



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ILVANIA SILVA COSTA**

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA, PURIFICAÇÃO E  
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES PARA MELHORAMENTO DO  
PROCESSO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL**

Salvador  
2016

**ILVANIA SILVA COSTA**

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA, PURIFICAÇÃO E  
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES PARA MELHORAMENTO DO  
PROCESSO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Rede Nordeste do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha

Salvador  
2016



## Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal da Bahia - UFBA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Av. Reitor Miguel Calmon s/n – Vale do Canela  
40100-000, Salvador-BA



Telefone: (71) 3283-8921 - E-mail: [renorbioba@ufba.br](mailto:renorbioba@ufba.br)

### TERMO DE APROVAÇÃO

A TESE:

#### “EXPRESSÃO HETERÓLOGA, PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES PARA MELHORAMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL”


Elaborada por:

**ILVANIA SILVA COSTA.**

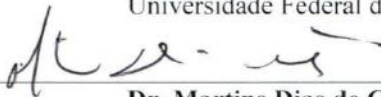
Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Renorbio como requisito parcial à obtenção do título de DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA

Salvador, Bahia, 23 de maio de 2016.

BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha**  
(Orientador)

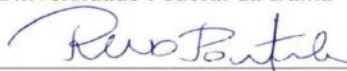
Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Martins Dias de Cerqueira**

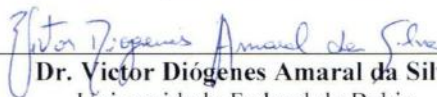
Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_  
**Dr.ª Cristina Maria Assis Lopes Tavares da Mata Hermida Quintella**

Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Ricardo Wagner Dias Portela**

Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Victor Diógenes Amaral da Silva**

Universidade Federal da Bahia

Aos meus pais Sérgio e Ilvany, a minha irmã Ilda Maria, pela fé e confiança demonstrada, pelo apoio incondicional e por terem tornado esse caminho mais fácil de ser percorrido, compartilhando comigo os momentos de tristezas e também de alegrias, nesta etapa, em que, com a graça de Deus, está sendo vencida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que sempre nos faz triunfar em Jesus Cristo nosso Senhor, e por meio de nós manifesta em todo o lugar a fragrância do seu conhecimento.

Ao professor Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha pela orientação e confiança.

Ao professor Dr. Hervé Deleuze pela orientação em período sanduíche na França.

Aos professores do doutorado em Biotecnologia da UFBA e RENORBIO.

Ao CNPq e a FAPESB que financiaram o projeto.

Ao meu companheiro Thomas Démoulin pela lealdade e tradução do texto em francês.

As minhas alunas Iara Nunes e Karen Sadoyama.

Aos meus queridos amigos Alan Vêras, Lorena Silva, Adriana Morato, Eduardo Muniz, Caio Lopes, Ismael Fernandes e Regina Torres pelo companheirismo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

COSTA, Ilvania Silva. **Expressão heteróloga, purificação e imobilização de lipases para melhoramento do processo de produção enzimática de biodiesel.** 2016. 114 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia; Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), Salvador, 2016.

## RESUMO

Biodiesel é um combustível verde que pode substituir o diesel de petróleo sem modificações no motor do ciclo diesel. Sua produção por via enzimática é destaque para a substituição do método químico atual de produção. Porém na catálise enzimática o alto custo do catalisador onera o preço do produto final, o que impede a sua aplicação industrial. Neste sentido, esse trabalho tem como alvo o estudo de estratégias de redução do preço não apenas do catalisador mas em todas as etapas de produção de biodiesel por catálise enzimática. É proposto o uso de óleo e gorduras residuais como uma escolha econômica de matéria prima, uma vez que 90% dos custos de produção desse biocombustível está na matéria prima que é escolhida. Lipases mutantes são sugeridas como novos catalisadores com capacidade de se adaptarem melhor ao meio reacional da produção de biodiesel. Para isso, as lipases mutantes apresentaram modificações na tampa que cobre o sítio catalítico. A expressão heteróloga ocorreu com sucesso e as lipases possuem atividade. Estas enzimas foram usadas em um novo método onde às suas purificação e a imobilização ocorrem em uma única etapa, o que garante diminuição dos custos no processo. Além disso, foi mostrado a produção enzimática de biodiesel em reator de leito fixo utilizando a lipase comercial Novozyme 435 e também em reator de tanque agitado utilizando uma enzima reticulada, no sentido de uma comparação futura com as lipases imobilizadas no referido estudo.

**Palavras-chave:** Biodiesel. Lipase. Enzimas. Imobilização.

COSTA, Ilvania Silva. **Heterologous expression, purification and immobilization of lipases for improving the enzymatic production of biodiesel process.** 2016. 114 f. Thesis (Doctorate in Biotechnology) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia; Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Salvador, 2016.

### **ABSTRACT**

Biodiesel is a green fuel that can be considered as an option to replace petroleum diesel without modification in a diesel engine cycle. Its enzymatic production is being emphasized to replace the existing chemical production methods. However, in the enzymatic catalysis the high cost of the catalyst charges the price of the final product, which prevents its industrial application. In this sense, this work aimed to study price reduction strategies not only the catalyst but in all biodiesel production steps by enzymatic catalysis. It is proposed the use of oil and waste fat as an economical choice of raw material, because 90% of the cost of production of this biofuel is in the raw material that is chosen. Mutants lipases are suggested as new catalysts ability to adapt better to the reaction medium of biodiesel production. For this, the mutant lipases showed changes in the lid covering the catalytic site. The heterologous expression was successful and lipases have activity. These enzymes were used in a new method in which its purification and immobilization occur in a single step, which ensures reduction of costs in the process. Furthermore, it was shown the enzymatic production of biodiesel in a fixed bed reactor using a commercial lipase Novozyme 435 as well stirred tank reactor using a crosslinked enzyme towards a future comparison with immobilized lipases in the study.

**Keywords:** Biodiesel. Lipase. Enzymes. Immobilization.

COSTA, Ilvania Silva. **Expression hétérologue, purification et immobilisation de lipases pour améliorer la production enzymatique de production de biodiesel.** 2016. 114 f. Thèse (Doctorat en biotechnologie) - Institut des Sciences de la Santé, Université Fédérale de Bahia; Northeast Réseau de biotechnologie (RENORBIO), Salvador 2016.

## RÉSUMÉ

Le biodiésel est un carburant vert qui peut remplacer le diésel de pétrole sans modification dans le moteur de cycle diésel. Sa production par voie enzymatique est en train d'être mise en avant pour le remplacement de la méthode existante de production chimique. Toutefois, le catalyseur de la catalyse enzymatique a un coût élevé, ce qui augmente le prix du produit final et empêche son application industrielle. Dans ce cas, ce travail vise à l'étude des stratégies de réduction des prix non seulement du catalyseur, mais aussi dans toutes les étapes de production de biodiésel par catalyse enzymatique. Nous proposons, comme choix économique, l'utilisation de l'huile et de la graisse usagée comme matière première, puisque 90% du coût de production de ce biocarburant vient de la matière première choisie. Un nouveau catalyseur est proposé à partir de lipases mutantes avec une meilleure capacité d'adaptation au milieu réactionnel de la production de biodiésel. Pour cela, les lipases mutantes ont montré des changements dans le couvercle recouvrant le site catalytique. L'expression hétérologue a été couronnée de succès et les lipases ont eu des activités. Ces enzymes ont été utilisées dans un nouveau procédé dans lequel la purification et l'immobilisation se produisent en une seule étape, ce qui assure une réduction des coûts du processus. En outre, nous avons montré la production enzymatique de biodiésel dans un réacteur à lit fixe en utilisant une lipase commerciale Novozyme 435 et aussi dans un réacteur à cuve agitée en utilisant une enzyme réticulée, pour une comparaison future avec des lipases immobilisées pour cette étude.

**Mots-clés:** Biodiésel. Lipase. Enzymes. Immobilisation.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Oferta Interna de Energia renováveis, comparação 2014 - 2015.....	14
Figura 2 - Produção de biodiesel em milhões de barris/ dia.....	15
Figura 3 - Produção internacional de biodiesel em 2014 .....	15
Figura 4 - Consumo de Biodiesel em Países Selecionados .....	16
Figura 5 - Reação global da reação de transesterificação de triglicilglicerol com álcool. ....	18
Figura 6 - Esquema reacional da síntese de Biodiesel por transesterificação de triacilglicerol	19
Figura 7 - Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel (perfil nacional).....	22
Figura 8 – Reações de saponificação com ácidos graxos livres (AGLs) (A) e com ésteres alquílicos (B).....	23
Figura 9 - Esquema das reações de hidrólise, esterificação e interesterificação catalisadas por lipases.....	25
Figura 10 - Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica.....	26
Figura 11 - Ação da lipase sobre os triglicerídeos de uma bicamada lipídica. A) O sítio ativo (em vermelho) juntamente com a tampa interagem entre si pois possuem interação hidrofóbica, o que garante o fechamento da tampa. B) a tampa sofre abertura com a aproximação de uma superfície de lipídios. C) Triacilglicerol interagindo com o sítio ativo da lipase. D) A lipase retoma a sua posição fechada de origem. ....	27
Figura 12 - Estrutura geral de lipase B de <i>Pseudozyma antarctica</i> derivada da estrutura cristalina 1TCA (UPPENBERG et al., 1994) .....	30
Figura 13 - Principais métodos para imobilização de enzimas .....	34
Figura 14 - Esquema do procedimento experimental utilizado para transformação de <i>E. coli</i> por eletroporação.....	43
Figura 15 - Esquema do circuito fechado utilizado em reator de leito fixo. a) mostra a condução do meio reacional até a bomba. b) o meio sai da bomba e entra no reator de leito fixo. c) o meio é transformado em produto à temperatura de 60°C. d) o produto é conduzido de volta para o meio inicial formando um circuito fechado...	45
Figura 16 - Fluxograma do preparo da Cromatografia em Camada Delgada .....	47
Figura 17 - Representação da estrutura tridimensional da principal cadeia de lipase B de <i>P. antarctica</i> . A região da tampa (lid) está destacada. No detalhe é mostrado a distância entre o átomo do carbono carbonílico do resíduo de glicina na posição 137 e o nitrogênio amídico do resíduo de glutamina na posição 157 .....	48
Figura 18 - Sequência FASTA da lipase B de <i>P. Antarctica</i> , tipo selvagem (topo) e o mutante Pant $\Delta$ lidG3. A região da tampa da lipase selvagem e sua substituição por três resíduos de glicinas no mutante estão destacados em vermelho.....	49
Figura 19 - SDS-PAGE de expressão heteróloga de lipase B de <i>P. antarctica</i> em <i>E. coli</i> Rosetta-gami 2 (DE3). Linhas 1-3: amostras não induzidas de lipase mutante, lipase selvagem, plasmídeo sem inserto respectivamente; linhas 4-6: amostras induzidas com 1 mM IPTG por 3 horas de lipase mutante, lipase selvagem, plasmídeo sem inserto respectivamente. SDS-PAGE foi corado com Comasie Brilliant Blue.....	50

Figura 20 - SDS-PAGE de expressão heteróloga de lipase B de <i>P. antarctica</i> em <i>E. coli</i> Rosetta-gami 2 (DE3). Linha 1: amostras não induzida de lipase selvagem; linha 2: amostras induzida com 1 mM IPTG por 3 horas de lipase selvagem; linha 3: amostra do pellet após lise da <i>E. coli</i> ; linha 4: amostra do sobrenadante após lise da <i>E. coli</i> . SDS-PAGE foi corado com Comasie Brilliant Blue.....	51
Figura 21 - Reator de leito fixo utilizado para a produção enzimática de biodiesel .....	68
Figura 22 - Acompanhamento da produção enzimática de Biodiesel em leito fixo por cromatografia de camada delgada. Reação foi executada a 60°C com metanol, com pressão de 8 bar e débito de 0,1 mL/min. Amostras foram retiradas nos tempos 0 (TG), 15h, 24h e 41h. As setas indicam as posições relativas das manchas de DAG, TAG e MEAG.....	69
Figura 23 - Reator utilizado para a produção enzimática de biodiesel.....	70
Figura 24 - Acompanhamento da produção enzimática de Biodiesel em leito fixo por cromatografia de camada delgada. Reação foi executada a 60 oC com metanol ....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático na produção de biodiesel. ....	20
Tabela 2 - Características da lipase B de <i>Pseudozyma antarctica</i> .....	29
Tabela 3 - Principais vantagens da técnica de imobilização enzimática .....	32
Tabela 4 - Cepa e plasmídeo usados na expressão heteróloga de PalB.....	42
Tabela 5 - Parâmetros da produção enzimática de biodiesel em reator de leito fixo .....	68
Tabela 6 - Parâmetros da produção enzimática de biodiesel com enzima reticulada.....	70

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
2.1 TRANSIÇÃO ENERGÉTICA NO BRASIL.....	14
2.2 PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	16
2.2.1 Catálise homogênea.....	16
2.2.2 Catálise enzimática heterogênea.....	17
2.2.3 Escolha do álcool na produção de biodiesel.....	20
2.2.4 Solventes orgânicos na produção de biodiesel.....	21
2.2.5 Matérias-primas com alto conteúdo de ácidos graxos livres (AGL).....	22
2.3 LIPASE: CONTEXTO BIOTECNOLÓGICO .....	23
2.3.1 Reações catalisadas por lipases .....	24
2.3.2 Especificidade das lipases.....	25
2.3.3 Aspectos estruturais das lipases.....	26
2.4 VARIANTES DE LIPASES.....	28
2.5 LIPASE B DE <i>Pseudozyma (Candida) antarctica</i> .....	29
2.5.1 Estrutura e mecanismo catalítico.....	29
2.5.2 Expressão funcional de lipase B de <i>Pseudozyma antarctica</i> em <i>E. coli</i> .....	31
2.6 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	31
2.6.1 Imobilização enzimática por encapsulação .....	33
2.6.1 Imobilização enzimática por ligação .....	33
<b>3 JUSTIFICATIVAS.....</b>	<b>35</b>
<b>4 OBJETIVO .....</b>	<b>36</b>
4.1 OBJETIVO GERAL.....	36
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
5.1 MATERIAL.....	37
5.1.1 Meios utilizados para crescimento e transformação de bactérias.....	37
5.1.2 Reagentes e soluções utilizados na eletroforese unidimensional de proteínas.....	38
5.1.3 Soluções utilizadas na expressão das proteínas recombinantes.....	41
5.1.3 Soluções utilizadas na lise e purificação das proteínas recombinantes.....	41
5.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	42
5.2.1 Preparo de células eletrocompetentes e transformação de <i>E. coli</i> por eletroporação.....	42
5.2.2 Expressão heteróloga de PalB selvagem e mutante .....	43
5.2.3 Lise celular e isolamento da lipase dos corpos de inclusão.....	44
5.2.4 Análise por SDS-PAGE.....	44
5.2.5 Catálise contínua de biodiesel em leito fixo por Novozyme 435.....	45
5.2.6 Produção de biodiesel por PalB comercial reticulada .....	46
5.2.7 Cromatografia em camada delgada.....	46
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
6.1 VARIANTES DE LIPASES.....	48
6.2 PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. Coli</i> POR ELETROPORAÇÃO.....	49

6.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PALB SELVAGEM E MUTANTE .....	50
6.4 PATENTE 1: "PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ÚNICO PASSO" .....	52
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO A - PATENTE 2: "VARIANTES DE LIPASES, SEQUÊNCIA DE DNA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULAS HOSPEDEIRAS TRANSFORMADAS E MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE VARIANTES DE LIPASES" .....</b>	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, a intensificação da produção agrícola tem sido impulsionada por um grande uso de recursos não-renováveis, que muitas vezes prejudicam a sustentabilidade ambiental (LEMAIRE *et al.*, 2014). Para a luta contra as mudanças climáticas, é indispensável a transição de uma economia baseada em combustíveis fósseis para uma economia de baixo carbono, ou seja, implantação de ferramentas eficazes para realçar o uso de fontes de energias renováveis.

Um combustível renovável que tem recentemente sido considerado como o melhor candidato para a substituição do diesel de petróleo é o biodiesel. Isto ocorre porque não são necessárias modificações em motores, podendo intercambiar diretamente biodiesel em motores do ciclo diesel (LEUNG *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2015). Este biocombustível fornece uma excelente oportunidade para a mitigação das emissões de gases de efeito estufa e do aquecimento global, seguindo os princípios da química verde (PANWAR, KAUSHIK & KOTHARI, 2011). Por definição, o biodiesel é um constituído de ésteres mono-alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, onde a porção do éster que está ligado diretamente à carbonila é derivado de fontes renováveis como óleos vegetais (triglicerídeos) ou gorduras animais, enquanto que um álcool (metanol ou etanol) dará origem a porção que não está ligada diretamente à carbonila.

A reação de transesterificação é a principal forma para a produção deste biocombustível. Trata-se de uma reação de triésteres de cadeias longas (triglicerídeos) com um álcool de cadeia curta para produção de outro éster (biodiesel). Este processo ocorre na presença de um catalisador (ácidos, bases fortes ou enzimas) e temos como sub-produto desta reação a glicerina (ZHANG *et al.*, 2003). No Brasil, a maioria do biodiesel fabricado utiliza como matéria-prima o óleo de soja (MME (b), 2015), metanol como receptor de acila e um catalisador alcalino, sendo que na Europa a fonte de triglicerídeos mais usada é o óleo de canola (DEMIRBAS, 2008).

O que onera os custos em 60 a 80% da produção de biodiesel atualmente é o uso de matérias-primas com alto grau de pureza, uma vez que os catalisadores alcalinos empregados não permitem outra alternativa (ATADASHI *et al.*, 2012). A formação de sabão é a reação secundária mais inconveniente que ocorre quando as matérias-primas não são puras, ou seja, possuem mais do que 0,5% de acidez. Além disso, outros inconvenientes são esperados no

processo de catálise alcalina como: alto consumo energético, necessidade de remoção do catalisador alcalino e dificuldade em recuperar o glicerol (SHIMADA *et al.*, 1999; WATANABE *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2003).

Seria ideal se, no sistema de produção, não houvesse uma preocupação com grau de pureza da matéria-prima, podendo-se utilizar matérias-primas com alto índice de acidez, como os óleos e gorduras residuais (OGRs), o que teria uma relação positiva com o preço do produto final e, ao mesmo tempo, possibilitaria reciclar compostos que seriam possivelmente descartados na natureza. Esta realidade industrial está cada vez mais próxima, por meio do desenvolvimento de catalisadores enzimáticos, os quais são promissores na substituição dos catalisadores alcalinos.

Recentemente, pesquisas para a introdução de catalisadores enzimáticos na produção de biodiesel têm sido conduzidas em todo o mundo. A lipase (EC 3.1.1.3) é o catalisador ideal para produção de biodiesel, catalisando a hidrólise e a síntese de ligações ésteres de acilgliceróis de cadeia longa e liberando ou consumindo ácidos graxos e glicerol (JAEGER & EGGERT, 2002). Parte dos problemas encontrados com os catalisadores alcalinos (incapacidade de utilizar AGL, produtos com menor grau de pureza, dificuldade de recuperar o catalisador alcalino) podem ser superados pelos métodos enzimáticos para fabricação de biodiesel. Todavia, os métodos enzimáticos ainda não têm sido utilizados em escala industrial porque o custo da enzima é elevado e os efeitos causados pelo excesso de metanol (necessário para que a reação ocorra) e glicerol (produzido durante a reação) na enzima são, até então, negativos (SHIMADA *et al.*, 1999; WATANABE *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2006; ROYON *et al.*, 2007).

O presente trabalho foi realizado com o intuito de produzir catalisadores enzimáticos específicos para o meio reacional da produção de biodiesel, capazes de serem usados em OGRs, através da expressão heteróloga, purificação e imobilização de lipases.

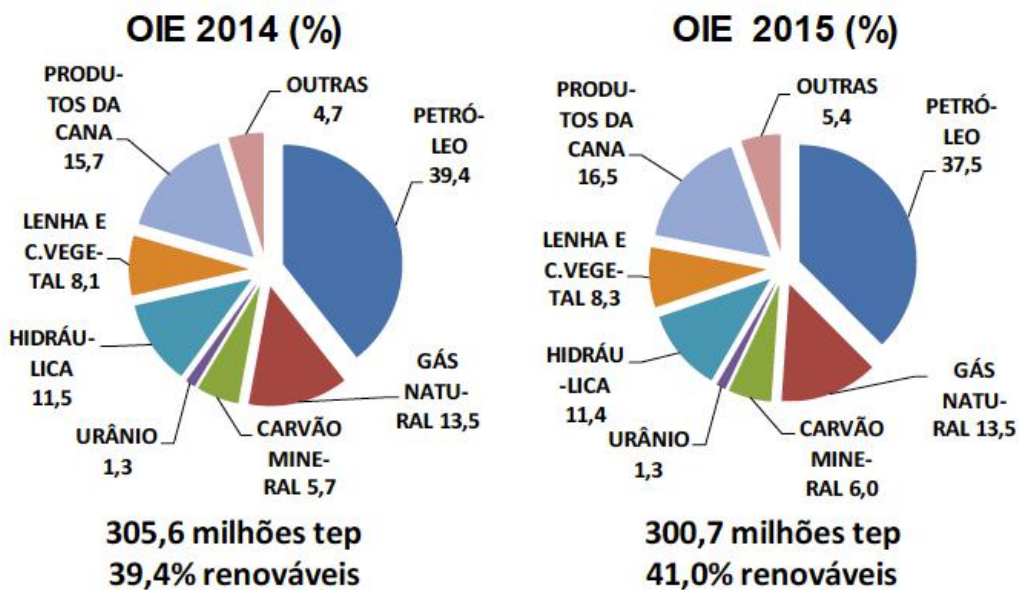
## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 TRANSIÇÃO ENERGÉTICA NO BRASIL

O Brasil apresenta atualmente um período de crise política e econômica com altas contínuas dos juros, da inflação, do desemprego e dos preços administrados. Isso foi bem refletido nos dados do Ministério de Minas e Energia com relação aos estudos de 2015 da Oferta Interna de Energia (OIE) que representa a energia necessária para mover a economia do país. A OIE ou demanda brasileira de energia, é um índice que reflete o somatório da produção interna com as importações de energia, menos as exportações e perdas de todas as fontes disponíveis no país. Embora as expectativas fossem de crescimento em 2% ao longo do ano de 2015, uma vez que o crescimento da OIE de 2014 foi de 3,1%, existiu na verdade um recuo de 0,5% até agosto de 2015, chegando a mais de 1,4% na demanda de energia no ano (MME (a), 2015).

Embora ocorra essa redução da oferta total de energia demandada pelo país, quando observamos a OIE das energias renováveis é possível perceber que houve um aumento. O Brasil tem 41% da sua OIE oriunda de fontes renováveis (Figura 1). Esse perfil resulta uma dependência menor da energia importada. (MME (a), 2015).

**Figura 1** - Oferta Interna de Energia renováveis, comparação 2014 - 2015

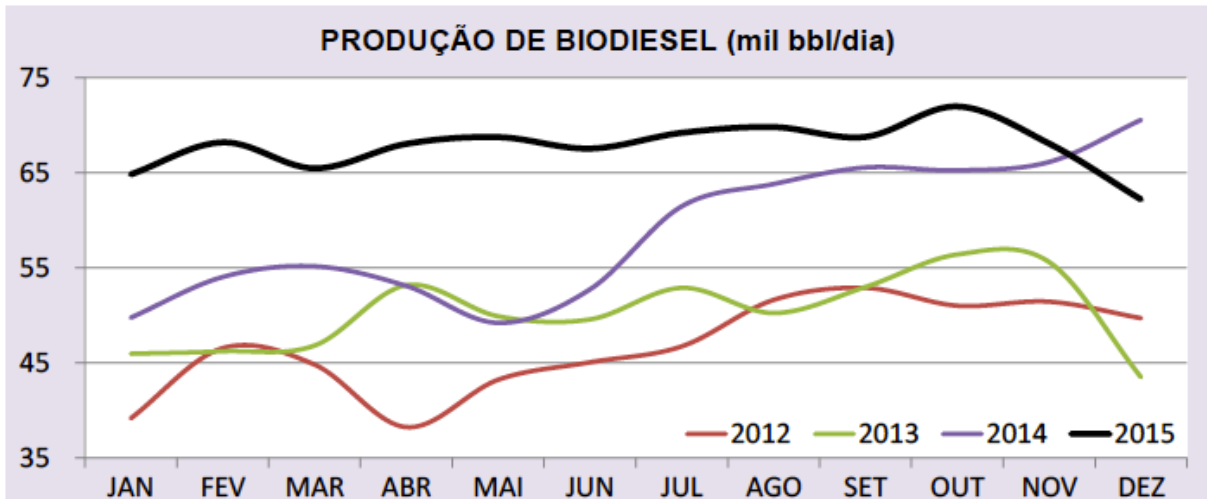


Fonte: Boletim Mensal de Energia (2015)



A produção de biodiesel finalizou com alta no ano de 2015 e ficou em 62 milhões de barris por dia (mil bbl/dia) em dezembro, porém com baixa de 11,9 % sobre igual mês em 2014 (Figura 2). No ano de 2015, a produção acumulou alta de 14,9 % (MME (a), 2015).

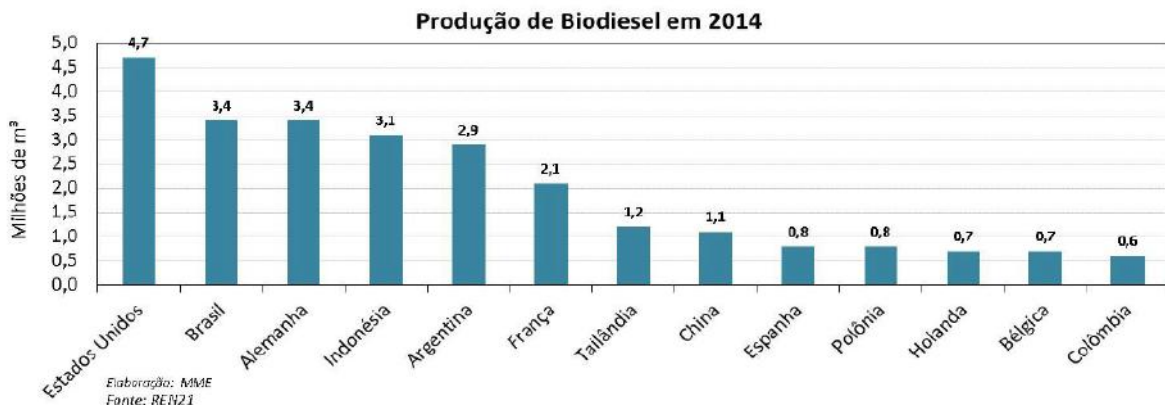
**Figura 2 - Produção de biodiesel em milhões de barris/ dia**



Fonte: Boletim Mensal de Energia (2015)

Em 2014 o Brasil foi o segundo maior produtor e consumidor de biodiesel do mundo (Figura 3 e 4). Os Estados Unidos se destacaram sendo o primeiro na produção e consumo (Figura 3 e 4). Na produção, a Alemanha manteve a segunda posição, assim como o Brasil, com 3,4 milhões de m<sup>3</sup>. Na sequência, vêm Indonésia, Argentina, França, Tailândia e China (MME, 2016).

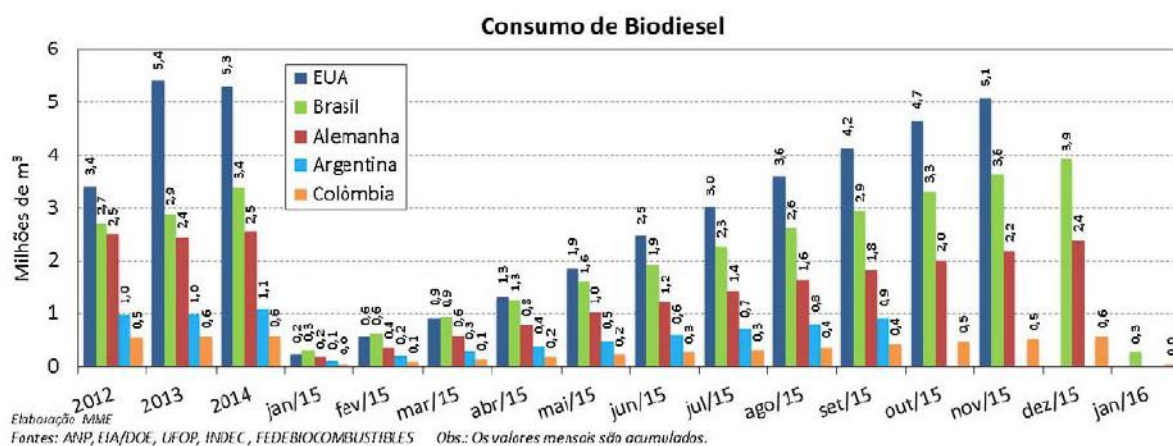
**Figura 3 - Produção internacional de biodiesel em 2014**



Fonte: Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis, Edição 92, setembro de 2015.

Em 2014 a oferta mundial de biodiesel foi de 29,7 milhões de m<sup>3</sup> (Figura 3) (MME (b), 2015). Em 2015, o consumo Brasileiro foi em torno de 3,9 milhões de m<sup>3</sup> contra 3,4 milhões de m<sup>3</sup> em 2014 (MME, 2016).

**Figura 4 - Consumo de Biodiesel em Países Seleccionados**



Fonte: Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis (Edição 97, Março, 2016)

A transição energética do Brasil tem como base introduzir fonte energética sustentável para diminuir a dependência do diesel importado. O biodiesel é um combustível com benefícios não apenas ambientais, mas também econômicos e sociais. A introdução deste biocombustível na matriz energética brasileira em 2015 por meio da lei 11.097/2005 tornou obrigatória, desde 2008, a adição deste no diesel em todo o território nacional. Desde novembro de 2014 essa mistura é de 7% (B7 - 7% de biodiesel e 93% de diesel de petróleo) (Lei 13.033/2014) e a cada 1% de biodiesel adicionado ao combustível convencional, é reduzido 0,7% na emissão de gases nocivos (BRASIL, 2014).

## 2.2 PRODUÇÃO DE BIODIESEL

### 2.2.1 Catálise homogênea

Convencionalmente, o processamento químico na indústria de biodiesel se dá por uma reação de transesterificação ácida ou alcalina (MA & HANNA, 1999; AL-ZUHAIR, 2005; LI *et al.*, 2006). Os ácidos sulfúrico, clorídrico e organossulfônicos são ácidos fortes geralmente empregados. A catálise ácida normalmente necessita de temperatura reacional muito alta, o que é considerado uma grande desvantagem. Todavia, sua principal vantagem em relação aos

catalisadores básicos é a ausência da formação de sabão na reação (MA & HANNA, 1999; RANGANATHAN *et al.*, 2008).

Os hidróxidos de sódio e potássio são os catalisadores alcalinos mais utilizados e por sua vez, produzem transesterificações mais rápidas e alta conversão de triacilgliceróis aos seus correspondentes ésteres do que os catalisadores ácidos (SHIMADA *et al.*, 1999; WATANABE *et al.*, 2000; FUKUDA, KONDO & NODA, 2001). São ainda menos corrosivos para os equipamentos industriais e conseqüentemente os mais utilizados nas indústrias de biodiesel (FREEDMAN, BUTTERFIELD & PRYDE, 1986; MA & HANNA, 1999).

A catálise básica, conquanto, apresenta alguns inconvenientes como: dificuldades em recuperar o glicerol; o catalisador alcalino tem que ser removido do produto; gasto intensivo de energia; óleos que contêm ácidos graxos livres e/ou água são incompletamente transesterificados; água durante a reação leva à ocorrência de hidrólise de alguns ésteres, com posterior saponificação dos ácidos graxos livres; formação de sabão causa aumento da viscosidade e interfere na separação do glicerol; requer tratamento de águas residuais alcalinas (FREEDMAN, PRYDE & MOUNTS, 1984; NELSON, FOGLIA & MARMER, 1996; SHIMADA *et al.*, 1999; MA & HANNA, 1999; WATANABE *et al.*, 2000; FUKUDA, KONDO & NODA, 2001; ISO *et al.*, 2001; SHIMADA *et al.*, 2002; AL-ZUHAIR, 2005).

Em virtude dos inconvenientes supracitados, a catálise enzimática se apresenta como uma permuta interessante porque tem capacidade de sobrepujá-los e ainda reduzir os custos de produção (FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

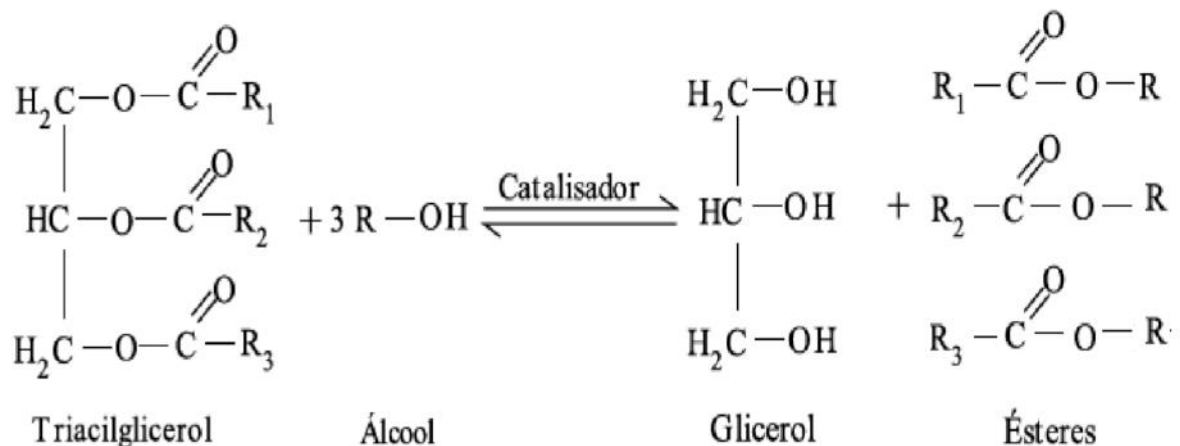
### **2.2.2 Catálise enzimática heterogênea**

Lipases são enzimas que atuam em ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol (PAIVA, BALCÃO & MALCATA, 2000; JAEGER & EGGERT, 2002; GUPTA, GUPTA & RATHI, 2004). As indústrias têm feito uso das lipases como catalisadores na química fina ou para fabricação de outros produtos, tais como: alimentos, detergentes, couros, têxteis, cosméticos, perfumarias, farmacêuticos, agroquímicos, oleoquímicos, entre outros. Isto está relacionado principalmente por seu rápido desenvolvimento tecnológico, versatilidade e facilidade de produção em massa (HASAN, SHAH & HAMEED, 2006).

A catálise enzimática pode ser homogênea ou heterogênea, o que vai distinguir entre ambos é o estado físico deste catalisador. Quando o catalisador está em estado físico diferente dos produtos, ele é classificado como heterogêneo. Neste estudo, iremos tratar de catalisadores enzimáticos heterogêneos porque a lipase é imobilizada em resinas sólidas o que possui várias vantagens como será detalhado mais adiante.

Recentemente as lipases tem sido empregadas na transesterificação de triacilgliceróis para a produção de biodiesel. A transesterificação (também chamada de alcoólise) é uma reação química estimulada por um catalisador (ácidos, bases ou enzimas), envolvendo óleos vegetais (ou gorduras animais) e um álcool comum (etanol ou metanol), para produzir metilésteres de ácidos graxos (MEAG) – biodiesel – e como co-produto a glicerina (ZHANG *et al.*, 2003; MA & HANNA, 1999). A reação é mostrada na Figura 5:

**Figura 5** - Reação global da reação de transesterificação de triglicilglicerol com álcool.

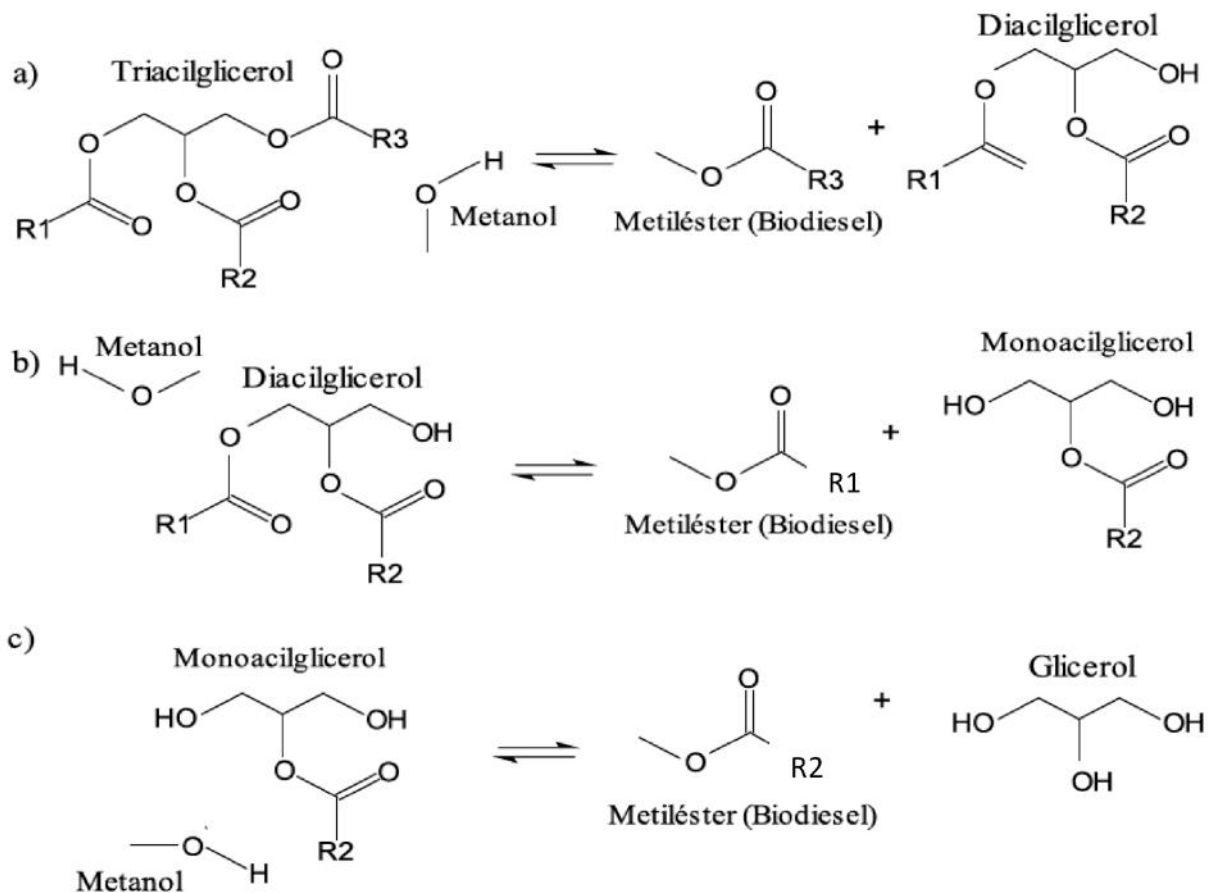


Triacilgliceróis (TAG) são os principais componentes dos óleos vegetais utilizados como matéria-prima, eles são constituídos por três ácidos graxos de cadeia longa ligados a um glicerol (ZHANG *et al.*, 2003). A estequiometria desta reação requer 3 moles de álcool para 1 mol de triglicerídeo para um rendimento de 3 moles de éster de ácido graxo (biodiesel) e 1 mol de glicerol (FREEDMAN, PRYDE & MOUNTS, 1984; MA & HANNA, 1999).

Os passos do mecanismo reacional da síntese do biodiesel são representados pela Figura 6. A transesterificação possui passos de conversões subsequentes e reversíveis. O metanol foi o álcool utilizado como aceptor do grupamento acila. Isto posto, MEAG são obtidos e correspondem o biodiesel. No primeiro passo (Figura 6a) acontece a conversão dos TAG em

diacilgliceróis (DAG). Prontamente (Figura 6b) os DAG são transformados em monoacilgliceróis (MAG). No terceiro passo (Figura 6c) os MAG são convertidos em gliceróis. Em cada passo supracitado, uma molécula de éster (metílico) é liberada (FREEDMAN, BUTTERFIELD & PRYDE, 1986; MA & HANNA, 1999; FUKUDA, KONDO & NODA, 2001; ZHANG *et al.*, 2003).

**Figura 6** - Esquema reacional da síntese de Biodiesel por transesterificação de triacilglicerol



O aumento do interesse no uso da lipase para a produção enzimática de biodiesel tem suporte nas diversas vantagens destes catalisadores sobre os catalisadores químicos, visto que exibe um rendimento maior (acima de 98%), um menor gasto de energia e uso de água (FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009), facilidade de recuperar o glicerol e com qualidade superior (NELSON, FOGLIA & MARMER, 1996; FUKUDA, KONDO & NODA, 2001), permite a transesterificação de glicerídeos com maior conteúdo de ácidos graxos e a esterificação total dos ácidos graxos livres (Tabela 1) (NELSON, FOGLIA & MARMER, 1996; FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

De maneira tímida o uso dessa tecnologia está alcançando uma aplicação industrial (TAFESH, 2014). Empresas como Viesel Fuel, Novozymes, Tactical Fabrication, Transbiodiesel, estão elaborando técnicas de tornar essa tecnologia uma realidade industrial. Até agora a sua adoção em escala comercial não é economicamente viável, mas alguns processos tem tornado o custo comparável ao de catalisadores tradicionais. Mas o verdadeiro benefício econômico das enzimas vem da sua capacidade de lidar com uma variedade de matérias-primas baratas (HOB DEN, 2014).

**Tabela 1** - Vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático na produção de biodiesel

Processos	Vantagens	Desvantagens
<b>Químico</b> NaOH KOH	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempo de reação: 1-5 h</li> <li>• Alto rendimento</li> <li>• Simplicidade do processo</li> <li>• Baixo custo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produtos com menor grau de pureza</li> <li>• Não recupera o catalisador</li> <li>• Não recupera o glicerol puro</li> <li>• Neutralização</li> <li>• Lavagem</li> </ul> (SHIMADA <i>et al.</i> , 1999; SHIMADA <i>et al.</i> , 2002; WATANABE <i>et al.</i> , 2000; ZHANG <i>et al.</i> , 2003)
<b>Enzimático</b> Lipase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recuperação do catalisador reuso</li> <li>• Recuperação da glicerina</li> <li>• Produtos com maior grau de pureza</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto custo do catalisador</li> <li>• Curta vida operacional</li> <li>• Efeitos negativos pelo excesso de metanol e glicerol</li> <li>• Tempo de reação: aproximadamente 24h</li> </ul> (SHIMADA <i>et al.</i> , 1999; WATANABE <i>et al.</i> , 2000; ISO <i>et al.</i> , 2001; LIN <i>et al.</i> , 2006; ROYON <i>et al.</i> , 2007; RANGANATHAN <i>et al.</i> , 2008)

### 2.2.3 Escolha do álcool na produção de biodiesel

O metanol e o etanol são álcoois de cadeia curta e estão entre os mais preferidos na transesterificação, especialmente o metanol por seu baixo custo e suas vantagens físicas e químicas (MA & HANNA, 1999; FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009). Todavia, a origem do álcool tem grande relevância quando a redução das emissões de gases estufa está em questão. Atualmente, boa parte do metanol procede de fontes fósseis (gás natural ou carvão). Contudo, o objetivo principal do uso do biodiesel é a redução da dependência de combustíveis fósseis. Para isso, o etanol é largamente produzido a partir de

fontes renováveis, contribuindo para diminuição dos gases de efeito estufa (FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

Para dirigir o equilíbrio da reação de transesterificação para um rendimento máximo de ésteres é primordial que a relação molar entre álcool/óleo seja maior que 3:1 (MA & HANNA, 1999). Além disso esse excesso molar aumenta a velocidade da alcoólise (WATANABE *et al.*, 2000).

Não obstante, o excedente de metanol (>1,5 mol/L) no meio reacional mantêm-se como gotas insolúveis dispersas no óleo (SHIMADA *et al.*, 1999). Isto pode acarretar uma diminuição da metanólise, posto que o contato da lipase com estas gotas de metanol é suficiente para inativar a reportada enzima de modo irreversível (SHIMADA *et al.*, 1999; SHIMADA *et al.*, 2002; WATANABE *et al.*, 2000). Algumas táticas são adotadas para resolver este transtorno como: o acréscimo de metanol em etapas (WATANABE *et al.*, 2000) pois apresenta-se efetivo para a completa conversão e evitar inativação da lipase; uso de solventes orgânicos pois permite uma melhor dissolução do metanol no meio reacional orgânico (NELSON, FOGLIA & MARMER, 1996; SHIMADA *et al.*, 1999; ISO *et al.*, 2001).

#### **2.2.4 Solventes orgânicos na produção de biodiesel**

Uma meta para a futura produção industrial seria a utilização de um método enzimático reacional livre de solventes orgânicos (*t*-butanol, *n*-hexano, éter de petróleo). Isto faria com que os catalisadores enzimáticos fossem superiores aos tradicionais de maneira ecológica, econômica e energética (SHIMADA *et al.*, 1999; ISO *et al.*, 2001; SHIMADA *et al.*, 2002; CHEN & WU, 2003; FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

Alguns fatores tornam impraticável o uso de solventes orgânicos na indústria, tais como: risco de explosão, expansão do reator para comportar os solventes e reagentes, indispensabilidade de remoção do solvente por destilação ou extração e maior gasto energético (SHIMADA *et al.*, 1999; ISO *et al.*, 2001; SHIMADA *et al.*, 2002; FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

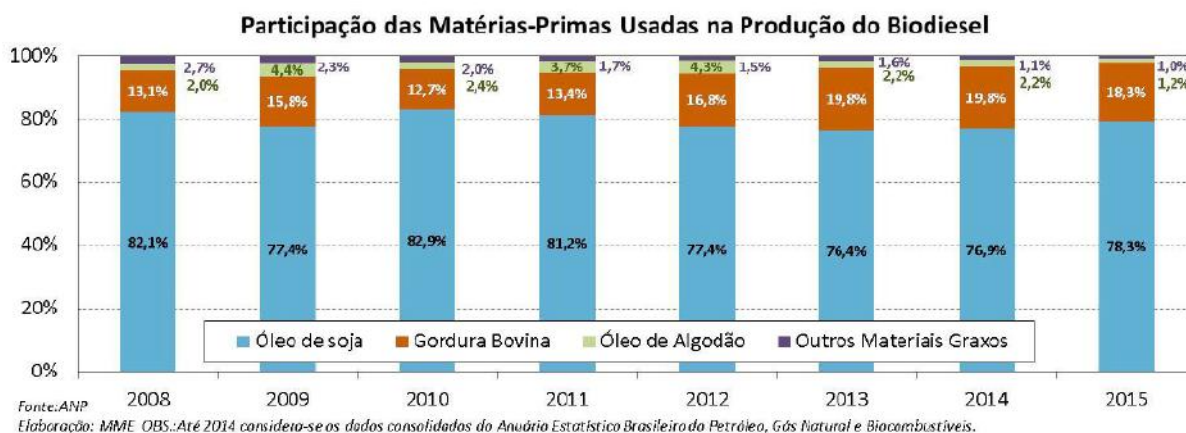
Conquanto, precisa-se otimizar a produção de biodiesel para que esta seja viável sem o uso de solventes. Isto porque um sistema livre de solventes é caracterizado por um menor rendimento de ésteres (FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

### 2.2.5 Matérias-primas com alto conteúdo de ácidos graxos livres (AGL)

As disposições dos cultivos locais sugestionam a eleição da matéria-prima para a produção do biodiesel. A escolha da matéria-prima é primordial visto que tem um impacto relevante no preço do produto final, algo em torno de 60-70% (ATADASHI *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2015).

A produção de biodiesel no Brasil é beneficiada pela variedade de matérias-primas disponíveis como o dendê, girassol, pinhão manso, macaúba, canola, linhaça, gergelim, dentre outras. Porém a soja é a oleaginosa mais requisitada (78,3 %) (Figura 7). A figura 7 apresenta a evolução da participação das matérias-primas na produção de biodiesel nos últimos 8 anos. Pode-se afirmar que a soja vem perdendo espaço para produtos de baixo valor agregado como a gordura bovina e outros materiais graxos (ANP, 2012; RAMOS, 2006; MME (b), 2015).

**Figura 7 - Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel (perfil nacional)**



Fonte: Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis (Edição 92, setembro de 2015)

O custo-benefício é o principal motivo no qual a liderança da soja é favorecida. Apesar dela ser considerada uma oleaginosa com baixo teor de óleo por unidade de peso, o seu óleo é um subproduto do processamento do seu farelo protéico, o qual possui alta demanda comercial (DALL'AGNOL, 2007).

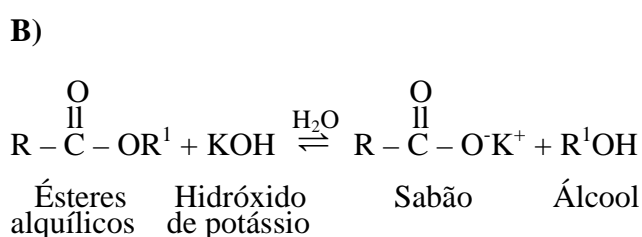
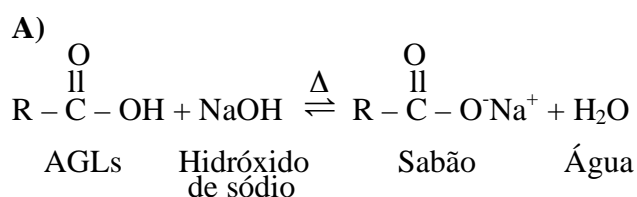
Para que o biodiesel seja um combustível comercialmente competitivo é fundamental reduzir os custos da produção por meio do emprego de matérias-primas alternativas como óleos e gorduras residuais (OGRs) e a transesterificação enzimática tem destaque na utilização desse tipo de matéria-prima (VÉRAS *et al.*, 2011).



Aproveitar resíduos que é normalmente descartado diretamente em esgotos domésticos, faz com que os OGRs se tornem uma matéria-prima de interesse ambiental e econômico (RAMOS, 2006). Entretanto, o principal método de produção – catálise alcalina – requer o emprego de óleos com alto grau de pureza, baixos teores de ácidos graxos livres (AGL) e água.

Os OGRs podem causar vários inconvenientes na catálise alcalina por possuírem um alto conteúdo de AGLs, são estes: formação de sabão (Figura 8), consumo do catalisador alcalino, baixa eficiência catalítica, aumento da viscosidade do biodiesel e formação de géis, tornando a purificação do biodiesel bruto complicada (ATADASHI *et al.*, 2012). Esses problemas podem ser minimizados consideravelmente através da aplicação da catálise heterogênea que usa catalisadores sólidos ou enzimas imobilizadas.

**Figura 8** – Reações de saponificação com ácidos graxos livres (AGLs) (A) e com ésteres alquílicos (B)



Fonte: ATADASHI *et al.* (2012)

### 2.3 LIPASE: CONTEXTO BIOTECNOLÓGICO

A lipase é um tipo de enzima digestiva em animais e secretada pelo pâncreas para o duodeno sendo necessária para a absorção e digestão de nutrientes. Ela também é secretada pela boca e pelo estômago. Para fins biotecnológicos, as lipases podem ser extraídas dos tecidos de animais e vegetais ou produzidas por fermentação microbiana (fungos, leveduras e

bactérias) (PAIVA, BALCÃO & MALCATA, 2000; GUPTA, GUPTA & RATHI, 2004). A grande atração industrial por lipases de origem microbiana se dá por serem facilmente cultiváveis e encontram imensa aplicação nas reações hidrolíticas e de síntese (SAXENA *et al.*, 1999; PAIVA, BALCÃO & MALCATA, 2000; CARVALHO *et al.*, 2003; HAMA *et al.*, 2006; GUPTA, GUPTA & RATHI, 2004).

Alguns fatores influenciam diretamente no rendimento máximo de produção do biodiesel como: origem da lipase, atividade de água ideal, temperatura de reação, imobilização ou não da enzima, escolha do álcool, tempo da reação, estabilidade da enzima e razão molar do óleo (FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

A origem e formulação da lipase influenciam nos parâmetros ideais para o seu uso (JAEGER & REETZ, 1998; FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009). Para reações de transesterificação de óleos e gorduras são utilizadas frequentemente lipases de fungos e bactérias. As fontes fúngicas são muito apreciadas por não levarem risco à saúde humana, porque são reconhecidas pelo FDA (Food and Drug Administration) como atóxicas e GRAS (Generally Regarded as Safe) (SOUZA & SOMMER, 2002). Ademais, existe uma facilidade de recuperação e purificação de lipases fúngicas por serem extracelulares (SAXENA *et al.*, 1999).

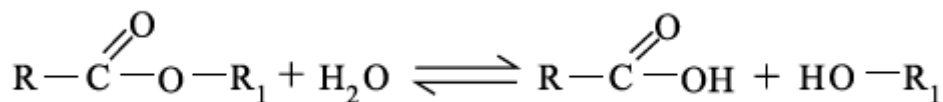
Do ponto de vista industrial biotecnológico, apesar de todas essas vantagens das lipases fúngicas, as fontes bacterianas são ainda mais atrativas por serem obtidas mais rapidamente, uma vez que as bactérias apresentam geralmente um crescimento celular mais rápido do que os fungos (JAEGER, DIJKSTRA & REETZ, 1999).

### **2.3.1 Reações catalisadas por lipases**

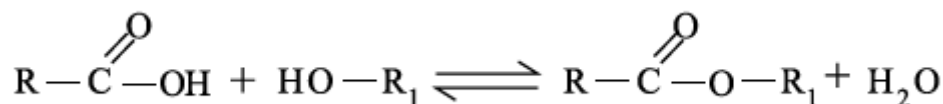
Posto que as lipases processam reações em meios não aquosos (esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise) e aquosos (hidrólise) (Figura 9), elas têm aptidão de utilizar vários substratos (JAEGER & EGGERT, 2002; SHIMADA *et al.*, 2002; SAXENA *et al.*, 1999; GUPTA, GUPTA & RATHI, 2004). Além disso, elas não requerem cofatores, têm alta estabilidade para extremos de temperatura, pH e solventes orgânicos bem como apresentam uma alta região-seletividade (JAEGER & REETZ, 1998; SAXENA *et al.*, 1999; ISO *et al.*, 2001).

**Figura 9** - Esquema das reações de hidrólise, esterificação e interesterificação catalisadas por lipases

### Reação de Hidrólise

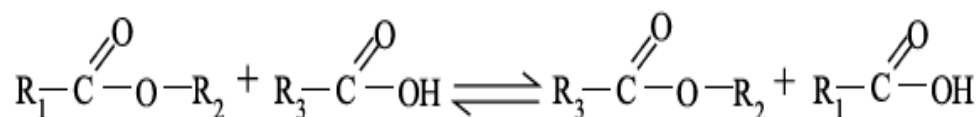


### Reação de Esterificação



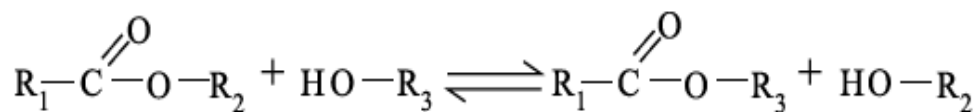
### Reação de Interesterificação

*Acidólise* (reação de éster com ácido)

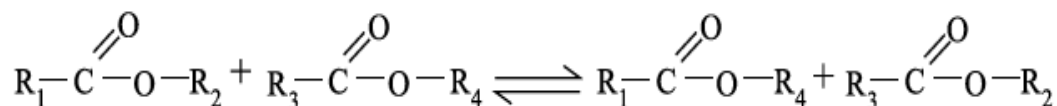


### Transesterificação

a) reação de éster com álcool



b) reação de éster com éster

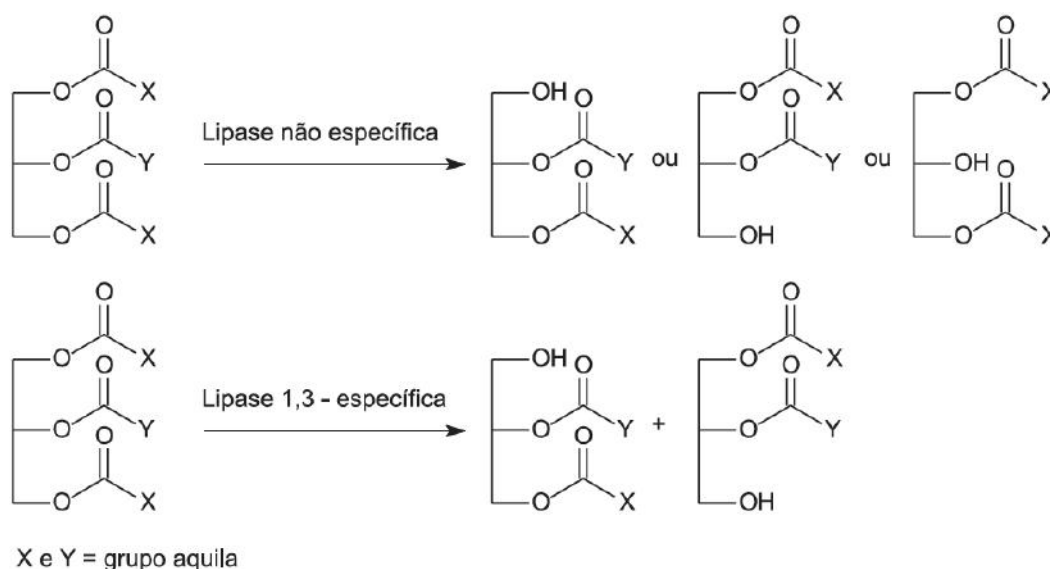


## 2.3.2 Especificidade das lipases

As diferentes regiões situadas no mesmo substrato são distinguidas pelas lipases devido a sua estrutura tridimensional, isto é caracterizado pela sua especificidade. A classificação das lipases quanto à especificidade é importante para direcionar sua aplicação no campo comercial (CASTRO & ANDERSON, 1995). Desta forma, as lipases são classificadas de lipases não-específicas e 1,3-específicas (Figura 10) (TOMBS, 1995; CASTRO & ANDERSON, 1995).

As lipases 1,3-específicas (regiosseletivas) clivam ácidos graxos das posições terminais do glicerol e formam como sub-produtos ácidos graxos livres, 1,2(2,3)-diacilgliceróis e 2-monoacilgliceróis (PAQUES & MACEDO, 2006).

**Figura 10** - Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica



Fonte: PAQUES & MACEDO (2006, p.94)

Já as lipases não-específicas catalisam a hidrólise de triacilgliceróis para ácidos graxos livres e glicerol de forma aleatória, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2 (CASTRO & ANDERSON, 1995; CARVALHO *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004). Estas não possuem especificidade com relação à natureza da ligação éster ou a posição em que este está esterificado no glicerol (CASTRO & ANDERSON, 1995; CARVALHO *et al.*, 2003).

A especificidade da lipase é de grande importância na produção de biodiesel porque estas não devem ser regioseletivas aos triacilgliceróis, para que todos os di e monoacilgliceróis (intermediários da reação de transesterificação) possam ser convertidos para ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e também para catalisar a esterificação de ácidos graxos livres (FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

### 2.3.3 Aspectos estruturais das lipases

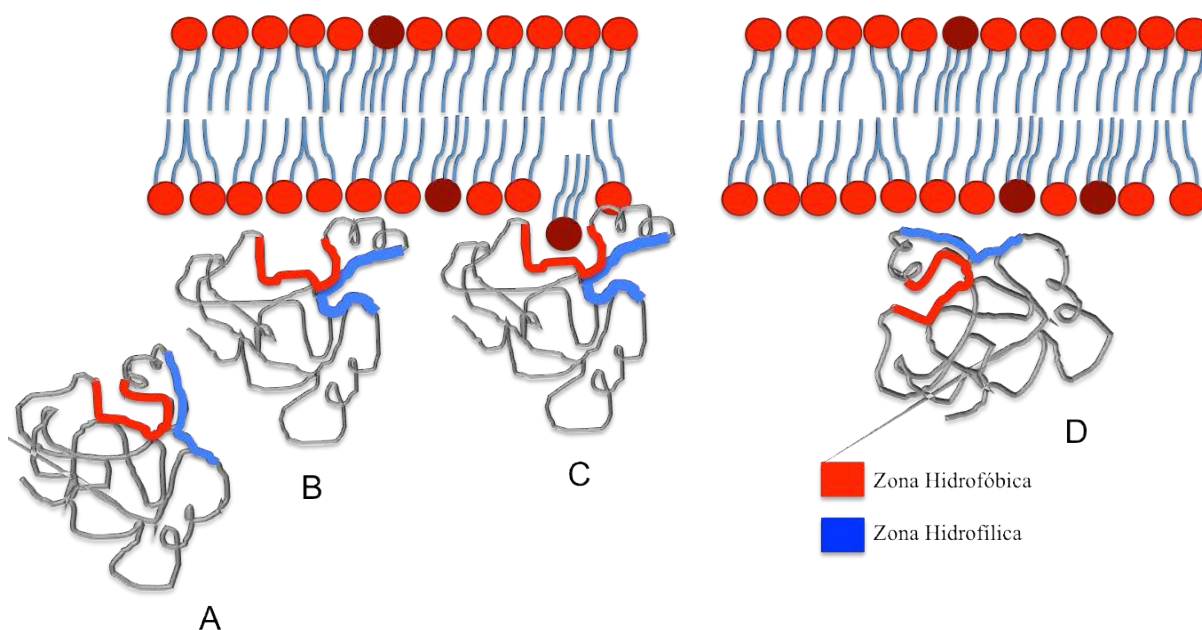
Formada por um entrelaçado de  $\alpha/\beta$  hidrolase, a estrutura terciária das lipases possuem uma arquitetura comum composta por uma sequência de 8 diferentes fitas  $\beta$  paralelas ligadas por seis  $\alpha$ -hélices (OLLIS *et al.*, 1992; PETERSEN, 1996; JAEGER & REETZ, 1998).

O sítio ativo é formado por uma rede de pontes de hidrogênio que une a tríade catalítica representada por cadeias laterais de resíduos dos aminoácidos serina (Ser), ácido aspártico (ou

glutâmico) (Asp/Glu) e histidina (His) (OLLIS *et al.*, 1992; JAEGER & REETZ, 1998; GUPTA, GUPTA & RATHI, 2004).

O sítio catalítico da lipase é protegido por uma superfície entrelaçada constituída por uma sequência peptídica em  $\alpha$ -hélice, conhecida como “tampa” anfipática ou “lid” (VERGER, 1997; JAEGER & REETZ, 1998). Essa tampa pode mover-se quando interage com uma interface lipídio/água, mudando conformacionalmente de sua forma "fechada" para sua forma "aberta" (VERGER, 1997; JAEGER & REETZ, 1998) expondo a tríade catalítica agora acessível ao substrato (Figura 11) (YAHYA, ANDERSON & MOO-YOUNG, 1998).

**Figura 11** - Ação da lipase sobre os triglicerídeos de uma bicamada lipídica. A) O sítio ativo (em vermelho) juntamente com a tampa interagem entre si pois possuem interação hidrofóbica, o que garante o fechamento da tampa. B) a tampa sofre abertura com a aproximação de uma superfície de lipídios. C) Triacilglicerol interagindo com o sítio ativo da lipase. D) A lipase retoma a sua posição fechada de origem.



A face da tampa voltada para o sítio catalítico possui cadeias laterais hidrofóbicas, que facilitam a interação da lipase com a interface de lipídios (YAHYA, ANDERSON & MOO-YOUNG, 1998; JAEGER, DIJKSTRA & REETZ, 1999). Já a superfície oposta é razoavelmente hidrofílica, estabilizada por interações com a superfície da enzima (YAHYA, ANDERSON & MOO-YOUNG, 1998). Todavia, não são todas as lipases que apresentam esta ativação interfacial (JAEGER, DIJKSTRA & REETZ, 1999).

## 2.4 VARIANTES DE LIPASES

As lipases em sua maioria atuam sobre micelas. No interior das micelas encontram-se as regiões hidrofóbicas dos lipídeos (substrato da lipase) excluindo a água que vai formar o meio externo, local onde a parte hidrofílica da micela fica em contato e a lipase está solúvel.

Este sistema de emulsão, onde ocorre a interface lipídio-água, é necessário para que a lipase possa exercer sua função catalítica. Desta forma, a tampa que protege o sítio ativo da maioria das lipases funciona como uma interconexão entre o meio aquoso e o meio orgânico.

Muitos processos reacionais industriais não são viáveis nesta condição. Em alguns casos, a lipase deve exercer sua ação em um meio homogêneo composto pelos lipídios substratos e por um receptor de acila que pode ser água em pequenas quantidades ou um álcool (WATANABE *et al.*, 2000; SHIMADA *et al.*, 1999). Co-solventes podem ser adicionados para garantir uma mistura homogênea entre os lipídios substratos e o álcool (FERRÃO-GONZALES *et al.*, 2011; ROYON *et al.*, 2007; ISO *et al.*, 2001). Nesses casos especiais, as lipases precursoras não exercem a função catalítica adequadamente devido ao fato das mesmas terem desenvolvido, durante o processo evolutivo das espécies que as originaram, características próprias para funcionarem em sistema emulsificado. Por isso, as lipases disponíveis comercialmente não são adequadas para estes processos industriais.

A remoção da tampa presente nas lipases deverá exercer ação positiva sobre sua função em meio orgânico homogêneo ou contínuo. Para manter a integridade dos outros domínios protéicos das lipases variantes, diversas modificações podem ser apresentadas para garantir uma ligação adequada entre aminoácidos localizados imediatamente anteriores a região da tampa com os imediatamente posteriores na estrutura primária da proteína. O aminoácido glicina pode ser um bom candidato para compor esta referida ligação devido a sua alta mobilidade e pequena cadeia lateral, quando comparado aos outros aminoácidos.

Desta forma, lipases variantes com atividade aumentada de hidrólise, esterificação e transesterificação em meio orgânico podem ser projetadas com base em um modelo tridimensional através de substituições dos aminoácidos na região caracterizada como “lid” ou tampa das lipases precursoras.

## 2.5 LIPASE B DE *Pseudozyma (Candida) antarctica*

A lipase B de *Pseudozyma antarctica* (PalB), anteriormente chamada de lipase B de *Candida antarctica*, destaca-se entre os membros da família das lipases por possuir características biocatalíticas para conversão indiscriminada de substratos, seletividade e estabilidade em solventes orgânicos (LARSEN, 2009; UPPENBERG *et al.*, 2004). No entanto, apesar de sua importância para síntese orgânica e biotecnológica, apenas recentemente PalB foi acrescida ao pequeno grupo de lipases alvos selecionadas para engenharia de proteínas (LUTZ, 2004).

### 2.5.1 Estrutura e mecanismo catalítico

PalB é uma enzima extracelular isolada dos basidiomicetos da levedura *Pseudozyma antarctica*. Possui alta termoestabilidade, um Ponto Isoelétrico (PI) de 6,0 e é estável em pH alcalino (Tabela 2) (KIRK & CHRISTENSEN, 2002). Com peso molecular de 33 kilodaltons (kDa), a sequência (DNA e aminoácidos) e estrutura cristalina de PalB foram resolvidas em 1994, revelando que esta enzima tem um típico entrelaçado de  $\alpha/\beta$  hidrolase com o sítio ativo formado pela tríade catalítica Ser105-Asp187-His244 (Figura 12) (UPPENBERG *et al.*, 1994, 1995).

**Tabela 2** - Características da lipase B de *Pseudozyma antarctica*

Peso molecular (kDa)	33
Ponto isoelétrico (pI)	6,0
pH ótimo	7
Atividade específica (IU/mg)	435
Termoestabilidade a 70°C <sup>a</sup>	15[0]
pH estabilidade <sup>b</sup>	7-10
Ativação interfacial	Não
Especificidade posicional para triacilglicerol	1-3 específica

<sup>a</sup> Uma atividade residual após incubação a 60°C em tampão tris 0,1 M (pH 7.0) por 20 min e 120 min. <sup>b</sup> pH no qual a atividade maior que 75% é mantida após incubação de 20h em temperatura ambiente.

Fonte: KIRK & CHRISTENSEN (2002, p. 446)

**Figura 12** - Estrutura geral de lipase B de *Pseudozyma antarctica* derivada da estrutura cristalina 1TCA (UPPENBERG *et al.*, 1994)



Fonte: Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org))

A forma imobilizada de PalB tem sido conhecida como o biocatalisador mais comum na reação de transesterificação para a produção de biodiesel (LUTZ, 2004; XU *et al.*, 2008). A reação natural de PalB é hidrolisar ésteres e apesar de ser uma lipase 1,3-específica (KIRK & CHRISTENSEN, 2002), ela realiza migração alquila, ou seja, converte 1,2 (2,3)-diglicilglicerol em 1,3-diacilglicerol, que é seu substrato preferido, contudo tal a etapa não é determinante de taxa para esta enzima (TURKAN & KALAY, 2006). Também, expressa plena atividade, tanto em soluções aquosas quanto em meios orgânicos, devido a sua forte esteroespecificidade sobre substratos quirais (UPPENBERG *et al.*, 1994).

PalB é uma lipase "atípica", ou seja, não apresenta ativação interfacial, tornando-a mais adaptada para catálise em meios orgânicos do que lipases "típicas" (SALIS *et al.*, 2003). A ativação interfacial ocorre quando a tampa de lipases "típicas" são convertidas de uma conformação fechada para uma conformação aberta, sendo que isto exige grandes mudanças conformacionais na região da tampa (lid) e mobilidade interna, diferentemente com o que ocorre com PalB (SALIS *et al.*, 2003).

A superfície que cobre a tríade catalítica de PalB não possui um formato comum, mas ela é constituída de uma pequena hélice com grande mobilidade que pode agir como tampa (UPPENBERG *et al.*, 1994). Apoderando-se deste privilégio, variantes de lipases com atividade aumentada em meio orgânico podem ser projetadas com base em um modelo tridimensional através de substituição de aminoácidos na região da tampa (lid) para que esta seja removida por completo ou tenha seu tamanho diminuído, tal como o da PalB.



### 2.5.2 Expressão funcional de lipase B de *Pseudozyma antarctica* em *Escherichia coli*

Sistemas eucarióticos foram usados para expressão de PalB tais como: *Aspergillus oryzae* (HOEGH *et al.*, 2005), *Pichia pastoris* (ROTTICCI-MULDER *et al.*, 2001) e em *Saccharomyces cerevisiae* (ZHANG *et al.*, 2003). Estas expressões obtiveram sucesso, porém uma expressão em sistemas procarióticos tal como expressão heteróloga em *Escherichia coli* (*E. coli*) seria muito vantajoso devido à simplicidade do processo, crescimento rápido da bactéria, baixo custo do meio utilizado, cultivo bem caracterizado, cultivo com alta densidade celular e genética bem conhecida (LARSEN, 2009).

Frente a várias tentativas de tornar a expressão de PalB em *E. coli* funcional, o primeiro relato de sucesso aconteceu em 2006 (LIU *et al.*, 2006). Todavia, alguns problemas de expressão de proteínas de eucariotos em sistemas procarióticos são encontrados tais como: não há modificações pós-traducionais (glicosilação, pontes dissulfeto), uso de diferentes códons e formação de corpos de inclusão (JUNG & PARK, 2008).

No caso da expressão de PalB em *E. coli* a glicosilação não foi necessária para o correto enovelamento de PalB (LARSEN, BORNSCHEUER & HULT, 2008). Todavia a PalB possui 3 pontes dissulfetos que são importantes no seu enovelamento e atividade (LARSEN, BORNSCHEUER & HULT, 2008; XU *et al.*, 2008)

Com relação aos códons presentes na sequência de PalB, vários não são normalmente utilizados por *E. coli*. Isto mostra a necessidade de otimização, ou seja, uso de *E. coli* engenheiradas para a produção desses códons raros (JUNG & PARK, 2008; LARSEN, BORNSCHEUER & HULT, 2008).

Adicionalmente, a temperatura tem um profundo efeito sobre a quantidade de expressão da enzima ativa (LARSEN, BORNSCHEUER & HULT, 2008). PalB é funcionalmente ativa quando a temperatura da expressão ocorre em torno de 15 a 25°C (XU *et al.*, 2008; LARSEN, BORNSCHEUER & HULT, 2008; SEO *et al.*, 2009).

## 2.6 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Um problema crucial que impede a substituição dos métodos atuais de produção de biodiesel para a produção enzimática é o elevado custo da lipase (WATANABE *et al.*, 2000; KUMARI *et al.*, 2009). Esta é uma das principais desvantagens da catálise enzimática

(BALCÃO, PAIVA & MALCATA, 1996; SHIMADA *et al.*, 1999; ISO *et al.*, 2001; JAEGER & EGGERT, 2002; FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

A imobilização enzimática é uma alternativa para reduzir o custo da lipase. Essa técnica permite a utilização do catalizador enzimático repetidamente (ISO *et al.*, 2001; KUMARI *et al.*, 2009). As principais vantagens da técnica de imobilização são citadas na Tabela 3.

**Tabela 3** - Principais vantagens da técnica de imobilização enzimática

Vantagens	Referências
Separa fisicamente a enzima do meio de reação para manter a conformação tridimensional da enzima cataliticamente ativa em meio orgânico	BALCÃO, PAIVA & MALCATA, 1996
Facilita a recuperação do catalisador para posterior reutilização	VILLENEUVE <i>et al.</i> , 2000; KUMARI <i>et al.</i> , 2009
Aumenta a estabilidade, com aumento do tempo de vida útil do catalisador	JAEGER, DIJKSTRA & REETZ, 1999; VILLENEUVE <i>et al.</i> , 2000
Mínimiza a inativação da enzima por substâncias químicas	VILLENEUVE <i>et al.</i> , 2000
Dispersa homoganeamente a enzima no meio orgânico, o que é essencial, para uma eficiente reação enzimática	CASTRO & ANDERSON, 1995

Com base na Tabela 3, os métodos de imobilização são utilizados de uma maneira geral para melhorar a estabilidade da lipase. A lipase em sua forma livre tem baixa estabilidade e dificilmente pode ser recuperada para uma reutilização (DONG *et al.*, 2014).

A imobilização consiste em confinar ou acomodar enzimas em uma região definida do suporte, no intuito de conservar sua atividade catalítica e permitir o uso de forma repetida ou contínua (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000).

O tipo do suporte bem como a metodologia empregada na imobilização é de suma importância para que os custos de produção se tornem viáveis. A qualidade desses dois fatores irá garantir a principal finalidade da imobilização que é o reuso (TISCHER & WEDEKING, 1999).

A técnica de imobilização deve ser conduzida de uma maneira que permita a enzima manter sua conformação ativa e flexibilidade catalítica. No presente estudo, um novo método

de imobilização é apresentado com a finalidade de facilitar o processo de produção de catalisadores para a síntese de biodiesel.

### **2.6.1 Imobilização enzimática por encapsulação**

A imobilização enzimática por encapsulação pode ser em matriz ou membrana (Figura 13). O princípio do método consiste em confinar uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. Cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como as enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos, se difundem. A enzima mantém sua mobilidade uma vez que não existe interações químicas ou físicas entre a enzima e o suporte (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2014).

A principal vantagem desse método é a grande área superficial de contato entre o substrato e a enzima. Já as principais desvantagens são: a inativação durante o processo de imobilização, inibição por substratos ou produtos e a necessidade de alta concentração de enzimas para garantir a encapsulação. Os filmes de polissulfonato de sódio (PSS), polióxido de etileno (PEO) e blendas PSS/PEO com diversas composições são exemplos de material que pode ser utilizado (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2014).

### **2.6.1 Imobilização enzimática por ligação**

As imobilizações enzimáticas por ligação estão bem representadas na figura 13. No caso da ligação por adsorção, a enzima é adsorvida na superfície de suportes insolúveis. As interações de baixa energia são responsáveis pela fixação da enzima, tais como: interações de van der Waals ou hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e iônica (CHIBATA, 1978; BICKERSTAFF, 1997; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2014).

As principais vantagens desse método é que ele não modifica a estrutura nativa da enzima. Já a principal desvantagem é a perda da enzima durante a utilização. Exemplo de material que pode ser utilizado: polietileno, polipropileno, celite, resina sintética, celulose, sefadex (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2014).

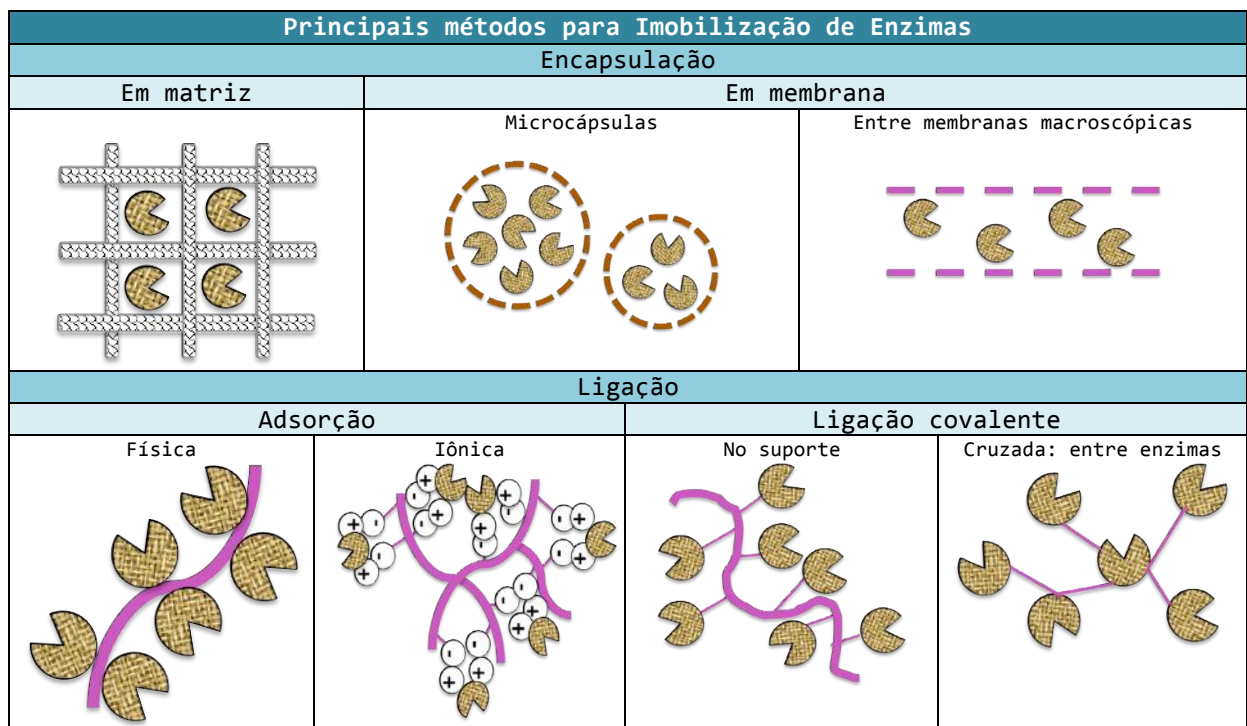
A imobilização por ligação covalente pode ser feita no suporte ou por ligação cruzada entre as enzimas. A ligação no suporte é baseada na ligação forte da enzima e o suporte por

meio de uma modificação química de um resíduo de aminoácido da enzima. Ocorre então ligação covalente da enzima em um material hidrofóbico, ou ligação covalente da enzima com uma matriz, ou ligações cruzadas entre a enzima e a matriz (CHIBATA, 1978; KENNEDY e CABRAL, 1987; DALLA-VECCHIA et al., 2014).

A ligação forte é uma vantagem que garante estabilidade para a enzima e impede a perda da mesma para a solução, além disso, pode resistir a altas temperaturas, condições desnaturantes e a solventes orgânicos em geral. A principal desvantagem é que a ligação pode alterar a estrutura nativa da enzima e o centro ativo ocasionando diminuição da atividade ou perda da especificidade (DALLA-VECCHIA et al., 2014).

A imobilização por ligação cruzada é um método que não utiliza suporte onde as enzimas são ligadas entre si ou à proteínas inativas formando um emaranhado complexo. Pode ser feita por método físico ou químico. Exemplo de material que pode ser utilizado: poli(etilenoglicol) (PEG), resinas epoxi, glutaraldeído (DALLA-VECCHIA et al., 2014).

**Figura 13** - Principais métodos para imobilização de enzimas



### 3 JUSTIFICATIVAS

O biodiesel é um biocombustível proveniente de fonte renovável de energia e garante substituição do combustível fóssil, o diesel de petróleo, sem grandes modificações no motor. A adição cada vez maior deste biocombustível ao diesel expõe as fragilidades da sua capacidade de produção por meio das indústrias desse setor. Desta forma, melhorias na tecnologia de obtenção são necessárias para que a demanda desta fonte de energia seja suprida. Uma das alternativas para atender o exposto, seria o aproveitamento de novas matérias-primas por meios economicamente viáveis. Para isso, o método atual de produção de biodiesel, a catálise alcalina, deve ser substituído por um processo que garanta superar os inconvenientes normalmente encontrados, de maneira que seja possível diminuir os passos de lavagem, plena recuperação do catalisador e a possibilidade de uso de material com alta acidez, como OGRs. A produção enzimática é o processo defendido por este trabalho e tem as características citadas para garantir a substituição do método antigo. Anteriormente, já foram relatadas, por meio da mesma equipe deste projeto, a produção e expressão heteróloga de lipases selvagens e mutantes para uso como catalisadores enzimáticos. Neste momento, este projeto prevê um novo método de purificação e imobilização em uma única etapa. Isto irá garantir aproveitamento da lipase produzida de maneira rentável, diminuindo os passos de processamento após a produção. Tais estratégias trazem como principal benefício o aumento da viabilidade econômica da produção de biodiesel.

## 4 OBJETIVO

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Desenhar lipases selvagens e mutantes, otimizar expressão heteróloga e desenvolver método de purificação e imobilização em uma única etapa utilizando o meio reacional derivado de expressão.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar clones de lipases a partir da sequência da lipase B de *Pseudozyma antarctica*;
- Expressar lipase B de *Pseudozyma antarctica* selvagem e mutante em *E. coli*;
- Desenvolver processo de purificação e imobilização em passo único de enzimas recombinantes;
- Estabelecer parâmetros reacionais da produção enzimática de biodiesel em reator de leito fixo;
- Estabelecer parâmetros reacionais da produção de biodiesel utilizando enzimas reticuladas.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 MATERIAL

#### 5.1.1 Meios utilizados para crescimento e transformação de bactérias

- Meio Lúria-Bertani (LB) – Líquido (SAMBROOK *et al.*, v.3, A 2.2)

Triptona	10g
NaCl	10g
Extrato de levedura	5g
Água destilada (q.s.p)	1.000 mL

Os reagentes foram dissolvidos em água destilada e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 5 mol/L. O meio foi autoclavado a 120°C por 20 min.

- Meio LB com ágar (SAMBROOK *et al.*, v.3, A 2.2)

Este meio foi preparado conforme o LB descrito anteriormente, adicionando-se apenas 2% de ágar.

- Meio GYT (SAMBROOK *et al.*, v.3, A 2.2)

Glicerol 10%	10 mL
Extrato de levedura	0,125g
Triptona	0,25g
Água ultrapura (q.s.p)	100 mL

Os reagentes foram dissolvidos em água ultra-pura. O meio foi autoclavado a 120°C por 20 min e estocado a 4°C.

- Meio SOB (SAMBROOK *et al.*, v.3, A 2.3)

Triptona	20g
Extrato de levedura	5g
NaCl	0,58g
KCl	0,18g
Água ultra-pura (q.s.p)	1.000 mL

A solução foi autoclavada a 120°C durante o período de 20 min e, posteriormente, adicionou-se 10 mM de MgCl<sub>2</sub>.

- Meio SOC (SAMBROOK *et al.*,v.3, A 2.3)

Este meio foi feito conforme o SOB, descrito anteriormente, adicionando-se 20mM de glicose.

- Meio 2x YT

Triptona	16g
Extrato de levedura	10g
NaCl	5g
Água ultra-pura (q.s.p)	1.000 mL

Os reagentes foram dissolvidos em água ultra-pura. O meio foi autoclavado a 120°C por 20 min e estocado a 4°C.

- Meio 2x YT com ágar

Este meio foi preparado conforme o 2x YT descrito anteriormente, adicionando-se 15g/L de ágar.

### 5.1.2 Reagentes e soluções utilizados na eletroforese unidimensional de proteínas

- Gel de Concentração 5% (5 mL) (SAMBROOK *et al.*,v.3, A 8.43)

Água	3,4 mL
Acrilamida 30%	830µL
Tris 1 M pH 6,8	630µL
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%	50µL
Persulfato de Amônio (PSA) 10%	50µL
TEMED	5µL

- Gel de Separação 12% (10 mL) (SAMBROOK *et al.*,v.3, A 8.43)

Água	3,3 mL
Acrilamida 30%	4,0 mL



Tris 1,5 M pH 8,8	2,5 mL
SDS 10%	100 $\mu$ L
PSA 10%	100 $\mu$ L
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	4 $\mu$ L

- Acrilamida 30%

Acrilamida 29%	14,5g
Bisacrilamida 1%	0,5g
Água ultra-pura (q.s.p)	50 mL

Guardar a solução ao abrigo da luz.

- Tris 1M pH 6,8

Tris	6,06g
Água ultra-pura (q.s.p)	50 mL

- Tris 1,5M pH 8,8

Tris	9,08g
Água ultra-pura (q.s.p)	50 mL

- SDS 10%

SDS	5g
Água ultra-pura (q.s.p)	50 mL

Guardar em temperatura ambiente.

- PSA 10%

PSA	0,1g
Água ultra-pura (q.s.p)	1 mL

Estocar em alíquotas de 100  $\mu$ L em freezer.

- Tampão de corrida 10X concentrado

Tris 25 mM	30,28g
Glicina 250 mM	187,67g
SDS 0,1%	10g
Água ultra-pura (q.s.p)	1.000 mL

Diluir antes de usar.

- Tampão de amostra

Tris 50 mM pH 6,8	0,06g
SDS 2%	0,2g
Azul de bromofenol 0,1%	0,01g
Glicerol 10%	1 mL
Água (q.s.p)	10 mL

Misturar os reagentes e adicionar DTT 1M ou  $\beta$ -mertaptoetanol 1 $\mu$ L/mL de tampão na hora que for usar.

- Solução Corante Azul de Coomassie

Azul de Coomassie Brilhante	0,25g
Metanol:Ácido acético glacial	100 mL

- Solução Metanol:Ácido acético glacial

Metanol	500 mL
Água	400 mL
Ácido acético glacial	100 mL

- Solução Descorante

Metanol 50% (v/v)
Água 40% (v/v)
Ácido Acético Glacial 10% (v/v)

### 5.1.3 Soluções utilizadas na expressão das proteínas recombinantes

- Solução de Isopropil-tio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (IPTG) 1mM

IPTG	1g
Água ultra-pura	4,19 mL

- Solução estoque de Kanamicina 50  $\mu$ g/mL

Kanamicina	250 mg
Água ultra-pura	5 mL

A solução foi esterilizada por filtração em sistema Milipore 0,22  $\mu$ m. Aplicar 0,5 mL para 500 mL de meio.

### 5.1.3 Soluções utilizadas na lise e purificação das proteínas recombinantes

- Tampão de lise (JUNG & PARK, 2008)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM
NaCl 300 mM
Imidazol 300 mM

Ajustar o pH para 8.0 com NaOH. Usar 5mL/g de células.

- Tampão TE-SDS (XU *et al.*, 2008)

Tris HCl 10 mM
Ácido etilenodiamino tetracético 0,1 mM
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1%

Ajustar o pH para 8.0 com NaOH.

## 5.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 5.2.1 Preparo de células eletrocompetentes e transformação de *E. coli* por eletroporação

Desenho e mutagênese sítio dirigida de lipases selvagem e mutante foram produzidas e encomendadas pela GeneScript Corporation.

No presente trabalho, uma cepa especial de *E. coli* foi usada (Tabela 4). A cepa Rosetta-gami<sup>TM</sup> 2(DE3) (Novagen, catalog 71351) combina as vantagens de minimizar as preferências de códons e aumentar a formação de pontes dissulfeto no citoplasma quando proteínas heterólogas são expressas em *E. coli*. Esses mutantes *trxB/gor* são compatíveis com vetores resistentes a kanamicina, e carregam a resistência a clorafenicol no plasmídeo (pRARE2), que abastece com sete tRNAs raros. DE3 indica que a cepa possui um gene oriundo do profago ( $\lambda$ DE), e portanto, carrega uma cópia cromossômica do gene da RNA polimerase T7 sobre controle do promotor lacUV5. Tais cepas são adequadas para a produção de proteínas de genes alvos clonados em vetores pET por indução com IPTG.

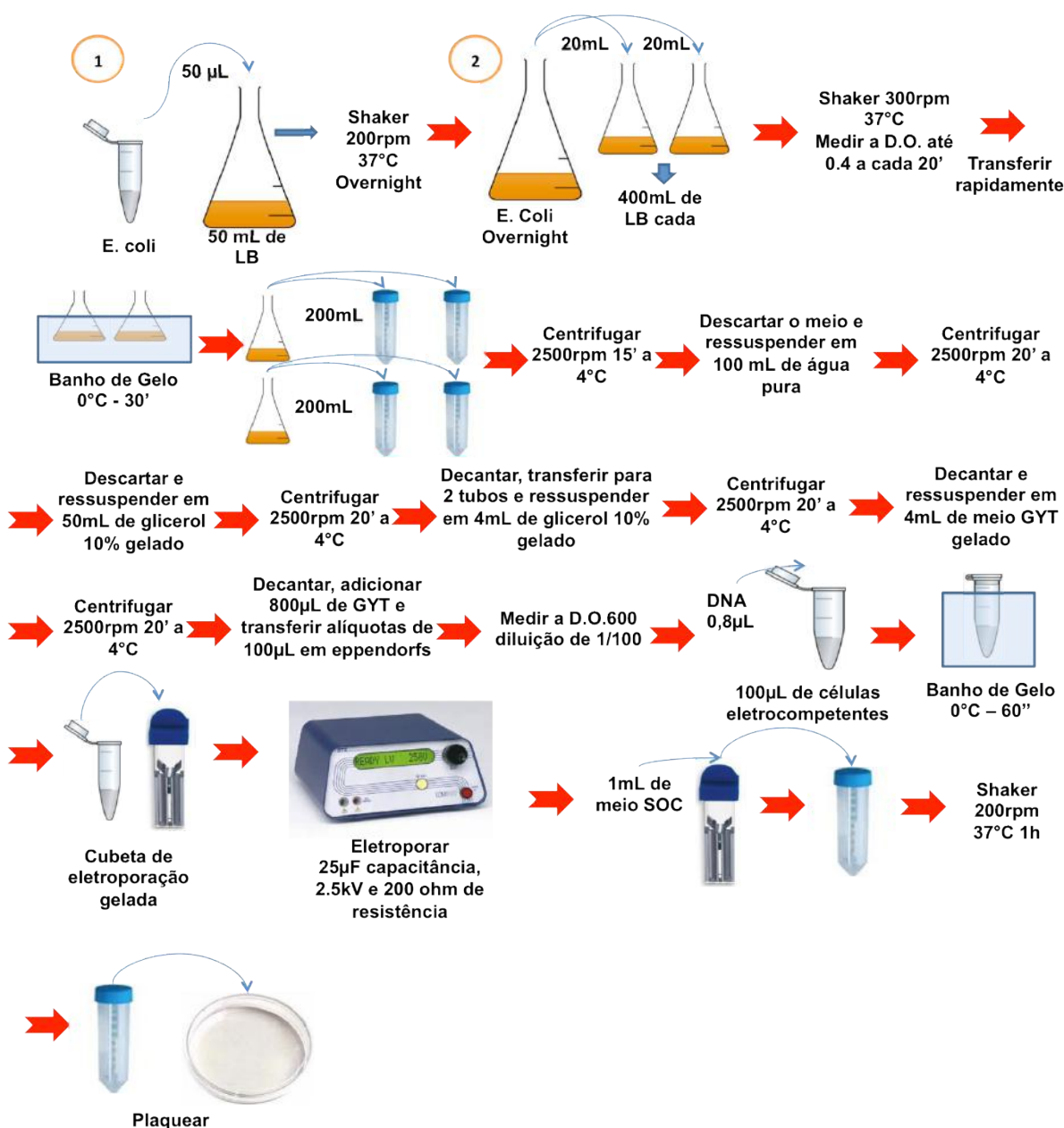
**Tabela 4** - Cepa e plasmídeo usados na expressão heteróloga de PalB

Cepa e plasmídeo	Genótipo ou fenótipo relevante	Fonte e referência
<i>E. coli</i>		
Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3)	$\Delta(\text{ara-leu})7697 \Delta\text{lacX74} \Delta\text{phoA}$ PvuII <i>phoR araD139 ahpC gale</i> <i>galK rpsL (DE3)F' [lac+ lacIq pro]</i> <i>gor522::Tn10 trxB pRARE2</i> (CamR, StrR, TetR)	Novagen pET Manual, 2006
Plasmídeo		
pET-28b(+)	P <sub>T7</sub> , Kan <sup>R</sup> , ori f1, His-Tag C/N- terminal fusion, T7-Tag N terminal fusion, Thrombin protease site	Novagen pET Manual, 2006

O plasmídeo pET-28b(+) (Novagen, catalog 69258) foi escolhido como vetor de expressão por ser compatível com a cepa de *E. coli* e por possui cauda de histidina, o que vai garantir facilidade na purificação e imobilização da enzima expressa (Tabela 4).

Para introdução do DNA plasmidial em *E. coli*, foi feita a técnica de transformação por eletroporação (Figura 14) de acordo com SAMBROOK *et al.*, 1989.

**Figura 14** - Esquema do procedimento experimental utilizado para transformação de *E. coli* por eletroporação



### 5.2.2 Expressão heteróloga de PalB selvagem e mutante

As células retiradas do estoque de glicerol foram reativadas por coleta da superfície por remoção de uma alçada para inocular 10 mL de meio 2xYT (Novagen pET Manual, 2006). O meio foi suplementado com 50 µg/mL de kanamicina e 34 µg/mL cloranfenicol. O meio foi agitado "overnight" em shaker à 37°C e 220 rpm. 5 µL desta cultura foi usada para inocular uma placa com o meio 2x YT por estriamento. A placa foi incubada à 37°C por aproximadamente 15h. Uma colônia isolada foi usada para inocular 10 mL do meio 2x YT, o

qual foi incubado à 37°C em shaker à 220 rpm por aproximadamente 16 h (LARSEN, *et al* 2008). A expressão heteróloga foi feita em um biorreator TecBio-1,5 em alta densidade de células (SIVASHANMUGAM *et al.*, 2009). 700 mL de meio 2x YT foi inoculado com 7 mL do pré-inóculo e foi conduzido à 37°C até que a densidade das células tenham alcançado uma densidade relativa a metade da fase exponencial de crescimento antes da saturação que é a densidade óptica (DO)<sub>600</sub> de aproximadamente 7. O meio foi suplementado com 100 mL do meio 2x YT dez vezes concentrado. Em seguida a cultura foi deixada por 1 h de reação sem a adição de isopropil β-D-tio galactopiranosídeo (IPTG) à 37°C. IPTG a 1 mM foi então adicionado para induzir a produção da proteína por 3 h. Amostras foram coletadas em cada hora de reação. Após a indução, as células foram colhidas por centrifugação.

### **5.2.3 Lise celular e isolamento da lipase dos corpos de inclusão**

Amostras das culturas foram centrifugadas à 4 °C e 12.000 xg por 1 min. O pellet foi então ressuscitado em tampão de lise (JUNG & PARK, 2008). A suspensão de células foi sonicada por 30 segundos e então centrifugada à 4°C e 12.000 xg por 20 minutos. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi usado para ensaios de atividade. O pellet contendo as proteínas insolúveis e restos celulares foi lavado com tampão fosfato (0,05 M, pH 7), ressuscitado em tampão TE-SDS, e aquecido à 100°C por 5 minutos (XU *et al.*, 2008). O sobrenadante e o conteúdo proteico do pellet foram analisados como frações solúveis e insolúveis, respectivamente.

### **5.2.4 Análise por SDS-PAGE**

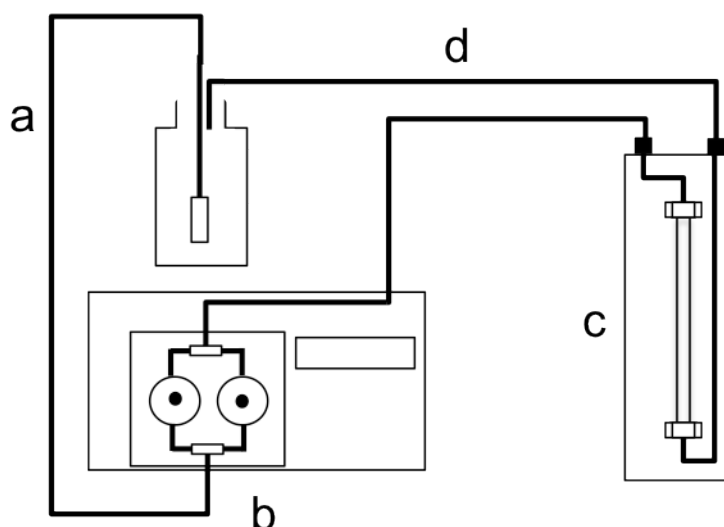
As proteínas totais das amostras foram visualizadas por eletroforese em gel SDS-PAGE a 12%. As amostras da expressão foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi usado. Junto ao pellet adicionou-se 20 µL de tampão de amostra com DTT (Ditiotreitol) (agente redutor). Após, as amostras foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos. Em seguida, 5 µL de cada amostra foram aplicados nos poços do gel. O marcador de padrão de peso molecular de proteína (Benck Mark Protein ladder, Invitrogen) utilizado como referência foi de 10 a 220 kDa. Por último a cuba é fechada e ligada a uma fonte de energia.

### 5.2.5 Catálise contínua de biodiesel em leito fixo por Novozyme 435

A catálise contínua de biodiesel em leito fixo por Novozyme 435 foi feita no Instituto de Ciências Moleculares (Institut des Sciences Moléculaires), na Universidade de Bordeaux 1 (Université de Bordeaux 1) na França, no período do doutorado sanduíche.

Uma coluna para HPLC de aproximadamente 25 cm foi usada como reator para produção de biodiesel em leito fixo. A coluna foi completamente preenchida com 5,05 g da enzima Novozym 435. Em seguida a coluna foi acoplada a um sistema contendo um aquecedor que se manteve em temperatura 60°C (Figura 15 c) e uma bomba ajustada para fluxo contínuo de 0,1 mL/min em uma pressão de 8 bar (Figura 15 b). O meio reacional ficou em um recipiente (Figura 15 a) onde, no seu interior, um cano conduziu o meio à entrada da bomba e outro cano conduziu a saída do meio após passagem no reator em coluna até o meio reacional, formando um circuito fechado (Figura 15 d). Para o meio reacional foi utilizado 30 mL de óleo de canola comercial, 10,8 mL de etanol anidro e 9,9 mL de t-butanol. A reação durou 42 h. Amostras foram retiradas para serem submetidas à Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

**Figura 15** - Esquema do circuito fechado utilizado em reator de leito fixo. a) mostra a condução do meio reacional até a bomba. b) o meio sai da bomba e entra no reator de leito fixo. c) o meio é transformado em produto à temperatura de 60°C. d) o produto é conduzido de volta para o meio inicial formando um circuito fechado.



### 5.2.6 Produção de biodiesel por PalB comercial reticulada

A produção de biodiesel por PalB comercial reticulada foi feita no Instituto de Ciências Moleculares (Institut des Sciences Moléculaires), na Universidade de Bordeaux 1 (Université de Bordeaux 1) na França, no período do doutorado sanduíche.

Em um reator de tanque agitado acoplado a um condensador foi adicionado 0,45g de enzima PalB reticulada, 30mL de óleo de canola comercial, 10,8 ml de etanol anidro, 9,9 mL de t-butanol (proporção 6:1 álcool/óleo) (Figura 23). A reação ocorreu à 60°C e 200 rpm por 24 h. Amostras foram retiradas para serem submetidas à CCD (FERRÃO-GONZALES *et al.*, 2011).

### 5.2.7 Cromatografia em camada delgada

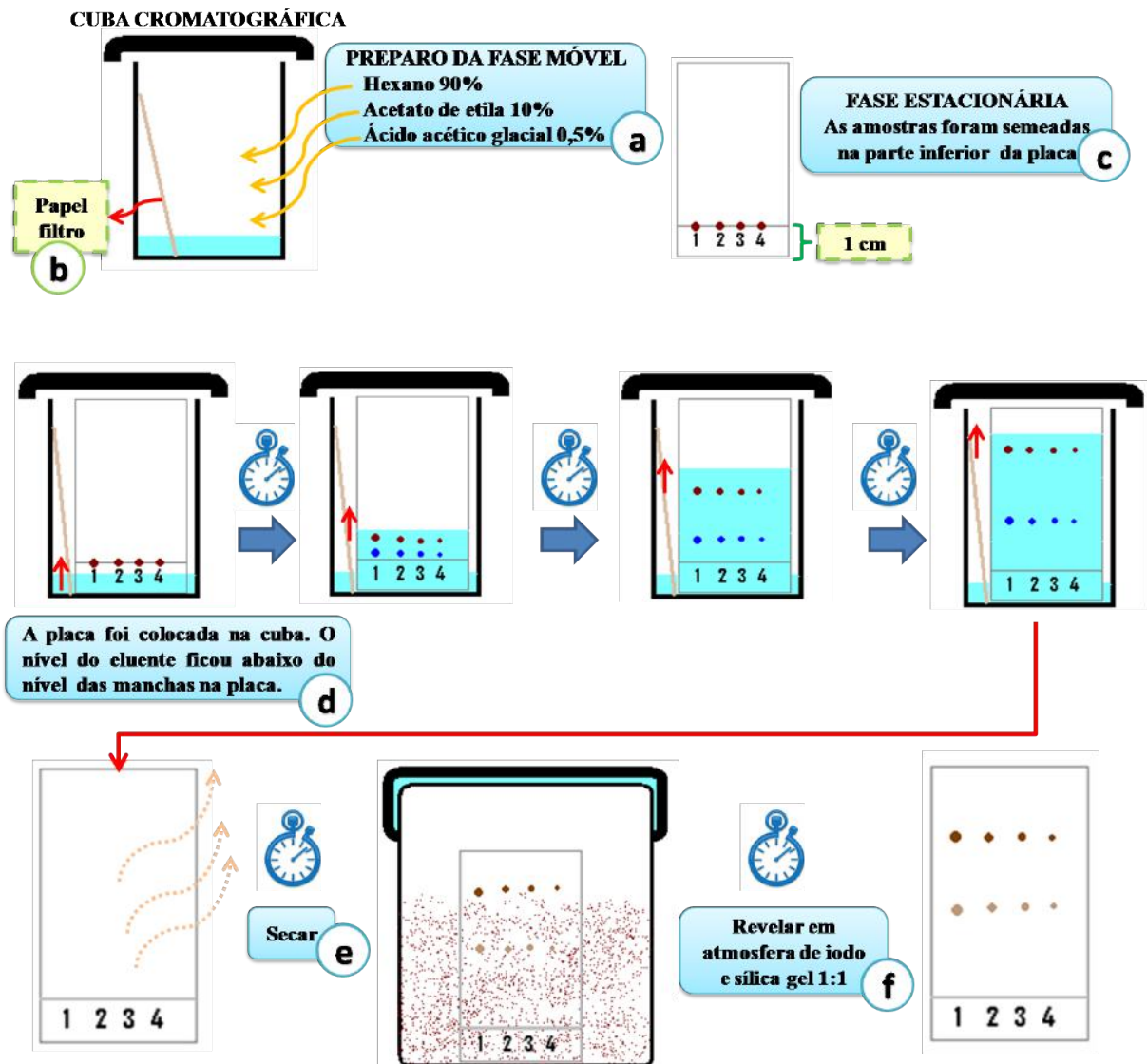
Para determinação qualitativa e acompanhamento da produção de biodiesel realizou-se CCD com cromatofolhas de sílicagel. Para tanto utilizou-se amostras da reação de produção de biodiesel. No preparo da fase móvel usou-se uma cuba cromatográfica onde foi adicionada uma mistura dos solventes hexano, acetato de etila e ácido acético glacial (90-10-0,5%) em proporções padronizadas em laboratório (Figura 16.a). A seguir colocou-se um papel filtro na cuba para saturar a atmosfera com os solventes (Figura 16.b).

As amostras da reação foram semeadas com o auxílio de um pequeno capilar, na parte inferior da cromatofolha, a 1 cm da base da placa e separadas entre si (Figura 16.c). Formou-se uma pequena mancha circular. A cromatofolha de sílicagel foi colocada na cuba cromatográfica contendo o eluente (Figura 16.d). O nível do eluente ficou abaixo do nível das manchas na cromatofolha. Após o solvente ascender pela cromatofolha de sílicagel esta foi retirada da cuba e colocada para secar até que ficasse livre do solvente (Figura 16.e).

Como as substâncias analisadas eram compostos incolores, necessitou-se “revelar a placa” para visualizá-las. O método utilizado foi a imersão da placa de sílica gel em vapores de iodo (Figura 16.f), preparado em uma cuba contendo uma mistura 1:1 de iodo e sílica gel triturados em almofariz.



Figura 16 - Fluxograma do preparo da Cromatografia em Camada Delgada

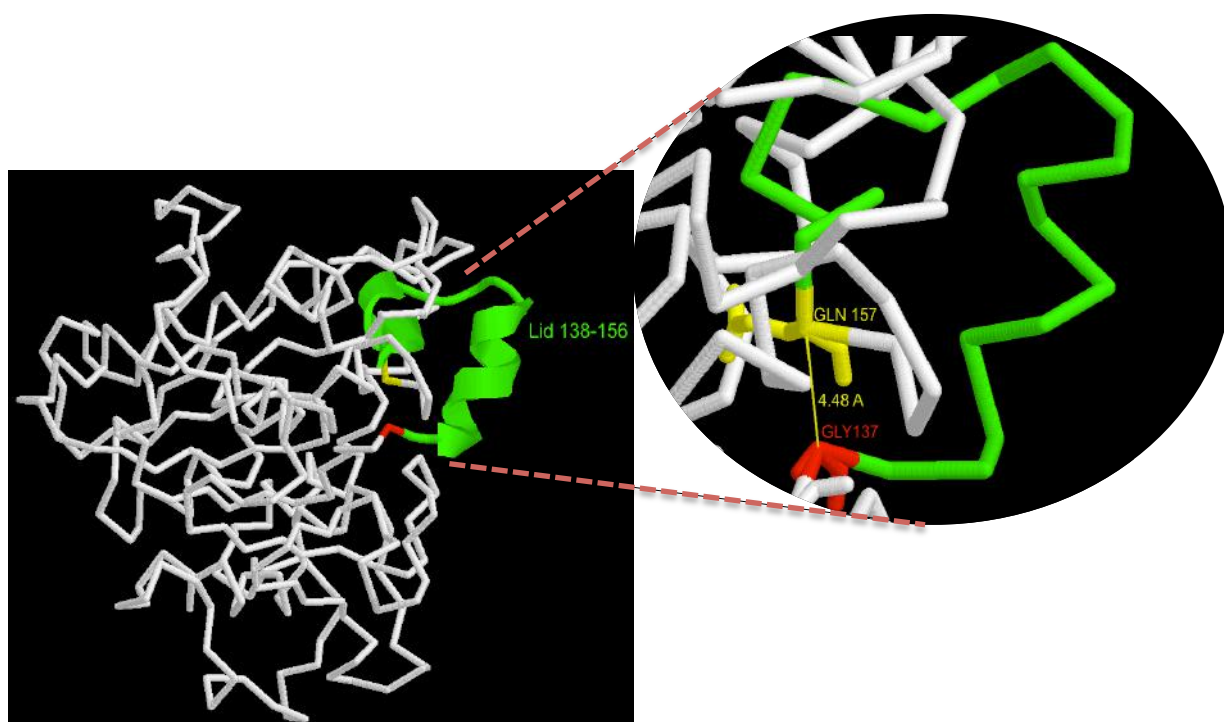


## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 VARIANTES DE LIPASES

No sentido de aumentar a atividade de hidrólise, esterificação e transesterificação em meio orgânico, 57 seqüências de polipeptídeos precursores de *PalB* foram usados para projetar lipases variantes. A patente 2 (Anexo A) mostra estas 57 seqüência de lipases precursoras SEQ ID NO: 1-57 (Anexo A - Figura 1). Em cada seqüência, foi feita a identificação e seleção dos resíduos correspondentes à região da tampa (lid) (Anexo A, Figura 2, SEQ ID NO: 59-116). No caso da lipase B *Pseudozyma antarctica*, esta posição foi da 137 a 157 da SEQ ID NO:9 (Anexo A - Figura 1). Em seguida, estabeleceu-se substituições de parte ou da totalidade destes resíduos por um segmento correspondente a uma cadeia peptídica contendo de 1 a 10 resíduos do aminoácido glicina. A glicina foi o aminoácido de escolha porque possui alta mobilidade e pequena cadeia lateral.

**Figura 17** - Representação da estrutura tridimensional da principal cadeia de lipase B de *P. antarctica*. A região da tampa (lid) está destacada. No detalhe é mostrado a distância entre o átomo do carbono carbonílico do resíduo de glicina na posição 137 e o nitrogênio amídico do resíduo de glutamina na posição 157



Fonte: Protein Data Bank código 1TCA

A Figura 17 mostra o modelo tridimensional da PalB que está publicado no servidor do Protein Data Bank (PDB) sob o código 1TCA (UPPENBERG et al., 1994). Na lipase B de *P. antarctica*, a posição onde houve a remoção dos resíduos (posição 137 a 157) possui uma distância de 4,48 ângstrons ( $4.48 \times 10^{-10}$  metros). Esta distância correspondem a dois resíduos de glicina, desta forma este aminoácido foi escolhido para fazer as substituições (Figura 17).

A substituição dos resíduos de aminoácidos baseou-se na manutenção da integridade estrutural do polipeptídeo produzido pela alteração prevista. A mutação escolhida para expressão foi a que possui substituição por três glicinas, contando com a glicina presente na posição 137. A Figura 18 mostra a sequência FASTA da lipase B selvagem de *P. antarctica* e logo em seguida, o mutante PantDlidG3. A região da tampa (137-157) onde no mutante foi substituída por três resíduos de glicina, está destacada em vermelho.

**Figura 18** - Sequência FASTA da lipase B de *P. Antarctica*, tipo selvagem (topo) e o mutante *PantDlidG3*. A região da tampa da lipase selvagem e sua substituição por três resíduos de glicinas no mutante estão destacados em vermelho.

```
> Lipase B de P. antarctica (selvagem)
LPSGSDPAFSQPKSVLDAGLTCQGASPSVSKPILLVPGTGTTPQSFDSNWIPLSTQLGYTPCWISPPPFMLNDTQVNT
EYMVNAITALYAGSGNNKLPVLTWSQGGLVAQWGLTFFPSIRSKVDRLMAFAPDYKGTVLAGPLDALAVSAPSVWQTTG
SALTTALRNAGGLTQIVPTTNLYSATDEIVQPQVSNSPLDSSYLFNGKNVQAQAVCGPLFVIDHAGSLTSQFSYVVGRSA
LRSTTGQARSADYGITDCNPLPANDLTPEQKVAAAALLAPAAAAIVAGPKQNCPEDLMPYARPFVAVGKRTCSGIVTP
>Lipase PantDlidG3
LPSGSDPAFSQPKSVLDAGLTCQGASPSVSKPILLVPGTGTTPQSFDSNWIPLSTQLGYTPCWISPPPFMLNDTQVNT
EYMVNAITALYAGSGNNKLPVLTWSQGGLVAQWGLTFFPSIRSKVDRLMAFAPDYKGGGQTTGSALTTALRNAGGLTQIV
PTTNLYSATDEIVQPQVSNSPLDSSYLFNGKNVQAQAVCGPLFVIDHAGSLTSQFSYVVGRSALRSTTGQARSADYGITD
CNPLPANDLTPEQKVAAAALLAPAAAAIVAGPKQNCPEDLMPYARPFVAVGKRTCSGIVTP
```

## 6.2 PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO DE *E. Coli* POR ELETROPORAÇÃO

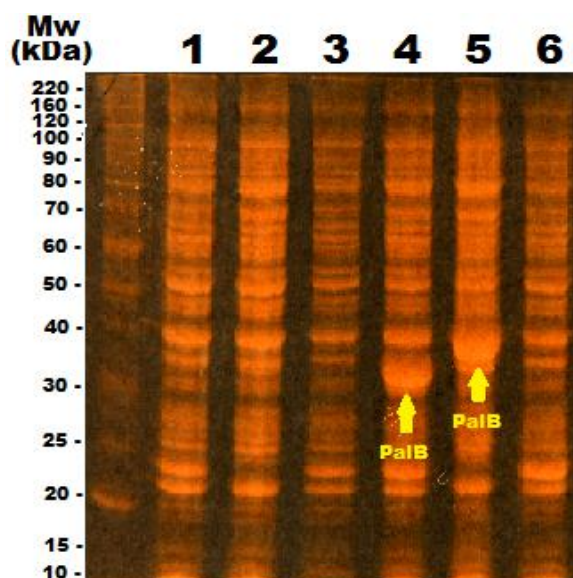
Clones de lipase selvagem e modificada foram desenhados, submetidos a simulações de Dinâmica Molecular e encomendados à empresa Genescript. Células eletrocompetentes foram preparadas e transformadas por eletroporação para a inserção dos plasmídeos possuindo a PalB mutante e a PalB selvagem. O mutante escolhido para os testes de expressão foi o PantDlidG3. Houve crescimento de células transformadas em meio seletivo as quais foram utilizadas para o método de expressão.

### 6.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PALB SELVAGEM E MUTANTE

Expressão de proteínas em sistema *E. coli* cepa Rosetta-gami 2(DE3) Competent cells foi investigado em diferentes temperaturas (37 e 25°C) e tempos de cultivo. Incubação prolongada foi realizada a 25°C para compensar parcialmente uma taxa mais lenta de crescimento específico, portanto, variando de 3 horas (37°C) a 20 h (25°C) (Dados não mostrados).

O extrato bruto da proteína produzida foi visualizado em gel SDS-PAGE (Figura 19). Os géis foram carregados com o mesmo volume de amostra. Utilizando-se o plasmídeo sem inserto como negativo (Figura 19: 6), verificou-se a expressão de PalB após 3 horas de indução com IPTG 1 mM a 37°C. A lipase mutante apresenta redução no número de aminoácidos em sua cadeia, desta forma, mostrou uma banda mais leve que a lipase selvagem (Figura 19: 4). Todavia a lipase selvagem e mutante ficaram aproximadamente dentro da faixa de peso molecular de PalB de 33 kDa.

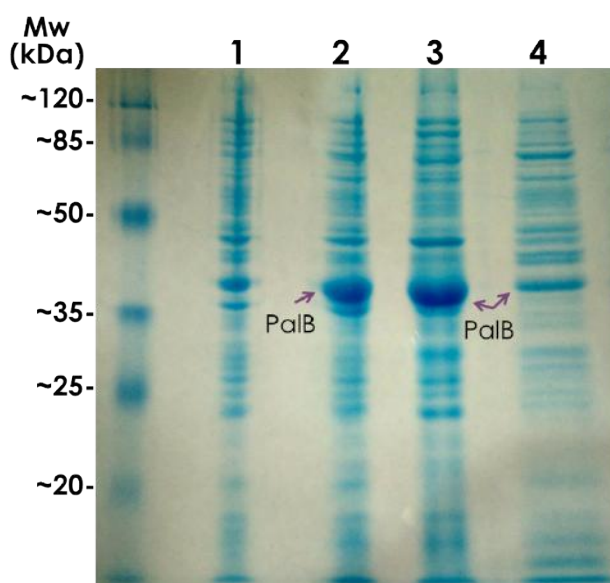
**Figura 19** - SDS-PAGE de expressão heteróloga de lipase B de *P. antarctica* em *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3). Linhas 1-3: amostras não induzidas de lipase mutante, lipase selvagem, plasmídeo sem inserto respectivamente; linhas 4-6: amostras induzidas com 1 mM IPTG por 3 horas de lipase mutante, lipase selvagem, plasmídeo sem inserto respectivamente. SDS-PAGE foi corado com Comasie Brilliant Blue.



A Figura 20 mostra a expressão heteróloga de PalB selvagem em *E. coli*. O mesmo volume de amostras foi aplicado no gel. Na linha 1 temos o padrão de expressão da amostra não induzida por IPTG. A amostra com o padrão da expressão após 3 horas de indução com

IPTG foi mostrada na linha 2. Após expressão, o meio de cultura foi submetido a colheita das células e lise celular, no intuito de separar a PalB dos restos celulares. Porém percebeu-se a presença da grande maioria da lipase no pellet da amostra lisada (Figura 20; linha 3) e pouca quantidade é solúvel no sobrenadante (Figura 20; linha 4). Isto indica que esta proteína forma corpos de inclusão, ou seja, ela não é corretamente enovelada pela *E. coli* e essa característica torna a proteína insolúvel, ficando no pellet do lisado.

**Figura 20** - SDS-PAGE de expressão heteróloga de lipase B de *P. antarctica* em *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3). Linha 1: amostras não induzida de lipase selvagem; linha 2: amostras induzida com 1 mM IPTG por 3 horas de lipase selvagem; linha 3: amostra do pellet após lise da *E. coli*; linha 4: amostra do sobrenadante após lise da *E. coli*. SDS-PAGE foi corado com Comasie Brilliant Blue.



O motivo da ineficácia do enovelamento ainda não foi estudado, porém, presume-se que está relacionado com a formação de pontes dissulfetos, pois é um passo crucial para o enovelamento correto e função de PalB (LARSEN, BORNSCHEUER & HULT, 2008; XU *et al.*, 2008). A formação das três pontes dissulfeto presentes em PalB é dificultada no ambiente citoplasmático da *E. coli*, uma vez que as reações de redução que acontecem nesse meio, mantém as proteínas num estado reduzido e essas pontes são responsáveis pela conformação funcional da PalB (UPPENBERG *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 2006; LARSEN, BORNSCHEUER & HULT, 2008). Para permitir a correta formação destas pontes dissulfeto é necessário direcionar esta enzima para o espaço periplasmático (BLANK *et al.*, 2006). No periplasma

essas pontes são catalisadas por oxidoredutases tiol-disulfeto conhecidas como proteínas Dsb (DsbA e DsbC) (KADOKURA *et al.*, 2004) .

#### 6.4 PATENTE 1: “PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ÚNICO PASSO”

Visto que o processo de purificação de proteínas é dispendioso, neste trabalho foi produzida uma patente que possui o objetivo de reduzir os custos desse processo. Para isso, a purificação e a imobilização da proteína se dá em uma única etapa. A patente Processo para purificação e imobilização de proteínas em única passo foi submetida ao Núcleo de Inovação Tecnologia (NIT) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e possui número SIAD - UFBA: 23066.021706/14-42. A referida patente está apresentada em sua íntegra nos resultados subsequentes.

**“PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS  
RECOMBINANTES EM ÚNICO PASSO”**

**RESUMO**

001. A presente invenção fornece um processo para imobilização e purificação concomitantes de proteínas recombinantes. O referido processo se presta a minimizar as etapas de preparação de proteínas imobilizadas para uso industrial fazendo uso da tecnologia de adição, por engenharia genética, de um segmento peptídico contendo uma série de resíduos do aminoácido histidina a um ou mais domínios terminais da cadeia polipeptídica da referida proteína. Desta forma, a presente invenção tira proveito da afinidade do referido segmento peptídico por cátions divalentes, para fazer com que a proteína se ligue especificamente a uma resina insolúvel, ligada com os referidos cátions, que servirá de suporte para a imobilização da proteína. Devido ao fato da interação entre o segmento peptídico com o referido suporte ser específica, outras proteínas podem ser retiradas por lavagem, filtração ou técnicas de separação similares. Desta forma, a presente invenção possibilita a purificação da proteína de interesse em passo concomitante a sua imobilização no referido suporte. A presente invenção polpa, assim, passos preparativos quando comparado aos processos existentes no estado da técnica, nos quais a purificação é feita em um passo e a imobilização da proteína purificada em um passo adicional. Desta forma, a presente invenção reivindica a diminuição dos custos de preparação de proteínas imobilizadas, pela redução do número de processos necessários para a referida preparação, para os mais diversos fins industriais, incluindo, mas não restrito à: produção

2/2

catalisadores enzimáticos, de antígenos e anticorpos imobilizados, de sistemas de entrega de drogas e receptores, etc.



**“PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ÚNICO PASSO”**

**Campo da Invenção**

**001.** A presente invenção se refere ao um processo de purificação e imobilização de proteínas recombinantes em um único passo processual ou reacional. O referido processo permite que a referida proteína seja imobilizada em um suporte macroscópico insolúvel diretamente do caldo de fermentação para a produção, sem necessidade de purificação prévia. Mais especificamente, a presente invenção envolve o uso de um segmento peptídico formado por resíduos do aminoácido histidina, associada por técnicas de Biologia Molecular e Engenharia Genética a uma ou mais extremidade da cadeia polipeptídica de uma proteína. Embora a presente invenção possa ser aplicada a qualquer proteína, ela trata mais especificamente da aplicação em polipeptídios com atividade enzimática. Esta invenção envolve, ainda, o uso da referida enzima imobilizada como catalisador heterogêneo em, mas não restrito a, processos industriais que utilizem catalisadores enzimáticos heterogêneos.

**Fundamentos da Invenção**

**002.** O interesse em torno dos processos de imobilização e produção de biocatalisadores tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Relativamente comum no mercado industrial, o uso de enzimas abrange diversos setores, entre esses, alimentício, de detergentes, biodiesel e especialidades químicas (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006; FARIA, 2010; MENDES et al., 2011; MESSIAS et al., 2011).

2/11

- 003.** Grande parcela do mercado industrial ainda está direcionada para o emprego de catalisadores químicos. No entanto, muitas são as limitações encontradas neste processo industrial. Diferentemente das enzimas, os catalisadores químicos são pouco versáteis, exigem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reações, possuem baixa especificidade e geralmente fornecem produtos de composição química mista ou contaminados. (CASTRO, OLIVEIRA e SOARES, 1997; MENDES et al., 2011; FIAMETTI, 2012). Fáceis de controlar e eficientes energeticamente, o uso tecnológico das enzimas é vantajoso por uma série de propriedades que as tornam altamente requisitadas como catalisadores: obtenção de produtos altamente puros; alta eficiência catalítica; condições brandas de temperatura e pressão atmosférica; alta taxa de seletividade e especificidade (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004; DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004; SOUZA, 2010; BORTOLAZZO, 2011; COLEN, 2006; SILVA, 2012), além de redução no consumo de energia e da extensão da degradação térmica (HOUDE, KADEMI e LEBLANC, 2004; HASAN, SHAH e HAMEED, 2006).
- 004.** A imobilização é uma técnica que consiste em manter as características físicas do suporte retendo a atividade biológica da enzima na sua forma solúvel. O complexo enzima-suporte permite a condução de reações em reatores contínuos, facilitando a separação do catalisador-produto e proporcionando o aumento da produtividade dos processos, com uma redução dos custos (CASTRO et al., 2008; MENDES et al., 2011).
- 005.** Os processos de imobilização ainda encontram barreiras em seu uso industrial e isso se deve principalmente ao custo de produção e purificação da enzima, custo dos suportes e reagentes, baixa eficiência dos métodos de

3/11

imobilização e baixa estabilidade operacional da enzima imobilizada. Para viabilizar o uso industrial é necessário otimizar parâmetros como o custo da imobilização com a aquisição de suportes mais resistentes e baratos e tornar a enzima operacionalmente e funcionalmente mais estável (CASTRO et al., 2008).

**006.** A presente invenção traz uma tecnologia inovadora que associa processos de purificação de enzimas recombinantes para proporcionar a imobilização das mesmas no mesmo passo processual ou reacional. Desta forma, a mesma tecnologia, baseada na afinidade do segmento peptídico formado por resíduos do aminoácido histidina por cátions divalentes pode ser utilizada para purificação e, simultaneamente, imobilização da enzima recombinante no mesmo suporte insolúvel. Desta forma, passos processuais, reagentes e tempo são economizados, fazendo com que a produção do catalisador possa ser mais rápida e menos onerosa.

#### **Técnicas relacionadas**

**007.** Diversas patentes relacionadas à purificação e imobilização de enzimas podem ser encontradas nos bancos de patentes. No entanto, a grande maioria trata dos processos separadamente ou, ainda, de somente um dos dois processos voltados para uma certa enzima ou um certo processo. Entre as patentes mais relevantes para o entendimento e reprodução da presente invenção, destacamos as que utilizam suportes da família Amberlite para purificação de proteínas, embora nenhuma delas utilize a capacidade dessas resinas de se ligar a NiII ou CoII e se ligar especificamente à proteínas recombinantes expressas com cauda de hexa-histidina. A patente CN103589706 envolve o uso de Amberlite IRC-50 como coluna de troca catiônica para purificação de Natokinase. Este processo

4/11

não está relacionado com a presente invenção e se aplica exclusivamente a esta enzima. De modo semelhante, a patente JPS63177785 envolve o uso de Amberlite CG-50 e IRC-50 para purificação da enzima isocitrato desidrogenase. A patente GB2293824, envolve o uso de Amberlite IRA-420 para purificação de hialuronidase e a patente GB938115 envolve o uso de vários tipos de Amberlite como colunas de troca catiônica para purificação de toxinas. Nenhuma das referidas patentes faz uso de processos específicos para proteínas recombinantes, sendo apenas um meio de separação por troca catiônica. A presente invenção traz, em relação às referidas patentes a possibilidade de purificação de, virtualmente, qualquer proteína recombinante.

**008.** As patentes KR870001148, JPS5685298, JPS637788 envolvem o uso de catalisadores enzimáticos imobilizados em resinas da família Amberlite. O processo de imobilização em Amberlite é bastante conhecido e utilizado. No entanto, o material de partida é, em todos os casos, a proteína já purificada. A presente invenção traz como vantagem em relação a todos os processos apresentados, o fato de que a purificação e a imobilização da proteína é feita em um passo único, o material de partida pode ser uma mistura de proteínas contida no caldo de crescimento ou no lisado de células do organismo produtor da proteína e o produto – catalisador heterogêneo - estar pronto para uso, purificado e imobilizado em um suporte macroscópico insolúvel.

#### **Descrição detalhada da invenção**

**009.** Estratégias de purificação e imobilização em um passo único foram desenvolvidas e testadas. Estas estratégias baseiam-se na modificação de resinas específicas para a adsorção seletiva das proteínas recombinantes através das

5/11

propriedades quelantes da cauda de hexahistidina introduzidas na proteína recombinante. Para tal propósito, resinas acrílicas e matrizes queladoras de  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  foram utilizadas. Desta forma, pretendeu-se não apenas acelerar o processo de purificação, mas também, permitir a viabilização econômica das lipases através da diminuição dos custos de produção destes catalisadores.

**0010.** Diversas combinações de suportes macroscópicos insolúveis podem ser utilizadas com a tecnologia descrita na presente invenção. A presente invenção pode ser representada, mas não está restrita a, pelo seguinte exemplo do melhor modo da invenção:

1. Preparação dos Suportes contendo Resinas do Grupo Amberlite:
2. As resinas do grupo Amberlite selecionadas para o exemplo foram: IRC748, 200C, IRN77. O suporte foi montado tendo como base a técnica de coluna com fluxo gravitacional onde colunas foram carregadas com 1g a 5g das resinas. A preparação da seringa foi realizada com a colocação de filtro na saída da coluna com o intuito de evitar o vazamento da resina durante o seu uso. Depois, uma quantidade em peso conhecido da resina foi adicionado à coluna. Em seguida, as colunas contendo as resinas foram lavadas com  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada ou Tampão Tris-HCl (pH=7.0) até atingirem o pH neutro.
3. Ligação de íons e proteína inespecífica ao Suporte com Resinas do Grupo Amberlite:

**0011.** Para a ligação dos íons, soluções contendo 400mM  $\text{NiSO}_4$  e/ou  $\text{CoSO}_4$  em água deionizada, ou no referido tampão Tris-HCl (pH7.0), foram adicionadas nas colunas e monitoradas por espectrofotometria quanto a adsorção do eluente a 722nm para NiII e 510nm para COII. Para avaliação de ligação de proteínas, foi

6/11

utilizado o método de Bradford (1976) onde foi dosada a quantidade de proteínas presentes no eluente. Adicionalmente, eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) foi utilizado para avaliar o perfil de eluição de proteínas da coluna. Para avaliação da ligação inespecífica à proteínas, soluções com 0,5mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) e/ou ovoalbumina de galinha foram preparadas. Baixa ligação de proteína inespecífica é desejável para o bom funcionamento da presente invenção.

#### 4. Purificação e Imobilização enzimática em passo único

**0012.** A presente invenção pode ser sumarizada, embora não restrita a, nos passos processuais a seguir que estão esquematizados, ainda, na Figura 1.

- A. Carregamento da coluna com a resina macroscópica insolúvel. Exemplo: Amberlite ARN77;
- B. Lavagem da resina com solução em composição e volume apropriados. Exemplos: água destilada ou tampão pH7;
- C. Carregamento da coluna com solução contendo o cátion divalente a ser utilizado, mais especificamente Níquel (NiII) ou Cobalto (CoII). Exemplo: solução concentrada de Sulfato de Níquel ou Sulfato de Cobalto;
- D. Lavagem da resina com solução em composição e volume apropriados. Ex: água destilada ou tampão pH7;
- E. Carregamento da coluna com o caldo de crescimento contendo a mistura de proteínas na qual a proteína de interesse, recombinante e adicionada do segmento peptídico formado por resíduos de histidina está associado;

7/11

- F. Lavagem da coluna com solução em composição e volumes apropriados à retirada das proteínas não desejáveis (inespecíficas). Exemplo: água destilada, tampão pH7 ou solução diluída de imidazol.

#### **Breve descrição das Figuras**

**0013.** Para melhor ilustração do processo envolvido na presente invenção, a Figura 1 mostra um esquema representando, embora não restrito a, o melhor modo de produção do catalisador pela tecnologia de purificação e imobilização em passo único:

- I. Coluna com filtro (f) para impedir a passagem do suporte macroscópico insolúvel. O suporte (R) é adicionado, sendo empacotado no interior da coluna;
- II. Adição de um volume necessário de uma solução de equilíbrio e lavagem (S);
- III. Adição de um volume necessário de uma solução contendo o cátion divalente a ser impregnado no suporte. O excedente de cátion elui através da coluna (c);
- IV. Adição de um volume necessário da solução S para remoção do excesso do cátion divalente, que elui através da coluna (s);
- V. Adição da mistura de proteínas contendo a proteína recombinante adicionada do segmento peptídico contendo resíduos de histidina. As proteínas contaminantes eluem da coluna (p);

8/11

- VI. Adição de um volume necessário de uma solução de lavagem para remoção das proteínas contaminantes. As proteínas contaminantes eluem da coluna (p);
- VII. Coluna empacotada com o catalisador heterogêneo formado pelo suporte macroscópico insolúvel, ligado ao cátion divalente e à proteínas de interesse purificada e imobilizada. Biocatalisador heterogêneo pronto para uso.



9/11

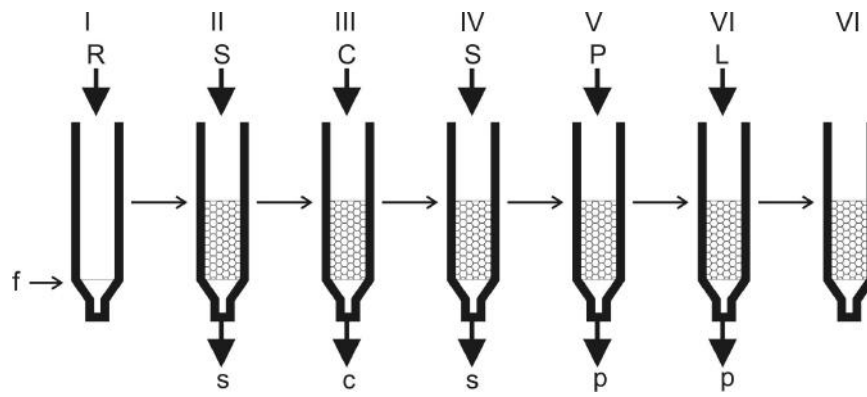
**Figuras**

Figura 1: Desenho esquemático do processo envolvido na presente invenção:

**Referências Bibliográficas**

- BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e Seleção de Fungos Celulolíticos para Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- CASTRO, H.F.; ZANIN, G. M.; DE MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA P. Enzimas em Biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado - **Imobilização e Estabilização de Enzimas**, Cap. 6. In: BON, P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.; VERMELHO, A.L.; PAIVA, C.L.A.; ALENCASTRO, R.B.; COELHO, R.R.R. (Org.). 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. v. 1. 506 p.
- CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. M. F. Síntese de ésteres terpenóides por via enzimática: influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. **Ciência Technol. Aliment.** v. 17, n.3, dez. 1997.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, fev. 2004.
- COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, vol.27, n.4, p. 623-630, ago. 2004.
- FARIA, L.A. de. **Hidrólise do Óleo da Amêndoa da Macaúba com Lipase Extracelular de *Colletotrichum gloeosporioides* Produzida por Fermentação em Substrato Líquido**. 2010. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- FIAMETTI, K.G. **Desenvolvimento de Técnicas Alternativas de Fluidos Pressurizados e Ultrassom para Produção de Monoglicerídeos e Diglicerídeos a partir da Reação de Glicerólise Enzimática de Óleo de Oliva**. 2012. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.
- HASAN, F.; SHAH A. A.; HAMEED A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their Industrial Applications: An Overview. **Applied Biochemistry and Biotechnololy**. v. 118, n. 1-3, p. 155-170. 2004.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. de; CASTRO, H. F. de.; GIORDANO, R. de L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**. v. 34, n. 5, p. 831-840, jul. 2011.

11/11

- MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.
- SILVA, M. L. **Obtenção de Derivados Químicos de Produtos Naturais Empregando Catálise Convencional e Enzimática**. 2012. 202 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.
- SOUZA, L. T. A. **Síntese enzimática do biodiesel de *Jatropha curcas* pela rota etílica**. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

1/2

**“PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS  
RECOMBINANTES EM ÚNICO PASSO”**

**REIVINDICAÇÕES**

001. PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ÚNICO PASSO **caracterizado por**

- a) Produzir proteínas em grau de pureza suficiente que permita seu uso prático;
- b) Produzir proteínas imobilizadas em suporte macroscópico insolúvel;

002. PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ÚNICO PASSO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** os referidos processos de purificação e imobilização sejam realizados em um único passo processual;

003. PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ÚNICO PASSO, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** a referida proteína ser obtida de fonte recombinante;

004. PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ÚNICO PASSO, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** a referida proteína ser adicionada, em pelo menos uma de suas extremidades terminais, de uma cadeia polipeptídica contendo de seis a dez resíduos do aminoácido histidina;

005. PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ÚNICO PASSO, de acordo com a

2/2

reivindicação 1, **caracterizado por** o referido suporte macroscópico insolúvel se ligar a um íon metálico divalente;

006. PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ÚNICO PASSO, de acordo com a reivindicação 1 e 5, **caracterizado por** o referido íon metálico divalente ser Níquel;

007. PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ÚNICO PASSO, de acordo com a reivindicação 1 e 5, **caracterizado por** o referido íon metálico divalente ser Cobalto;

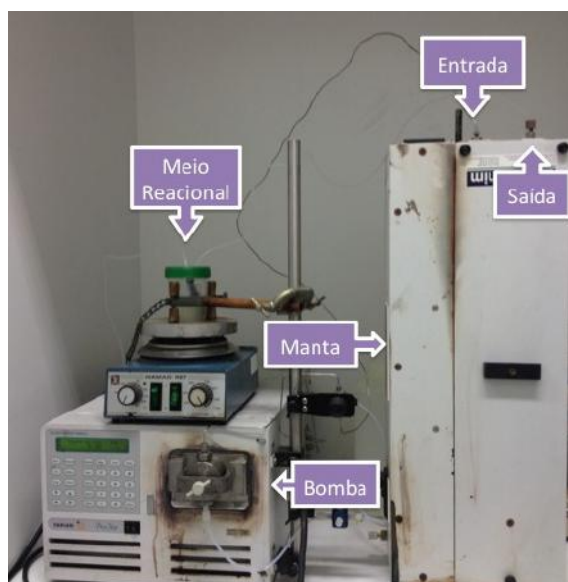
008. PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ÚNICO PASSO, de acordo com a reivindicação 1 e 2, **caracterizado por** envolver as seguintes etapas: expressão heteróloga da referida proteína em um organismo recombinante por fermentação submersa; separação do caldo contendo a referida proteína da biomassa celular; carregamento do referido suporte macroscópico insolúvel com o referido íon metálico; carregamento do referido suporte macroscópico contendo o referido íon metálico com o referido caldo contendo a proteína; lavagem com solução própria para remoção de proteínas contaminantes.

009. PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ÚNICO PASSO, de acordo com a reivindicação 1 e 2, **caracterizado por** o referido suporte, contendo o referido íon metálico e a proteína sejam utilizados como catalisadores em processos industriais;

## 6.5 CATÁLISE CONTÍNUA DE BIODIESEL EM LEITO FIXO POR NOVOZYME 435

A produção de biodiesel (Figura 21) foi feita pela reação de metanólise do óleo de canola catalisada por lipase imobilizada de *Candida antarctica* (Novozyme 435). Novozyme 435 foi usada como modelo para o reator de leito fixo. A reação foi analisada por CCD, através de amostras retiradas em cada etapa da reação (0, 15, 24, 41 h) (como descrito em Métodos). O *t*-butanol foi utilizado como co-solvente para evitar a inibição da enzima pelo excesso de metanol ou pelo glicerol formado (ROYON, *et al.*, 2007). Na Tabela 5 mostra as condições ideais utilizadas para este experimento.

**Figura 21** - Reator de leito fixo utilizado para a produção enzimática de biodiesel



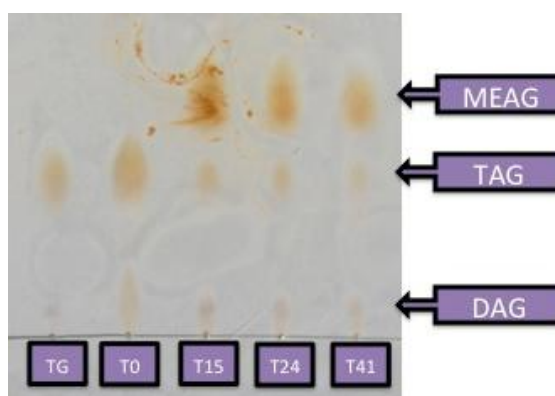
O curso da reação foi acompanhado qualitativamente por CCD, para verificar a conversão do TAG em MEAG, pelo aparecimento dos produtos e desaparecimento dos reagentes.

**Tabela 5** - Parâmetros da produção enzimática de biodiesel em reator de leito fixo

Parâmetro	Condição
<b>Enzima</b>	Novozym 435
<b>Solvente</b>	<i>tert</i> -butanol
<b>Razão molar solvente / óleo</b>	1:1
<b>Razão molar metanol / óleo</b>	6:1
<b>Temperatura</b>	60°C

A Figura 22 mostra uma CCD da metanólise do óleo de canola obtido após 41h de transesterificação enzimática a 60°C. As setas indicam as posições relativas das manchas de DAG, TAG e MEAG. Foi confirmada a conversão dos TAG em MEAG. A amostra retirada no tempo de 0 hora corresponde ao TAG de óleo de canola. Ao longo da reação, a mancha de TAG foi ficando cada vez menor, uma vez que este estava sendo transesterificado em MEAG. Percebe-se que os TAG apresentaram uma polaridade maior que os MEAG, devido principalmente, a contribuição dos três grupos acilas presentes em sua estrutura. Os MEAG mostram-se presentes nas amostras que foram retiradas nos tempos 15, 24 e 41h respectivamente. Essa análise qualitativa permitiu avaliar o andamento da reação.

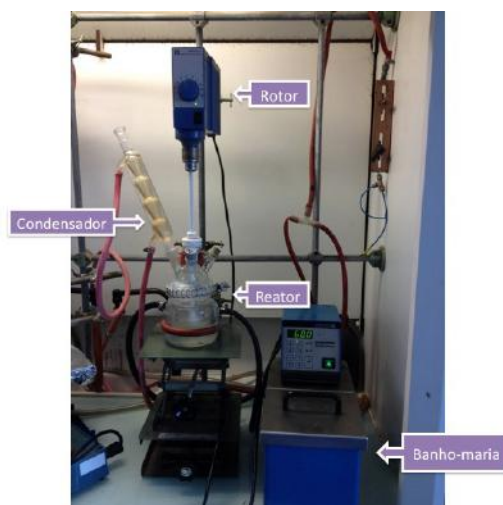
**Figura 22** - Acompanhamento da produção enzimática de Biodiesel em leito fixo por cromatografia de camada delgada. Reação foi executada a 60 °C com metanol, com pressão de 8 bar e débito de 0,1 mL/min. Amostras foram retiradas nos tempos 0 (TG), 15h, 24h e 41h. As setas indicam as posições relativas das manchas de DAG, TAG e MEAG.



Este estudo foi usado como modelo para estabelecer parâmetros para futura produção utilizando as enzimas mutantes e selvagem produzidas e imobilizadas em laboratório.

## 6.6 PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR CALB COMERCIAL RETICULADA

A Figura 23 mostra o reator usado na produção de biodiesel pela reação de metanólise do óleo de canola catalisada por lipase B de *Candida antarctica* reticulada. A reação foi analisada por CCD, através de amostras retiradas em duas etapas da reação (0, 15h). *t*-Butanol foi utilizado como co-solvente (ROYON, *et al.*, 2007). Na Tabela 6 mostra as condições ideais utilizadas para este experimento.

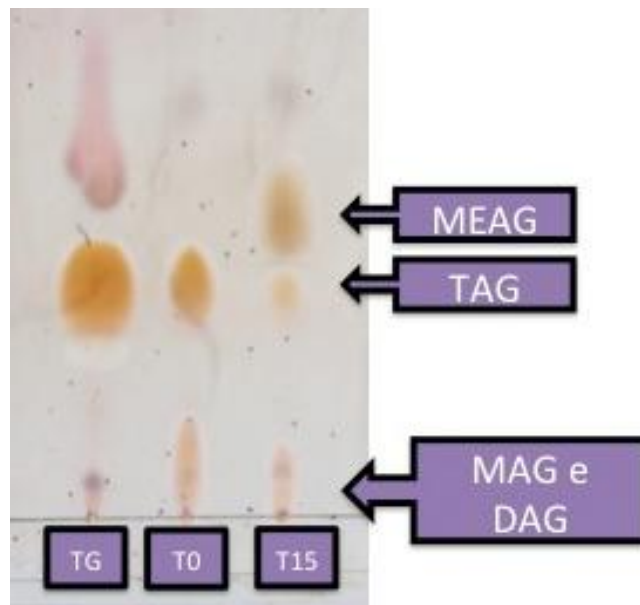
**Figura 23** - Reator utilizado para a produção enzimática de biodiesel**Tabela 6** - Parâmetros da produção enzimática de biodiesel com enzima reticulada

Parâmetro	Condição
Enzima	CalB reticulada
Solvente	<i>tert</i> -butanol
Razão molar solvente / óleo	1:1
Razão molar metanol / óleo	6:1
Temperatura	60°C

Este experimento foi feito para verificar a adaptação da lipase reticulada no meio reacional de produção, se ela poderia ser inativada de alguma forma. Amostras foram retiradas nos tempos 0 (TG) e 15h (Figura 24). As setas indicam as posições relativas das manchas de MAG, DAG, TAG e MEAG. Observa-se uma mancha acima do TG o que indica uma impureza do óleo de canola usado. De acordo com a CCD (Figura 24), em 15 h de reação a maior parte dos triglicerídeos já haviam sido convertidos em MEAG.



**Figura 24** - Acompanhamento da produção enzimática de Biodiesel em leito fixo por cromatografia de camada delgada. Reação foi executada a 60 °C com metanol



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresentou uma eficiente expressão heteróloga de CalB em *E. coli*. Este sucesso foi obtido por modificações na estrutura genética do vetor, capacitando-o para fazer modificações pós-traducionais, principalmente as três pontes dissulfetos necessárias para o correto enovelamento da lipase B. Além da expressão, as etapas de purificação da lipase foram exaustivamente repetidas em laboratório, o que gerou a produção da patente supracitada.

A patente "Processo para purificação e imobilização de proteínas recombinantes em único passo" abordou uma nova tecnologia que será muito útil principalmente para produção de novos catalizadores mais competitivos. É sabido que purificação de enzimas é um processo oneroso e na indústria de biodiesel é interessante um processo que faz este produto competitivo ao diesel de petróleo. Esta metodologia dispensa etapas dispendiosas de purificação, o que vai garantir a viabilidade do processo em nível industrial. Futuramente a continuidade desta pesquisa é utilizar as enzimas imobilizadas para comparar com um estudo cinético de produção de biodiesel com a enzima comercial mais usada que é a Novozyme 435.

Foi feita a produção de biodiesel com a Novozyme 435 em reator de leito fixo em pesquisa na França. Alguns parâmetros encontrados nesta produção não foram completamente mostrados. Estes parâmetros serão criteriosamente detalhados futuramente como fonte de dados e modelo de comparação com catalisadores próprios que já estão sendo desenvolvidos em laboratório.

O uso de enzimas reticuladas é uma ideia inovadora e que vai desvendar uma nova tecnologia talvez ainda mais rentável de imobilização de enzimas em resinas de baixo custo. Uma reação que utiliza-se agentes aglutinantes de enzimas, não é preciso de resinas para a fixação. Isso seria ideal se realmente for garantida a estabilidade da enzima. De toda forma, foi obtida produção conforme CCD em 15 h de reação, um tempo razoável em comparação com a enzima em seu estado imobilizado.

Este estudo fechou um ciclo na pesquisa desde a expressão heteróloga de lipase em *E. coli* até a purificação da enzima. Todavia adquiriu-se novas ideias para o processo de imobilização e ainda purificação. Ideias estas que já estão sendo colocadas em pauta para a continuação da pesquisa.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, A. K. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion. Science*. v. 33, p. 233–271, 2007.

AL-ZUHAIR, S. Production of Biodiesel by Lipase-Catalyzed Transesterification of Vegetable Oils: A kinetics study. *Biotechnol. Prog*, v. 21, p. 1442-1448, 2005.

ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V.; GUZZO, J.; BARATTI, J. Molecular characterization of gene encoding an esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases. *Biotechnology Letters*, v.21, p. 313-319, 1999.

ANASTAS, P. T.; WILLIAMSON, T. C. Green Chemistry: An Overview. *Green Chemistry*, Chapter 1, p. 1-17, 1996. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bk-1996-0626.ch001>> Acesso em: 30 abr. 2012.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chemical Society Reviews*, v. 39, p. 301-312, 2010.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **O biodiesel obrigatório, 2010.** Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=17680&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1267481272429>>. Acesso em: 18 fev. 2012.

ANVISA. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 482 de 23 de setembro de 1999.** Secretaria de Vigilância Sanitária, Brasília, 1999. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm)>. Acesso em: 15 fev. 2012.

APROBIO (Associação dos Produtores de Biodiesel do Brasil). **Informações Técnicas – Ganhos ambientais.** Disponível em: <<http://www.aprobio.com.br/informacoes.html>>. Acesso em: 30 abr. 2012.

ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; ABDUL AZIZ, A. R.; SULAIMAN, N. M. N. Production of biodiesel using high free fatty acid feedstocks. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 3275-3285, 2012.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente.** Porto Alegre: Bookman, 2001.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, v.18, n. 6, p.392-416, 1996.

BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of Enzymes and Cells. **New Jersey: Human Press.**, 1997. cap. 1, p. 1-11.

BLANK, K.; MORFILL, J.; GUMPP, H.; GAUB, H. E. Functional expression. of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, v. 125, p. 474-483, 2006.

BRASIL – **Biocombustíveis.** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/sobre/economia/energia/matriz-energetica/biocombustiveis>>. Acesso em: 30 abr. 2012.

BRASIL. **Governo aumenta percentual de biodiesel no óleo diesel (2014).** Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2014/05/governo-aumenta-porcentagem-de-biodiesel-no-diesel>>. Publicado em: 28 mai. 2014. Atualizado em: 30 jul. 2014. Acesso em: 26 nov. 2015.

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Diário Oficial da União.** Brasília, 14 jan. 2005. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm)>. Acesso em: 18 fev. 2012.

BRASIL. Resolução do CNPE nº 6, de 16 setembro 2009. Estabelece em cinco por cento, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, de acordo com o disposto no art. 2º da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. **Diário Oficial da União.** Brasília, 26 out. 2009. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder\\_resolucoes/resolucoes\\_cnpe/2009/rcnpe%206%20-%202009.xml?f=templates\\$fn=document-frame.htm\\$3.0\\$g=\\$x=\\$nc=4231](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder_resolucoes/resolucoes_cnpe/2009/rcnpe%206%20-%202009.xml?f=templates$fn=document-frame.htm$3.0$g=$x=$nc=4231)>. Acesso em: 18 fev. 2012.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU M. T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases, **Química Nova**. v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CHEN, J.; WU, W. Regeneration of Immobilized *Candida antarctica* Lipase for Transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 5, p. 466-469, jan. 2003.

CHIBATA, I. Immobilized Enzymes – Research and Development. **New York: John Wiley & Sons**, p. 71, 1978.

COPPE – UFRJ: **Brasil e China debatem captura de carbono e biocombustível.** Disponível em: <<http://www.planeta.coppe.ufrj.br/artigo.php?artigo=1239>> Acesso em: 1 dez. 2011.

CVENGROS, J.; CVENGROSOVÁ, Z. Quality Control of Rapeseed Oil Methyl Esters by Determination of Acyl Conversion. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 12, p.1349-1352, dez. 1994.

DALL'AGNOL, AMÉLIO, 2007. **Porque fazemos biodiesel de soja**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/colunistas/convidado/porque-fazemos-biodiesel-de-soja.htm>>. Acesso em: 31 mai. 2012.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V.; Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova**, v. 27, nº 4, p. 623-630, 2004.

DEMIRBAS, A. Biodiesel : a realistic fuel alternative for diesel engines. **Springer - Verlag London Limited**: p. 208, 2008.

DONG, L.; GE, C.; QIN, P.; CHEN, Y.; XU, Q. Immobilization and catalytic properties of *candida lipolytic lipase* on surface of organic intercalated and modified MgAl-LDHs. **Solid State Sciences**, v. 31, p. 8-15, 2014.

DUBOIS, V.; BRETON, S.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. **European Journal of Lipid Science Technology**, 109, p. 710-732, 2007.

EREC (European Renewable Energy Council). Renewable Energy Scenario by 2040, EREC Statistics, **Brussels**, 2006.

European Patent Office – EPO: banco de dados de patentes. Disponível em: <[http://ep.espacenet.com/?locale=en\\_EP](http://ep.espacenet.com/?locale=en_EP)> Acesso em: 25 abr. 2012.

EWEA (European Wind Energy Association). Report: Large scale integration of wind energy in the European power supply: analysis, issues and recommendations, **Brussels**, 2005.

FERRÃO-GONZALES, A. D.; VÉRAS, I. C.; SILVA, F. A. L.; ALVAREZ, H. M.; MOREAU, V. H. **Fuel Processing Technology**, v. 92, p. 1007-1011, 2011.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298-1315, 2009.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. Transesterification kinetics of soybean oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 63, n. 10, p. 1375-1380, 1986.

FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 10, p. 1638-1643, 1984.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p.405-416, set. 2001.

GOLDEMBERG, J.; JOHANSSON, T.B. **World Energy Assessment: Overview, 2004 Update**. United Nations Development Programme, New York, p. 26, 2004. Disponível em: <<http://www.energyandenvironment.undp.org/undp/indexAction.cfm?module=Library&action=GetFile&DocumentAttachmentID=1010>> Acesso em: 18 ago. 2011.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 763–781, 2004.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; FUKUMIZU, T.; MIURA, K.; YAMAJI, H.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 328-333, 2006.

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

HOBDEN, R. Commercializing Enzymatic Biodiesel Production. **Biodiesel Magazine**. Disponível em: <<http://www.biodieselmagazine.com/articles/9481/commercializing-enzymatic-biodiesel-production>>. Publicado em: jan. 2014. Acesso em: nov. 2015.

HOEKAMAN, S. K.; ROBBINS, C. Review of the effects of biodiesel on NO<sub>x</sub> emissions. **Fuel Processing Technology**, v. 96, p. 237-249, 2012.

HUANG, J.; XIA, J.; JIANG, W.; LI, Y.; LI, J. Biodiesel production from microalgae oil catalyzed by a recombinant lipase. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 47-53, 2015.

IEA - **Emissions From Fuel Combustion Highlights**, International Energy Agency, Edition: 2010. Disponível em: <<http://www.iea.org/co2highlights/co2highlights.pdf>> Acesso em: 23 nov. 2011.

INPI – **China lidera patentes de biodiesel**. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/noticias/china-lidera-patentes-de-biodiesel>> Acesso em: 1 dez. 2011.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of Biodiesel Fuel from Triglycerides and Alcohol Using Immobilized Lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 53-58, jun. 2001.

IUBMB **Enzyme Nomenclature: Lipase**. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/1/1/3.html>>. Acesso em: 10 abr. 2011.

JAEGER, K-E., DIJKSTRA, B. W., REETZ, M. T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications os lipases. **Annual Review Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K-E.; EGGERT, T. Lipase for Biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p.390-397, 2002.

JAEGER, K-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

Jornal da Ciência: **Brasil e China debatem captura de carbono e biocombustível**. Disponível em: <<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detalhe.jsp?id=73091>> Acesso em: 1 dez. 2011.

JUNG, S.; PARK, S. Improving the expression. Yield of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli* by mutagenesis. **Biotechnol Lett**, v. 30, p. 717-722, 2008.

KADOKURA, H.; TIAN, H.; ZANDER, T.; BARDWELL, J. C. A.; BECKWITH, J. Snapshots of DsbA in Action: Detection of Proteins in the Process of Oxidative Folding. **Science**, v. 303, Issue 5657, p. 534-537.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 157-176, 2000.

KELEŞ, S.. Fossil Energy Sources, Climate Change, and Alternative Solutions. **Energy Sources Part A: Recovery, Utilization & Environmental Effects**, 2011, Vol. 33 Issue 12, p1184-1195, 12p

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Enzyme Immobilization. In **Biotechnology**. Enzyme Technology, ed. J. F. Kennedy, 1987, v. 7a, p. 347-404.

KIRK, O.; CHRISTENSEN, M. W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. **Organic Process Research & Development**, v. 6, n. 4, p. 446-451, 2002.

KNOTHE G.; GERPEN J. V.; KRAHL J. The Biodiesel Handbook. **AOCS Press, Champaign, Illinois**, p. 303, 2005.

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. Enzymatic transesterification of Jatropha oil. **Biotechnology for Biofuels**, 2009, 2:1. Disponível em: <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1/1>>. Acesso em: 17 jul. 2011.

LARSEN, M. W. **Expression of a lipase in prokaryote and eukaryote host systems allowing engineering**. 2009. 62 f., Doctoral Thesis. Royal Institute of Technology, School of Biotechnology, AlbaNova University Center, Stockholm, Sweden, 2009.

LARSEN, M. W.; BORNSCHEUER, U. T.; HULT, K. Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems. **Protein Expression and Purification**, v. 62, p. 90-97, 2008.

LEE, D. H.; KIM, J. M.; SHIN, H. Y.; KANG, S. W.; KIM, S. W. Biodiesel Production Using a Mixture of Immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* Lipases. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 11, n. 6, p. 522-525, 2006.

LEMAIRE, G.; FRANZLUEBBERS, A.; CARVALHO, P. C. F.; DEDIEU, B. Integrated crop–livestock systems: Strategies to achieve synergybetween agricultural production and environmental quality. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 190, p. 4-8, 2014.

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

LI, L.; DU, W.; LIU, D.; WANG, L.; LI, Z. Lipase-catalyzed Transesterification of Rapeseed Oils for Biodiesel Production with a Novel Organic Solvent as the Reaction Medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p.58-62, 2006.

LUTZ, S. Engineering lipase B from *Candida antarctica*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 2743-2748, 2004.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: A review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

MARTÍNEZ, L.; BORIN, I. A., SKAF, M. S. Fundamentos de Simulação por Dinâmica Molecular, Cap 12. MORGON, N. H.; COUTINHO, K. Métodos de química teórica e modelagem molecular. Editora Livraria da Física, São Paulo, p. 413-414, 2007.

MME - (a) Ministério de Minas e Energia. **Boletim Mensal de Energia**, (dezembro 2015). Disponível em: <[http://www.mme.gov.br/documents/10584/1143612/01+-+Boletim+Mensal+de+Energia+\(Dezembro+2015\)+\(PDF\)/342b3d97-96dc-4c80-95d8-b5ee4e96aea5;jsessionid=1D8E50815A6C9504DA3E655D66D5807C.srv155](http://www.mme.gov.br/documents/10584/1143612/01+-+Boletim+Mensal+de+Energia+(Dezembro+2015)+(PDF)/342b3d97-96dc-4c80-95d8-b5ee4e96aea5;jsessionid=1D8E50815A6C9504DA3E655D66D5807C.srv155)>. Acesso em: 12 abr. 2016.

MME - (b) Ministério de Minas e Energia. **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**, Edição 92, setembro de 2015. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/documents/1138769/1732004/Boletim+DCR+nº+92+-+setembro+de+2015.pdf/61e3e65a-bf34-4bd6-9f88-610cd42aaf74>>. Acesso em: 26 dez. 2015.

MME - Ministério de Minas e Energia. **Adição de 5% de biodiesel ao diesel é antecipada em três anos**. Disponível em: <[http://www.mme.gov.br/spg/noticias/destaque\\_foto/destaque\\_0010.html](http://www.mme.gov.br/spg/noticias/destaque_foto/destaque_0010.html)>. Acesso em: 18 fev. 2011. Atualizado: em 23 out. 2009.

MME – Ministério de Minas e Energia. **Balanco Energético Nacional, 2011** (ano base 2010). Disponível em: <[http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/publicacoes/BEN/2\\_-\\_BEN\\_-\\_Ano\\_Base/1\\_-\\_BEN\\_Portugues\\_-\\_Inglxs\\_-\\_Completo.pdf](http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/publicacoes/BEN/2_-_BEN_-_Ano_Base/1_-_BEN_Portugues_-_Inglxs_-_Completo.pdf)>. Acesso em: 30 abr. 2012.

MME - Ministério de Minas e Energia. **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**, Edição 97, março de 2016. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/documents/1138769/1732805/Boletim+DCR+nº+97+-+março+de+2016.pdf/5a4bf34c-4654-4fc7-8ead-751bb5f1641e>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

NAMBA, A. M. ; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n° 4, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/eq/v33n4/v33n4a02.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2012.

NATIONAL BIODIESEL BOARD. **Specification for Biodiesel (B100)** – ASTM D6751-08, nov. 2008. Disponível em: <[http://www.biodiesel.org/pdf\\_files/fuelfactsheets/BDSpec.pdf](http://www.biodiesel.org/pdf_files/fuelfactsheets/BDSpec.pdf)>. Acesso em: 10 abr. 2011.



NELSON, L. A.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 9, p. 1191-1195, 1996.

NOVAGEN MANUAL. pET System 11th Edition. USA, 2006.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S.M.; HAREL, M.; REMINGTON, S.J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J.L.; VERSCHUEREN, K.H.G.; GOLDMAN, A. The a/b hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, p. 197-211, 1992.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3-5, p. 187-204, 2000.

PANWAR, N. L.; KAUSHIK, S. C.; KOTHARI, S. Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 1513-1524, 2011.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de Látex Vegetais: Propriedades e Aplicações Industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PETERSEN, S. B. Em **Engineering of with lipases**; MALCATA, F. X., ed.; Kluwer Academic Publishers: The Netherlands, 1996, p. 125. Disponível em <<http://books.google.com.br/books?id=vHstQQfghvwC&lpq=PA51&ots=82HfKWp6GI&dq=Engineering%20of%20with%20lipases&pg=PA54#v=onepage&q=&f=false>>. Acesso em: 14 ago. 2011.

PETKAR, M.; LALI, A.; CAIMI, P.; DAMINATI, M. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 83-90, 2006.

PLANK, C.; LORBEER, E. Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 697, p. 461-468, 1995.

RAMOS, LUIS PEREIRA, 2006. **A Qualidade da Matéria-Prima para a Produção de Biodiesel - Parte 1 e 2**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/colunistas/ramos/qualidade-materia-prima-producao-biodiesel-2.htm>> <<http://www.biodieselbr.com/colunistas/ramos/qualidade-materia-prima-producao-biodiesel-1.htm>>. Acesso em: 31 mai. 2012

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An Overview of Enzymatic Production of Biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3975-3981, 2008.

RODRIGUES, C. R. Processos Modernos no Desenvolvimento de Fármacos: Modelagem Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n° 3, p.43-49, 2001. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/03/modelag.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 12.

ROTTICCI-MULDER, J. C.; GUSTAVSSON, M.; HOLMQUIST, M.; HULT, K.; MARTINELLE, M. Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* Lipase B and Lipase

B Fused to a Cellulose-Binding Domain. **Protein Expression and Purification**, v. 21, p. 386-392, 2001.

ROYON, D.; DAZ, D.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic Production of Biodiesel from Cotton Seed Oil Using *t*-butanol as a Solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 648-653, 2007.

RYAN, P.E.D. Biodiesel – A Primer. **National Center for Appropriate Technology (NCAT) Energy Specialist**. 2004. Disponível em: <<http://attra.ncat.org/attra-pub/PDF/biodiesel.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2011.

SAF/MDA – **Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel**. Disponível em: <[http://www.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/biodiesel/arquivos-2011/Biodiesel\\_Book\\_final\\_Low\\_Completo.pdf](http://www.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/biodiesel/arquivos-2011/Biodiesel_Book_final_Low_Completo.pdf)>. Acesso em: 30 abr. 2012

SALIS, A.; SVENSSON, I.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V.; ADLERCREUTZ, P. The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1646, p. 145-151, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v.1, p. 49-57, 2009. Disponível em: <<http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewArticle/13/33>>. Acesso em: 24 jun. 12.

SANTOS, H. F. O Conceito da Modelagem Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n°4, 2001. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/04/modelag.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2012.

SAXENA, R.K; GHOSH, P.K; GUPTA, R; DAVIDSON, W.S; BRADDOO, S; GULATI, R. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**, v. 77, p.101 - 115,1999.

SCHARMER, K. Alternative Fuels from Renewable Resources. **National Biodiesel Board**. Disponível em: <[http://www.biodiesel.org/resources/reportsdatabase/reports/gen/19990101\\_gen-189.pdf](http://www.biodiesel.org/resources/reportsdatabase/reports/gen/19990101_gen-189.pdf)>. Acesso em: 10 abr. 2011.

SEO, H.; KIM, S.; HAN, K.; OARK, J.; KIM, Y.; SIM, S. J.; LEE, J. Functional fusion mutante of *Candida antarctica* lipase B (CalB) expressed in *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 519-525, 2009.

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

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel Using

Immobilized *Candida antarctica* Lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 7, p.789-793, mar. 1999.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 133-142, 2002.

SILVA, T. H. A. Modelagem Molecular com o Auxílio do Computador. **Practical Studies for Medicinal Chemistry**. Chapter III.3 - Molecular Modeling, 2006. Disponível em <[http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/Practica-III-3.pdf](http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-III-3.pdf)>. Acesso em: 24 jun. 2012.

SOUZA, L. H.; SOMMER, P. S. As Enzimas Industriais na Produção de Alimentos: passado, presente e perspectivas futuras. **Jornal da ANBio**, Rio de Janeiro: Ano 2, n7, jul. 2002. Disponível em: <<http://www.anbio.org.br/jornais/jornal7/pag6e7.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2011.

TAFESH, A. Immobilized Enzyme Technology Enters Commercial Stage. **Biodiesel Magazine**. Disponível em: <<http://www.transbiodiesel.com/news-events/news-in-details/74-immobilized-enzyme-technology-enters-commercial-stage>>. Publicado em: dec. 2014. Acesso em: 25 nov. 2015.

TISCHER, W.; WEDEKING, F. Immobilized Enzymes: Methods and Applications. **Biocatalysis - From Discovery to Application**, v. 200, p. 95-126, 1999.

TOMBS, M. P. Enzymes in the processing of fat oils. In: TUCKER, G. A.; WOODS, L. F. J. (eds), **Enzymes in Food Processing**, 2nd. ed., London: Blackie Academic & Professional, p. 268-291, 1995. Disponível em: <[http://books.google.com.br/books?id=-4ZnMbryTqkC&pg=PA268&lpg=PA268&dq=TOMBS,+M.+P.+Enzymes+in+the+processing+of+fat+oils.&source=bl&ots=yULA\\_47lzi&sig=N3AIgwOk\\_PPb2zrlyUt6ASNuYrc&hl=pt-BR&ei=P4TfSoKeCc6m8AbEjI1g&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1&ved=0CAkQ6AEwAA#v=onepage&q=TOMBS%2C%20M.%20P.%20Enzymes%20in%20the%20processing%20of%20fat%20oils.&f=false](http://books.google.com.br/books?id=-4ZnMbryTqkC&pg=PA268&lpg=PA268&dq=TOMBS,+M.+P.+Enzymes+in+the+processing+of+fat+oils.&source=bl&ots=yULA_47lzi&sig=N3AIgwOk_PPb2zrlyUt6ASNuYrc&hl=pt-BR&ei=P4TfSoKeCc6m8AbEjI1g&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CAkQ6AEwAA#v=onepage&q=TOMBS%2C%20M.%20P.%20Enzymes%20in%20the%20processing%20of%20fat%20oils.&f=false)>. Acesso em: 17 ago. 2011.

TURKAN, A.; KALAY, S. Monitoring lipase-catalized methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Elucidation of the mechanisms of lipases. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, p. 34-44, 2006.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, Crystal structure determination and refinement of two Crystal forms of lipases B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, p. 293-308, 1994.

UPPENBERG, J.; OHRNER, N.; NORIN, M.; HULT, K.; KLEYWEGT, G. J.; PATKAR, S.; WAAGEN, V.; ANTHONSEN, T.; JONES, T. A. Crystallographic and Molecular-Modeling Studies of Lipase B from *Candida antarctica* Reveal a Stereospecificity Pocket form Secondary Alcohols. **Biochemistry**, v. 34, p. 16838-16851, 1995.

VÉRAS, I. C.; SILVA, F. A. L.; FERRÃO-GONZALES, D. A.; MOREAU, V. H. One-step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from high-acidity waste feedstocks in solvent-free media. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9653-9658, 2011.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n.1, p. 32-38, 1997.

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

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous Production of Biodiesel Fuel from Vegetable Oil Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 4, 2000.

XU, Y.Y; DU, W.; ZENG, J.; LIU, D.H. Conversion of Soybean Oil to Biodiesel Fuel Using Lipozyme TL IM in a Solvent-free Medium. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.22, n.1, p. 45-48, 2004.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reaction. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 438-450, 1998.

ZHANG, Y.; DUBÉ, M. A.; McLEAN, D. D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process desing and technological assessment. **Bioresource Technology**, v. 89, p.1-16, 2003.