.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 32, p. 661-671, 2009.

SOUZA, O. C. de. **Produção de lipases por culturas de *Trichosporon* da micoteca urm: seleção, produção, purificação e aplicação enzimática.** 127 p. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2015.

SOUZA, P. M. et al. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 17–21, 2015.

SOUZA, R. C. de.; RIBEIRO, P. L.; DE SOUZA, C. O.; DRUZIAN, J. I.; MACHADO, B. A.; UMSZA-GUEZ, M. A. Estudo prospectivo das aplicações do óleo de semente de uva a partir de mapeamento em documentos de patentes. **Cad. Prospec.**, Salvador, v. 11, p.270-283, 2018.

SOUZA, R. O. M. A. de.; MIRANDA, L. S. M. Reações Sob Fluxo Contínuo: da Química Verde a um Processo Verde. **Revista Virtual de Química**, 6 (1), p. 34-43, 2013.

TODESCHINI, J. K. P. **Síntese enzimática de biodiesel em reatores contínuos e em batelada: aspectos do uso de diversas fontes de óleos, do conceito de combi-lipases e do ultrassom.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2017.

TORRE, P., ALIAKBARIAN, B., RIVAS, B., DOMÍNGUEZ, J. M., CONVERTI, A. Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 40, p. 500-506. 2008.

TSAI, W. T., CHANG, C. Y., WANG, S. Y., CHANG, C. F., CHIEN, S. F., SUN, H.F. Preparation of activated carbons from corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 203-208. 2001.

TRAN, D. T.; CHEN, C. L.; CHANG, J. S. Continuous biodiesel conversion via enzymatic transesterification catalyzed by immobilized *Burkholderia lipase* in a packed-bed bioreactor. **Applied Energy**, v. 168, p. 340–350, 2016.

USTOK, F. I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of  $\beta$ galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry**, v.119, p. 1114–1120, 2010.

VARGAS, C. E. B. **Imobilização in situ da pectinase comercial (Rohapect® da6l) de *Aspergillus niger* em espuma rígida de poliuretano e aplicação na clarificação de suco de goiaba.** 109 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, 2017.

VAZ, M., CHOUPINA, A. Lipases: Biocatalizadores da Hidrólise de Triacilgliceróis. **Revista Eletrônica de Biologia**. Bragança, Portugal, Volume 5 (3), p. 42-58, 2012.

VESCOVI, V. **Lipases imobilizadas em suportes híbridos como biocatalisadores para a produção de ésteres de açúcares.** 118 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2016.

VILAS BÔAS, R. N. *et al.* Application of an immobilized *Rhizopus oryzae* lipase to batch and continuous ester synthesis with a mixture of a lauric acid and fusel oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 61–68, 2018.

WALAA, *et al.* Optimization of pectinase immobilization on grafted alginate-agar gel beads by 24 full factorial CCD and thermodynamic profiling for evaluating of operational covalent immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, 113, p. 159-170, 2018.

WANG, Y.; XIA, L.; XU, X.; XIE, L.; DUAN, Z. Lipase-catalyzed acidolysis of canola oil with caprylic acid to produce medium-, long- and medium-chain-type structured lipids. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 4, p. 707-712, 2012.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas Imobilizadas. *In*: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 4. p. 35-85.

ZHAO, J. *et al.* Enhanced Performance of *Rhizopus oryzae* Lipase by Reasonable Immobilization on Magnetic Nanoparticles and Its Application in Synthesis 1,3-Diacylglycerol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, n. 3, p. 677–689, 2019.

ZORN, K. *et al.* Engineering and application of enzymes for lipid modification, an update. **Progress in Lipid Research**, v. 63, p. 153–164, 2016.