



ISEL

**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA**

Produção enzimática de biodiesel a partir de resíduos agro-industriais usando a lipase imobilizada de origem microbiana

MARTA NEVES REBELO DE ALMEIDA
(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica

Orientador:

Doutor Amin Karmali

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Jaime Puna

Vogais:

Profª Doutora Sónia Martins

Profº. Doutor Amin Karmali

Junho de 2016

Agradecimentos

A realização deste trabalho foi possível devido à colaboração e ao apoio de várias pessoas às quais expresso o meu agradecimento.

Ao professor Doutor Amin Karmali, meu orientador e Coordenador do Centro de Investigação de Engenharia Química e Biotecnologia do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, pela orientação prestada e a disponibilidade.

Ao professor Doutor Jaime Puna pela disponibilização do biodiesel essencial para este trabalho e pela sua disponibilidade e pela disponibilidade do seu laboratório.

Ao professor Doutor José Prata pela disponibilização de placas de cromatografia de camada fina (TLC) muito utilizadas neste trabalho.

À professora Doutora Magda Semedo pela sua disponibilidade e paciência ao longo deste trabalho.

À empresa Novozymes pela oferta, ao ISEL, da lipase imobilizada geneticamente modificada muito utilizada neste trabalho.

À Adriana Rijo e à Faiza pela sua disponibilidade, pela amizade demonstrada e pela paciência ao longo deste trabalho.

Índice

| | |
|---|----|
| Resumo | 1 |
| Abstract..... | 3 |
| Lista de tabelas..... | 5 |
| Lista de figuras..... | 7 |
| Lista de abreviaturas..... | 11 |
| 1. Introdução..... | 13 |
| 1.1. Combustíveis fósseis..... | 13 |
| 1.2. Combustíveis derivados da biomassa | 13 |
| 1.3. Biodiesel | 14 |
| 1.4. Estratégia UE 2020..... | 15 |
| 1.5. Reacção de Transesterificação | 18 |
| 1.5.1. Vantagens e desvantagens da catálise ácida <i>versus</i> catálise básica | 20 |
| 1.5.2. Catalisadores enzimáticos..... | 21 |
| 1.4.3. Factores que afectam a reacção de transesterificação..... | 23 |
| 1.6. Lipase – Produção, caracterização e purificação | 24 |
| 1.6.1. Produção e caracterização de lipases de origem microbiana..... | 25 |
| 1.6.2. Métodos de doseamento de lipases | 29 |
| 1.6.3. Purificação de lipases de origem microbiana | 30 |
| 1.7. Imobilização da lipase..... | 32 |
| 1.8. Valorização do sub-produto (glicerol) para tornar o processo economicamente mais viável | 37 |
| 1.8. Uso de células intactas para produção de biodiesel | 39 |
| 1.9. Métodos de doseamento de biodiesel | 40 |
| 2. Materiais e Métodos..... | 43 |
| 2.1. Materiais | 43 |
| 2.1.2. Equipamento..... | 44 |
| 2.2. Métodos..... | 44 |
| 2.2.1. Cultivo e manutenção de estirpes bacterianas em meio de cultura sólido..... | 44 |
| 2.2.2. Produção de lipase a partir de estirpes bacterianas em meio de cultura líquido..... | 45 |
| 2.2.3. Produção da lipase em balões maiores de erlenmeyers a partir de estirpes bacterianas..... | 45 |
| 2.2.4. Crescimento e manutenção de estirpes fúngicas em meio de cultura sólido..... | 46 |
| 2.2.5. Produção de lipase a partir das estirpes fúngicas em meio de cultura líquido..... | 46 |
| 2.2.6. Doseamento da actividade enzimática da lipase..... | 47 |

| | |
|--|----|
| 2.2.7. Doseamento de proteína | 47 |
| 2.2.8. Planeamento experimental para otimização das condições de produção de lipase..... | 48 |
| 2.2.9. Preparação das matrizes cromatográficas de IMAC | 48 |
| 2.2.10. Comportamento cromatográfico das lipases das estirpes de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> e <i>L10</i> , <i>Phlebia rufa</i> (PM) e <i>Ganoderma lucidum violeto</i> (GV) em quelatos de metal imobilizados (IMAC)..... | 49 |
| 2.2.11. Purificação das lipases das estirpes mutantes de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> e <i>A13</i> | 49 |
| 2.2.12. Análise eletroforética por SDS e Page Nativa das lipases das estirpes <i>A13</i> e <i>Ph3B</i> de <i>P. aeruginosa</i> | 50 |
| 2.2.13. Imobilização da lipase | 50 |
| 2.2.14. Doseamento da actividade enzimática da lipase imobilizada em alginato de cálcio | 52 |
| 2.2.15. Doseamento da actividade enzimática da lipase imobilizada em glutaraldeído | 52 |
| 2.2.16. Produção enzimática de biodiesel catalisada pela lipase de <i>Pseudomonas aeruginosa Ph3B</i> | 52 |
| 2.2.17. Doseamento do biodiesel..... | 53 |
| 2.2.18. Doseamento do glicerol..... | 54 |
| 3. Resultados e discussão | 55 |
| 3.1. Produção de lipase a partir de estirpes bacterianas em meio de cultura líquido..... | 55 |
| 3.2. Produção da lipase em grande escala (balões de erlenmeyers) a partir de estirpes bacterianas..... | 59 |
| 3.3. Produção de lipase a partir de estirpes fúngicas em meio de cultura líquido..... | 64 |
| 3.3.1. Produção de lipase extracelular | 64 |
| 3.3.2. Produção de lipase intracelular | 68 |
| 3.4. Actividade enzimática na biomassa e nos sobrenadantes das culturas bacterianas e fúngicas..... | 73 |
| 3.5. Planeamento experimental para otimização das condições de produção de lipase..... | 74 |
| 3.6. Actividade enzimática da lipase imobilizada | 77 |
| 3.6.1. Lipase imobilizada em alginato de cálcio | 77 |
| 3.6.2. Lipase imobilizada em glutaraldeído | 79 |
| 3.7. Comportamento cromatográfico das lipases das estirpe <i>P. aeruginosa Ph3B</i> e <i>L10</i> , <i>Phlebia rufa</i> (PM) e <i>Ganoderma lucidum violeto</i> (GV) através de IMAC | 86 |
| 3.8. Purificação da lipase das estirpes <i>Ph3B</i> e <i>A13</i> de <i>P. aeruginosa</i> com o metal Cu(II) | 88 |

| | |
|---|-----|
| 3.9. Análise eletroforética por SDS e Page Nativa das lipases das estirpes <i>AI3</i> e <i>Ph3B</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 92 |
| 3.10. Produção enzimática de biodiesel catalisada pela lipase de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> | 95 |
| 3.10.1. Doseamento do biodiesel..... | 95 |
| 3.10.2. Doseamento do glicerol utilizando diferentes volumes de suspensão celular de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> , de lipase livre e de lipase comercial NS-88003 | 97 |
| 3.10.3. Doseamento do glicerol e do biodiesel utilizando diferentes volumes de suspensão celular de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> e de lipase comercial imobilizada NS-88002 e NS-88003..... | 98 |
| 3.10.4. Doseamento do glicerol e de biodiesel utilizando a lipase da estirpe <i>Ph3B</i> de <i>P. aeruginosa</i> imobilizada em 6 poços, diferentes volumes de suspensão celular de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> e de lipase comercial NS-88002 e NS-88003 | 101 |
| 3.10.5. Doseamento do glicerol e do biodiesel utilizando diferentes volumes de suspensão celular de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> e de lipase comercial NS-88002 e NS-88003 utilizando óleo usado com e sem aquecimento | 103 |
| 4. Conclusão..... | 107 |
| 5. Perspectivas futuras | 111 |
| 6. Referências bibliográficas | 113 |

Resumo

O presente trabalho teve como objectivo a optimização do cultivo de várias estirpes mutantes bacterianas *Pseudomonas aeruginosa* da estirpe *A13* (*P. aeruginosa* *A13*), estirpe *Ph3B* (*P. aeruginosa* *Ph3B*) e estirpe *L10* (*P. aeruginosa* *L10*) e fúngicas (*Phlebia rufa* (PM), *Ganoderma lucidum* *violeta* (GV), *Pleurotus ostreatus* (PO) e *Ganoderma carnosum* (G)), para a produção da lipase a partir de resíduos agro-industriais com vista à produção de biodiesel.

Em termos de optimização da produção da lipase de origem bacteriana, foi realizado um planeamento experimental organizado por um factorial completo de dois níveis em três factores, em duplicados, num total de oito experiências com o intuito de obter as melhores condições para a produção da lipase. Este planeamento foi concebido com dois níveis de temperatura (25°C e 37°C) e com dois níveis de meio de cultura (azeite e óleo usado) e de estirpe (*A13* e *Ph3B*) como variáveis categóricas. As melhores condições obtidas foram para o meio de cultura com azeite, a uma temperatura de 37°C e utilizando a estirpe mutante *Ph3B* de *P. aeruginosa*.

A actividade enzimática da lipase foi medida por espectrofotometria com base na hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) e o conteúdo de proteína no caldo de fermentação foi determinado pelo método de ligação do corante azul de Comassie.

Posteriormente, foi realizado um estudo para a seleção das matrizes cromatográficas e das condições para optimização da purificação da lipase por cromatografia de afinidade com metal immobilizado (IMAC). Este estudo foi realizado em microplacas de 96 poços com diferentes resinas, diferentes quelatos de metal e lipases de várias estirpes microbianas. Foi verificado que os quelatos de cobre possuem uma maior afinidade pelas lipases, promovendo a sua retenção na matriz cromatográfica.

De seguida, a lipase foi purificada por IMAC com diferentes resinas cromatográficas. A lipase da estirpe mutante *A13* de *P. aeruginosa* foi purificada

usando Sepharose 6B epoxi-activada com butanodiol-diglicidil éter- IDA-Cu (II), a pH 7 e com um gradiente de imidazole de 0 a 500 mM, obtendo-se uma actividade específica de 0.03 UI/mg, com um rendimento final de actividade de 69% e um factor de purificação de 1.25.

A mesma enzima foi purificada nas mesmas condições a pH 8, obtendo-se uma actividade específica de 0.0165 UI/mg, com um rendimento final de actividade de 265% e um factor de purificação de 2.66.

Procedeu-se a uma electroferese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e a uma electroferese em gel de poliacrilamida em condições nativas (PAGE Nativa) da lipase purificada da estirpe mutante *AI3* de *P. aeruginosa*, obtendo-se uma massa molar de 42 kDa através da SDS-PAGE. Pela PAGE Nativa não se obteve bandas no gel de poliacrilamida.

A lipase foi imobilizada em microplacas de 96 e de 24 poços com alginato de cálcio e com glutaraldeído (GA) tendo-se detectado actividade enzimática após a imobilização mas a sua perda de actividade enzimática foi significativa com o número de reutilizações.

A produção de biodiesel foi realizada através da reacção de transesterificação de azeite ou óleos usados utilizando metanol (MeOH) na presença de um catalisador enzimático. Realizou-se o doseamento do glicerol e do biodiesel obtendo-se valores muito reduzidos de ambos. Para o doseamento do biodiesel utilizaram-se placas de cromatografia em camada fina (TLC) pois os métodos de fluorescência e os métodos colorimétricos não funcionaram e a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC/MS) não estava disponível.

Relativamente aos resultados da TLC, verifica-se que se obtêm melhores resultados, na produção de biodiesel, utilizando a suspensão celular como catalisador (em vez de se utilizar lipase livre ou imobilizada) na reacção de transesterificação.

PALAVRAS-CHAVE: Biodiesel, estirpes mutantes de *Pseudomonas aeruginosa*, lipase EC 3.1.1.3, planeamento experimental, reacção de transesterificação e resíduos agro-industriais.

Abstract

This thesis aimed for the study of various bacterial and fungal mutant strains, *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain *A13* (*P. aeruginosa* *A13*), mutant strain *Ph3B* (*P. aeruginosa* *Ph3B*), mutant strain *L10* (*P. aeruginosa* *L10*), *Phlebia rufa* (PM), *Ganoderma lucidum violela* (GV), *Pleurotus ostreatus* (PO) and *Ganoderma carnosum* (G), respectively, for enzymatic biodiesel production from agro-industrial waste using immobilized lipase of microbial origin.

In terms of bacterial lipase production optimization, we planned a full factorial of two levels of three factors, in duplicate, in a total of eight experiments in order to understand what's the best culture medium for determined strain, and the best temperature. This plan was designed with two temperature levels (25°C and 37°C) and two levels of medium (oil and used oil) and strain (*A13* and *Ph3B*) as categorical variables. The best conditions were obtained with a culture medium with oil at a temperature of 37°C and using *P. aeruginosa* *A13*.

The enzymatic activity of the lipases was measured by spectrophotometry, based on the hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) producing *p*-nitrophenol and the protein assay in the fermentation broth was determined by protein assay methods with Coomassie blue.

Subsequently, a study was conducted for the selection of chromatographic matrix and the conditions for lipase purification optimization by affinity chromatography on immobilized metal (IMAC) in 96-well microplates. This study was performed with different resins, different metal chelates and lipases from various microbial strains. It was found that the copper chelate has a higher affinity for this lipases, promoting its retention on the chromatographic matrix. Then, the lipase was purified by IMAC in 5 ml columns with different chromatographic resins. Lipase *A13* mutant strain of *P. aeruginosa* was purified using the Sepharose 6B activated with epoxy-butenediol-diglycidyl ether- IDA-Cu (II), at pH 7 and with an imidazole gradient of 0 to 500 mM, yielding a

specific activity of 0.03 UI/mg with a final activity yield 69% and purification factor of 1.25. The same enzyme was purified in the same conditions at pH 8 to give a specific activity of 0.0165 UI/mg with a final yield of 265% activity, and a purification factor of 2.66.

It proceeded to a polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) and a polyacrylamide gel electrophoresis in native conditions (PAGE Native) with a purification lipase mutant strain A/3, yielding molecular mass of 42 kDa by SDS-PAGE. For Native PAGE we didn't obtained bands in the polyacrylamide gel.

Lipase was immobilized on microplate with 96wells and 24 wells with calcium alginate and glutaraldehyde (GA) having been detected a enzyme activity after the imobilization but its loss of activity is significantly with the number of reuses.

The biodiesel production was performed by transesterification reaction using oil or used oils using methanol (MeOH) in the presence of an enzyme catalyst. The glycerol and biodiesel assay showed that we produced a small amount of biodiesel. We used chromatography plates in a thin layer (TLC) for the determination of biodiesel. We didn't used difficult methods like gas chromatography with detection by mass spectrometry (GC / MS), fluorescence and colorimetric methods.

For the TLC, the best results are obtained using cell suspension as catalyst in the transesterification reaction (instead of using a free or immobilized lipase).

KEYWORDS: Agro-industrial waste, biodiesel, experimental design, lipase EC 3.1.1.3, *Pseudomonas aeruginosa* mutant strains and transesterification reaction.

Lista de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Metas da PNAER 2020 para a utilização de energias renováveis no consumo de energia..... | 17 |
| Tabela 2 - Catálise ácida <i>versus</i> catálise básica (Delatorre, A. <i>et al.</i> , 2011).... | 21 |
| Tabela 3 – Vantagens e desvantagens do processo enzimático em relação aos processos químicos com catálise homogénea | 22 |
| Tabela 4 - Diferenças entre o processo químico homogéneo e o processo enzimático (Aarthy, M., <i>et al.</i> , 2014 ; Z.Yaakob <i>et al.</i> , 2013)..... | 22 |
| Tabela 5 – Alguns factores que afectam a reação de transesterificação na produção do biodiesel (Guldhe, A., <i>et al.</i> , 2015) | 24 |
| Tabela 6 - Diversas reacções catalisadas pelas lipases (Sharma, S. e Kanwar, S., 2014)..... | 25 |
| Tabela 7 - Fontes de carbono e de azoto e indutores de lipases (Uscátegui, Y., <i>et al.</i> , 2012) | 26 |
| Tabela 8 - Microrganismos produtores de lipases (adaptado de Christopher, L. <i>et al.</i> , 2014 e Sharma, R. <i>et al.</i> , 2001)..... | 27 |
| Tabela 9 - Métodos de detecção de lipases (adaptado de Hasan, F. <i>et al.</i> , 2009) | 30 |
| Tabela 10 - Método de Imobilização – Adsorção (Knezevic, Z., <i>et al.</i> , 2004)... | 34 |
| Tabela 11 - Método de Imobilização - Ligação Covalente (Knezevic, Z., <i>et al.</i> , 2004) | 35 |
| Tabela 12 - Método de Imobilização - Aprisionamento/Encapsulação (Knezevic, Z., <i>et al.</i> , 2004) | 36 |
| Tabela 13 - Comparação dos diferentes métodos de imobilização (Gupta, V., <i>et al.</i> , 2013)..... | 37 |
| Tabela 14 - Produtos derivados do glicerol e sua aplicação (Mota, C., <i>et al.</i> , 2009) | 39 |
| Tabela 15 - Exemplos de produção de biodiesel catalisada por células inteiras (Aguieiras, E., <i>et al.</i> , 2015)..... | 40 |
| Tabela 16 - Métodos cromatográficos utilizados para doseamento de biodiesel (P. L. Ivon e L. C. F. Sérgio, 2009)..... | 42 |
| Tabela 17 – A ₅₄₀ das culturas bacterianas em diferentes meios de cultura após 24h de incubação (C1 e C2 –colónias) | 56 |
| Tabela 18 - Média da actividade enzimática, em UI/mL, do meio de cultura B' inoculado com diversas estirpes bacterianas (1 e 2 – colónias)..... | 59 |
| Tabela 19 – Média da actividade enzimática, em UI/mL, dos meios de cultura A e B inoculados com diversas estirpes bacterianas (1, 2 e 3 – colónias) | 61 |
| Tabela 20 - Valores de actividade de lipase extra- e intracelular das estirpes mutantes de <i>P. aeruginosa</i> (<i>Ph3B</i> , <i>L10</i> e <i>A13</i>) em meios de cultura com azeite e com Tween 20..... | 73 |
| Tabela 21 - Valores de actividade de lipase extra- e intracelular das estirpes mutantes fúngicas (<i>Phlebia rufa</i> , <i>Ganoderma lucidum violeta</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Ganoderma carnosum</i>) em meios de cultura com azeite e com Tween 20..... | 74 |
| Tabela 22 - Análise das variáveis de acordo com a metodologia ANOVA | 75 |
| Tabela 23 - Comportamento cromatográfico da lipase de várias estirpes microbianas em quelatos de metais imobilizados (R6 – resina Sepharose 6B-EPI-IDA, R2 – resina Sepharose 6B-BDGE-IDA, R3 – resina Sepharose 4B-BDGE -IDA e R4 – resina Sepharose 4B-EPI-IDA)..... | 87 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 24 – Tabela de purificação da lipase da estirpe mutante A/3 de <i>P. aeruginosa</i> numa coluna com Sepharose 6B-BDGE-IDA-Cu(II), a pH 7 e com um gradiente de 0 a 500 mM (figura 47) | 89 |
| Tabela 25 – Tabela de purificação da lipase da estirpe mutante A/3 de <i>P. aeruginosa</i> numa coluna com Sepharose 6B-BDGE-IDA-Cu(II), a pH 8 e com um gradiente de 0 a 500 mM (figura 48) | 90 |
| Tabela 26 - Quantidade de células versus % FAME | 100 |
| Tabela 27 - Área das elipses vs % biodiesel..... | 103 |
| Tabela 28 - Quantidade de biodiesel nas amostras com óleo usado com e sem aquecimento..... | 106 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Consumo de energia por fonte energética de 2005 a 2013 (* dados provisórios). (DGEG, 2014) | 16 |
| Figura 2 - Fontes energéticas e o seu consumo, em 2013 (DGEG, 2014)..... | 16 |
| Figura 3 - Emissões de GEE no sector de transportes em Portugal e na UE (DGEG, 2014) | 17 |
| Figura 4 - Esquema global da reacção de transesterificação (Meneghetti, S., <i>et al.</i> , 2013) | 18 |
| Figura 5 - Reacção de transesterificação em três etapas (Meneghetti, S., <i>et al.</i> , 2013) | 19 |
| Figura 6 – Principais indústrias que utilizam a glicerina como matéria prima [Bondioli, P., 2003] | 38 |
| Figura 7 – Lipase encapsulada em alginato de cálcio..... | 51 |
| Figura 8 – Curvas de crescimento das culturas bacterianas no meio de cultura B' com óleo usado..... | 57 |
| Figura 9 – Actividade enzimática das várias estirpes mutantes bacterianas no meio de cultura A (C1 e C2 – colónias)..... | 57 |
| Figura 10 - Actividade enzimática das várias estirpes mutantes bacterianas no meio de cultura B (C1 e C2 – colónias)..... | 58 |
| Figura 11 - Actividade enzimática das várias estirpes mutantes bacterianas no meio de cultura B' (1 e 2 – colónias) | 58 |
| Figura 12 - A ₅₄₀ das culturas bacterianas no meio de cultura A | 60 |
| Figura 13 - A ₅₄₀ das culturas bacterianas no meio de cultura B | 60 |
| Figura 14 – Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Ph3B</i> de <i>P. aeruginosa</i> (A – meio de cultura com azeite)..... | 61 |
| Figura 15 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Ph3B</i> de <i>P. aeruginosa</i> (B – meio de cultura com Tween 20)..... | 62 |
| Figura 16 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>A13</i> de <i>P. aeruginosa</i> (A – meio de cultura com azeite) | 62 |
| Figura 17 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>A13</i> de <i>P. aeruginosa</i> (B – meio de cultura com Tween 20) | 63 |
| Figura 18 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>L10</i> de <i>P. aeruginosa</i> (A – meio de cultura com azeite) | 63 |
| Figura 19 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>L10</i> de <i>P. aeruginosa</i> (B – meio de cultura com Tween 20) | 64 |
| Figura 20 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Phlebia rufa</i> (A1 e A2 – duplicados no meio de cultura com azeite) | 65 |
| Figura 21 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Ganoderma lucidum violata</i> (A1 e B1 –meio de cultura com azeite e Tween 20, respectivamente) . | 65 |
| Figura 22 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Pleurotus ostreatus</i> (A1 e B2 – meio de cultura com azeite e Tween 20, respectivamente) | 66 |
| Figura 23 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Ganoderma carnosum</i> (A1 e A2 – duplicados no meio de cultura com azeite) | 67 |
| Figura 24 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Ganoderma carnosum</i> (B1 e B2 – duplicados no meio de cultura com Tween 20) | 67 |
| Figura 25 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Ganoderma carnosum</i> (A2 e B1 –meio de cultura com azeite e com Tween 20, respectivamente)..... | 68 |
| Figura 26 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Phlebia rufa</i> (A1 e A2 – duplicados no meio de cultura com azeite) | 69 |

| | |
|---|----|
| Figura 27 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Phlebia rufa</i> (B1 e B2 – meio de cultura com Tween 20) | 69 |
| Figura 28 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Ganoderma lucidum violata</i> (A1 e A2 – meio de cultura com azeite) | 70 |
| Figura 29 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Ganoderma lucidum violtea</i> (B1 e B2 – meio de cultura com Tween 20) | 70 |
| Figura 30 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Pleurotus ostreatus</i> (A1 e A2 – duplicados no meio de cultura com azeite) | 71 |
| Figura 31 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Pleurotus ostreatus</i> (B1 e B2 – duplicados no meio de cultura com Tween 20) | 71 |
| Figura 32 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Ganoderma carnosum</i> (A1 e A2 – duplicados no meio de cultura com azeite) | 72 |
| Figura 33 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe <i>Ganoderma carnosum</i> (B1 e B2 – duplicados no meio de cultura com Tween 20) | 72 |
| Figura 34 – Representação tridimensional da interação dos parâmetros temperatura e meio de cultura na actividade de lipase para <i>P. aeruginosa</i> da estirpe <i>Ph3B</i> | 76 |
| Figura 35 - Representação tridimensional da interação dos parâmetros estirpe e temperatura na actividade de lipase para <i>P. aeruginosa</i> no meio de cultura com azeite | 77 |
| Figura 36 - Actividade enzimática da lipase da estirpe <i>Ph3B</i> de <i>P. aeruginosa</i> imobilizada em esferas de alginato de cálcio | 78 |
| Figura 37 - Rendimento da lipase imobilizada em esferas de alginato de cálcio | 79 |
| Figura 38 – Efeito do volume de enzima de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> imobilizada nos poços da microplaca utilizando diferentes concentrações de glutaraldeído..... | 80 |
| Figura 39 - Efeito do volume de enzima de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> imobilizada nos poços da microplaca utilizando diferentes concentrações de glutaraldeído..... | 81 |
| Figura 40 – Actividade enzimática da lipase de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> imobilizada com 2% de GA (v/v) nos dias 16 e 23 de Julho e 16 de Setembro | 81 |
| Figura 41 - Actividade enzimática da lipase de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> imobilizada com 4% de GA (v/v) nos dias 16 e 23 de Julho e 16 de Setembro | 82 |
| Figura 42 - Actividade enzimática da lipase de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> imobilizada com 6% de GA (v/v) nos dias 16 e 23 de Julho e 16 de Setembro | 82 |
| Figura 43 - Actividade enzimática da lipase de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> imobilizada com 10% de GA (v/v) nos dias 16 e 23 de Julho e 16 de Setembro | 83 |
| Figura 44 - Actividade enzimática da lipase de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> imobilizada com 15% de GA (v/v) nos dias 16 e 23 de Julho e 16 de Setembro | 83 |
| Figura 45 - Actividade enzimática da lipase de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> imobilizada sem GA (v/v) nos dias 16 e 23 de Julho e 16 de Setembro | 84 |
| Figura 46 - Actividade enzimática da lipase de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> imobilizada com 2% de GA (v/v) nos dias 22 e 23 de Julho..... | 84 |
| Figura 47 - Actividade enzimática da lipase de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> imobilizada com 4% de GA (v/v) nos dias 22 e 23 de Julho..... | 85 |
| Figura 48 - Actividade enzimática da lipase de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> imobilizada com 6% de GA (v/v) nos dias 22 e 23 de Julho..... | 85 |
| Figura 49 - Actividade enzimática da lipase de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> imobilizada com 8% de GA (v/v) nos dias 22 e 23 de Julho..... | 86 |

| | |
|--|-----|
| Figura 50 - Comportamento cromatográfico da lipase da estirpe mutante <i>A/3</i> de <i>P. aeruginosa</i> numa coluna com Sepharose 6B-BDGE-IDA-Cu(II), a pH 7 e com um gradiente de 0 a 500 mM (2 mL de cada fracção) | 88 |
| Figura 51 - Comportamento cromatográfico da lipase da estirpe mutante <i>A/3</i> de <i>P. aeruginosa</i> numa coluna com Sepharose 6B-BDGE-IDA-Cu(II), a pH 8 e com um gradiente de 0 a 500 mM (2 mL de cada fracção) | 89 |
| Figura 52 - Comportamento cromatográfico da lipase da estirpe mutante <i>A/3</i> de <i>P. aeruginosa</i> numa coluna com Sepharose 6B-EPI-IDA-Cu(II), a pH 7 e com um gradiente de 0 a 500 mM (2 mL de cada fracção) | 90 |
| Figura 53 - Comportamento cromatográfico da lipase da estirpe mutante <i>Ph3B</i> de <i>P. aeruginosa</i> numa coluna com Sepharose 6B-EPI-IDA-Cu(II), a pH 7 e com um gradiente de 0 a 500 mM (2 mL de cada fracção) | 91 |
| Figura 54 - Comportamento cromatográfico da lipase da estirpe mutante <i>A/3</i> de <i>P. aeruginosa</i> numa coluna com Sepharose 6B-BDGE-IDA-Cu(II), a pH 8 e com um gradiente de 0 a 250 mM (2 mL de cada fracção) | 91 |
| Figura 55 - Comportamento cromatográfico da lipase da estirpe mutante <i>A/3</i> de <i>P. aeruginosa</i> numa coluna com Sepharose 6B-BDGE-IDA-Cu(II), a pH 8 e com um gradiente de 0 a 250 mM. O tampão de equilíbrio continha imidazole 10 mM (2 mL de cada fracção)..... | 92 |
| Figura 56 - Gel da PAGE Nativa apresentando uma banda da <i>A/3</i> (poço 1 – marcador de BSA (66000 Da); poço 2 – marcador de ovalbumina (45000 Da); poço 3 – enzima da estirpe <i>Ph3B</i> do caldo de fermentação; poço 4 – enzima da estirpe mutante <i>A/3</i> do caldo de fermentação; poço 5 – fracções purificadas . | 93 |
| Figura 57 - Gel da SDS-PAGE apresentando uma banda da lipase de <i>P. aeruginosa A/3</i> com uma Mr entre os 45 e os 30 kDa (poço 1 – marcadores: 220 kDa, 100 kDa, 60 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20 kDa, 12 kDa e 8 kDa; poço 2 – enzima da estirpe <i>A/3</i> do caldo de fermentação; poço 3 – enzima da estirpe <i>Ph3B</i> do caldo de fermentação, poços 4 ao 8 – fracções de purificação) | 94 |
| Figura 58 - Curva de calibração da área das elipses vs % biodiesel | 95 |
| Figura 59 - TLC com diferentes concentrações de biodiesel em óleo vegetal trfinado (1 ao 7 - 100%, 50%, 25%, 17%, 13%, 10% e 5%, respectivamente) | 96 |
| Figura 60 - Curva de calibração do glicerol de 0% a 1.5%, utilizando o método de doseamento do periodato de sódio e da acetilacetona | 96 |
| Figura 61 – Curvas de progresso da produção de glicerol a partir da reação de transesterificação utilizando suspensão celular de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> | 97 |
| Figura 62 - Curvas de progresso da produção de glicerol a partir da reação de transesterificação utilizando suspensão celular de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> e lipase comercial imobilizada NS-88003 (lipozyme RM IM) | 98 |
| Figura 63 - Progresso da produção de glicerol a partir da reação de transesterificação utilizando suspensão celular de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> e lipase comercial imobilizada e reutilização das células (ao fim de 46 horas) | 99 |
| Figura 64 - TLC das misturas reacionais contendo suspensão celular de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> (1 – glicerol; 2 – controlo negativo; 3 – 80 µL de células ao fim de 22 horas; 4 – 100 µL de células ao fim de 19 horas; 5 – 150 µL de células ao fim de 18 horas; 6 e 7 – NS-88002 e NS-88003 ao fim de 18 horas, respectivamente)..... | 100 |
| Figura 65 - Actividade enzimática da lipase da estirpe mutante <i>Ph3B</i> de <i>P. aeruginosa</i> imobilizada em 6 poços de uma microplaca de 48 poços..... | 101 |
| Figura 66 - Quantidade de glicerol produzido utilizando lipase de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> imobilizada, células de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> e lipases comerciais..... | 102 |

| | |
|--|-----|
| Figura 67 - TLC das amostras das misturas reacionais (1 – glicerol; 2 – controlo negativo; 3 e 4 - enzima imobilizada dos poço 2 e 4, respectivamente; 5 ao 7 - 100 µL, 150 µL de células e NS-88003 ao fim de 69.25 horas, respectivamente) | 102 |
| Figura 68 - Quantidade de glicerol obtido pela reacção de transesterificação com óleo usado e diferentes volumes de suspensão celular de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> | 103 |
| Figura 69 - Quantidade de glicerol obtido pela reacção de transesterificação com óleo usado aquecido e diferentes volumes de suspensão celular de <i>P. aeruginosa Ph3B</i> | 104 |
| Figura 70 - Produção de glicerol a partir de óleo usado | 105 |
| Figura 71 - Produção de glicerol a partir de óleo usado aquecido | 105 |
| Figura 72 – TLC utilizando óleo usado com e sem aquecimento (1 – glicerol; 2 – controlo negativo; 3 e 4– 100 µL e 150 µL de células, respectivamente, com óleo usado; 5 e 6 – 50 µL e 100 µL de células com óleo usado aquecido; 7 – NS-88002 com óleo usado aquecido) | 106 |

Lista de abreviaturas

BSA – Proteína albumina do soro bovino (bovine serum albumin)

FA – Fatty acids

FAA – Ácidos gordos livres (Free fatty acid)

FAEE – Fatty Acid Ethyl Ester

FAME – Fatty acids methyl esters (ésteres metílicos de ácidos gordos)

FES - Fermentação no estado sólido

FSm – Fermentação no estado submerso

G - *Ganoderma carnosum*

GA – Glutaraldeído

GEE – Gases de efeito de estufa

GV - *Ganoderma lucidum violeta*

IDA – Ácido imino diacético

IMAC - Cromatografias de afinidade com metal imobilizado

MeOH – Metanol

NS-88002 – Lipase comercial imobilizada da Novozymes

NS-88003 – lipase comercial de *Candida Antartica* lipozyme RM IM da Novozymes

PAGE NATIVA - Electroferese de gel de poliacrilamida em condições nativas

PM – *Phlebia rufa*

p-NPP - p-nitrofenil palmitato

PO - *Pleorotus ostreatus*

R2 – Sepharose 6B epoxi-activada com butanodiol-diglicidil éter- ácido imino diacético

R3 – Sepharose 4B epoxi-activada com butanodiol-diglicidil éter- ácido imino diacético

R4 – Sepharose 4B epoxi-activada com epiclorohidrina-ácido imino diacético.

R6 – Sepharose 6B epoxi-activada com epiclorohidrina-ácido imino diacético

SDS-PAGE – Electroferese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes com dodecilsulfato de sódio

TLC – Cromatografia em camada fina

UE - União Europeia

1. Introdução

Actualmente, as reservas dos combustíveis fósseis estão a esgotar-se, em particular as dos combustíveis petrolíferos, uma vez que o seu consumo tem sido maior que a sua produção, apresentando um problema de sustentabilidade energética a longo prazo.

Outro inconveniente, é o aumento do efeito de estufa devido à sua queima excessiva. A queima destes combustíveis provoca certas preocupações ambientais devido à libertação de gases poluentes e de partículas sólidas e tóxicas que são prejudiciais ao meio ambiente. Devido à escassez, ao aumento da poluição ambiental e ao preço dos combustíveis fósseis, foi necessário desenvolver uma fonte de energia alternativa e renovável como os biocombustíveis.

1.1. Combustíveis fósseis

Os combustíveis fósseis são formados através da decomposição de matéria orgânica ao longo de milhares de anos e, devido a este motivo, os combustíveis fósseis são recursos não renováveis. Os combustíveis fósseis mais utilizados são o carvão mineral, o petróleo e seus derivados e o gás natural.,

1.2. Combustíveis derivados da biomassa

A biomassa está disponível em abundância e deriva de matéria orgânica. É uma fonte de energia limpa e renovável, a sua queima produz resíduos que não interferem no efeito de estufa e diminui a produção de resíduos industriais. A biomassa pode ser transformada em energia através da pirólise, da gaseificação, da combustão e da co combustão.

Os biocombustíveis derivam de matérias primas orgânicas, como matéria agrícola tais como resíduos agro-industriais das florestas, culturas alimentares e não alimentares entre outras . Os vários tipos de biocombustíveis

são o biodiesel, o bioetanol, o biogás, biometanol, bioéter dimetílico, entre outros.

1.3. Biodiesel

O Biodiesel é formado por uma mistura de monoésteres metílicos ou etílicos de ácidos gordos, sendo renovável e biodegradável. É produzido a partir da reacção de transesterificação de triglicéridos - lípidos como os óleos vegetais e as gorduras animais - na presença de um álcool e de um catalisador químico ou biológico, obtendo-se biodiesel e glicerol como subproduto. (Moradi, G., *et al.*, 2012)

Utilizando o metanol produz-se biodiesel formado por ésteres metílicos e denomina-se por *Fatty Acids Methyl Ester* (FAME). Se o etanol for utilizado, produz-se biodiesel com ésteres etílicos na sua composição, ou seja, *Fatty Acid Ethyl Ester* (FAEE). Os ácidos gordos (*fatty acids* - FA) são ácidos carboxílicos que possuem uma longa cadeia alifática e podem ser saturados ou insaturados e são derivados dos triglicéridos. São chamados de ácidos gordos livres (*free fatty acid* (FFA)) quando estão livres e não estão ligados a nenhuma molécula, resultando da quebra de triglicéridos em glicerol e ácidos gordos livres. (European Biofuels Technology Platform, 2011)

A utilização do biodiesel apresenta vantagens. É um biocombustível renovável e biodegradável, pode ser utilizado em todos os motores a diesel, misturado com gasóleo até incorporações de 30%, reduz a emissão de partículas em suspensão em 30%, não apresenta compostos carcinogénicos e o seu manuseamento e o seu armazenamento são mais seguros devido ao seu elevado ponto de inflamação (*Flash Point*). (Moradi, G., *et al.*, 2012)

O ponto de inflamação (*Flash Point*) é a temperatura mínima de um líquido no qual é libertado uma quantidade suficiente de vapor para se formar uma mistura inflamável com o ar. Conforme a temperatura aumenta, aumenta

também a pressão de vapor e a quantidade de líquido inflamável evaporado. (Carareto, N., *et al.*, 2012)

O ponto de inflamação do biodiesel é de, no mínimo, de 130 °C. (Crimson, 2006)

A utilização do biodiesel também apresenta inconvenientes. A produção de biodiesel origina glicerina, que é um subproduto, e a sua queima origina acroleína, que se pensa ser um composto cancerígeno (o glicerol apresenta inúmeras aplicações na indústria e na medicina e pode ser convertido quimicamente em compostos de alto valor acrescentado). Como se utiliza matéria prima de origem vegetal para a produção de biodiesel, a sua utilização intensiva pode levar a um esgotamento das capacidades dos solos e a um aumento dos preços dos alimentos. (Moradi, G., *et al.*, 2012)

1.4. Estratégia UE 2020

A União Europeia (UE), até 2020 através da sua directiva quadro das renováveis, prevê aumentar para 10% a percentagem mínima de biocombustíveis nos combustíveis fósseis utilizados no sector dos transportes.

A estratégia Europeia 2020 centra-se em desenvolver uma economia baseada no conhecimento e na inovação, em promover uma economia mais eficiente em recursos e mais ecológica e em favorecer uma economia mais económica, social e territorial na Europa para o século XXI. Deste modo, a UE estabeleceu 3 grandes objectivos a alcançar para 2020 como: (Comunicado da Comissão Europeia, 2010)

- Reduzir em 20% as emissões dos gases de efeito de estufa;
- Aumentar em 20% a quota de energias renováveis no mix energético;
- Aumentar em 20% a eficiência energética.

As fontes energéticas mais utilizadas ao longo das últimas décadas têm sido o petróleo e seus derivados, embora tenha aumentado o consumo de gás natural., (Agência Portuguesa do Ambiente, REA, 2014)

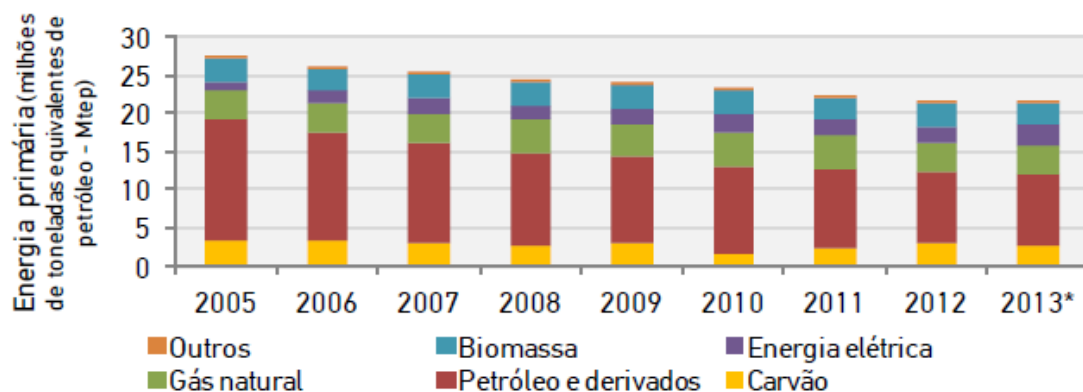


Figura 1 - Consumo de energia por fonte energética de 2005 a 2013 (* dados provisórios). (DGEG, 2014)

Como se verifica na figura 1, a utilização do petróleo tem vindo a diminuir ao longo dos anos, passando de 58,6% (em 2005) para 43,5% (em 2013).

Realizada a análise em 2013, verifica-se que as fontes energéticas utilizadas e o seu consumo apresentam-se na Figura 2. No entanto, a fonte energética mais utilizada em 2013 ainda continua a ser o petróleo.

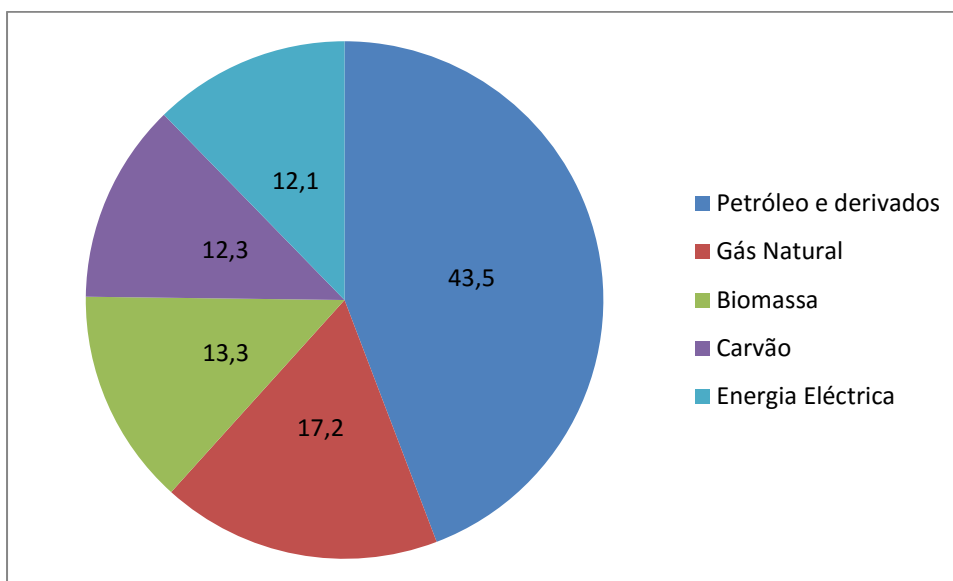


Figura 2 - Fontes energéticas e o seu consumo, em 2013 (DGEG, 2014)

Em Outubro de 2014, definiu-se uma meta para 2030 relativamente à energia. A meta definida foi que pelo menos 27% de energias renováveis eram utilizadas no consumo total de energia na UE.

Em Portugal estabeleceu-se uma meta de utilização de 31% de energias renováveis no consumo final de energia, de 10% no consumo energético dos transportes e a integração de 59,6% de energias renováveis na electricidade

até 2020. Esta meta foi decretada pelo Decreto-Lei n.º 141/2010 de 31 de Dezembro que transpôs a Directiva FER e o Plano Nacional de Ação para as Energias Renováveis de 2013 a 2020 (PNAER 2020).

O PNAER 2020 – Plano Nacional de Ação para as Energias Renováveis para 2020 – prevê objectivos para Portugal relativamente à quota de energias provenientes de fontes renováveis no consumo de energia para 2020. Estes objectivos têm em consideração a energia consumida nos sectores dos transportes e da electricidade em 2020, nomeando as medidas previstas a realizar em cada um destes sectores. As metas para a utilização de energias renováveis são apresentadas na tabela 1. (República Portuguesa - directiva 2009/28/CE)

Tabela 1 – Metas da PNAER 2020 para a utilização de energias renováveis no consumo de energia

| Ano | 2011 - 2012 | 2013 - 2014 | 2015 - 2016 | 2017 - 2018 |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Energias Renováveis (%) | 22,6 | 23,7 | 25,2 | 27,3 |

Um sector de actividade onde se consome mais energia é o sector dos transportes. É necessário providenciar mudanças energéticas que reduzem a dependência aos combustíveis fósseis e que reduzem as emissões dos gases de efeito de estufa (GEE). (Agência Portuguesa do Ambiente)

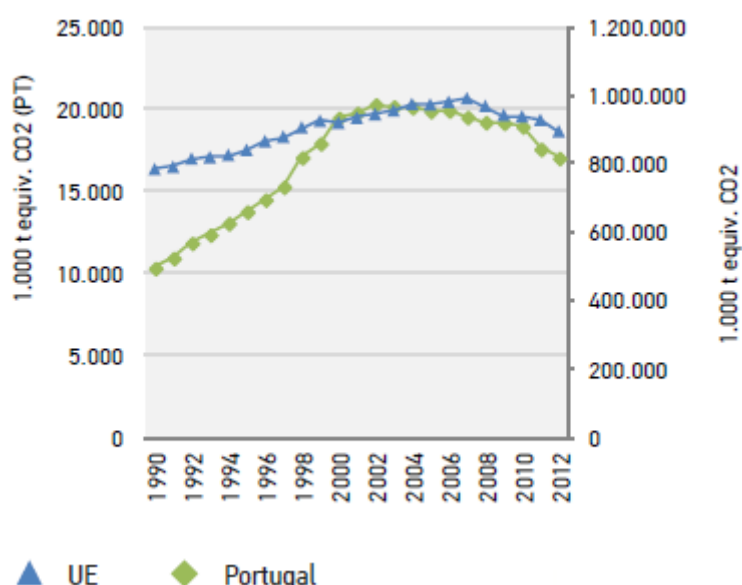


Figura 3 - Emissões de GEE no sector de transportes em Portugal e na UE (DGEG, 2014)

Como se verifica na figura 3, em Portugal as emissões de GEE apresentaram uma subida até 2002, seguida de uma diminuição reduzida.

Apesar de haver uma redução destas emissões, este sector continua a ser preocupante pois subsiste em ser uma das principais fontes de emissões de GEE, evidenciando 24,7% do total destas emissões em Portugal em 2012.

A produção de biodiesel pode ser realizada química ou enzimaticamente através da reacção de transesterificação.

1.5. Reacção de Transesterificação

A transesterificação ocorre entre um éster e um álcool, formando-se três ésteres alquílicos, como se verifica na figura 4.

Actualmente, a transesterificação de óleos ou gorduras (triglicéridos) em ésteres alquílicos utilizando um álcool (metanol, etanol, entre outros) na presença de um catalisador (ácido, alcalino, enzimático ou com condições supercríticas) tem muito interesse, dado que se obtém primariamente biodiesel que possui propriedades semelhantes ao do diesel. Produz-se um subproduto, o glicerol, que é muito utilizado na indústria farmacêutica e nos cosméticos. (Vasudevan, P.e Briggs, M., 2008)

O metanol é o álcool mais utilizado neste processo devido ao seu preço reduzido e de mais fácil reactividade. No entanto, como o metanol é tóxico do ponto de vista da sustentabilidade ambiental, é preferível utilizar o etanol pois é um produto proveniente da agricultura, é renovável e não apresenta toxicidade.

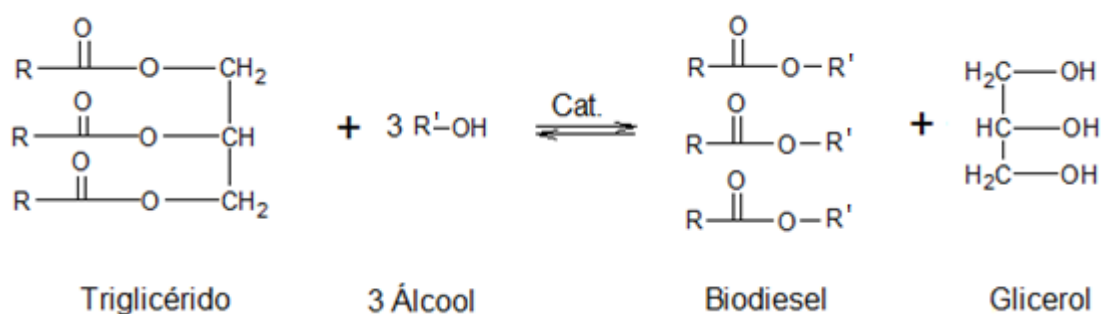


Figura 4 - Esquema global da reacção de transesterificação (Meneghetti, S., et al., 2013)

O mecanismo da reacção de transesterificação ocorre em três etapas consecutivas e reversíveis. Nestas etapas são formados os monoglicéridos, os diglicéridos e o biodiesel (três moléculas de RCOOR^1 produz o biodiesel), como se verifica na figura 5.

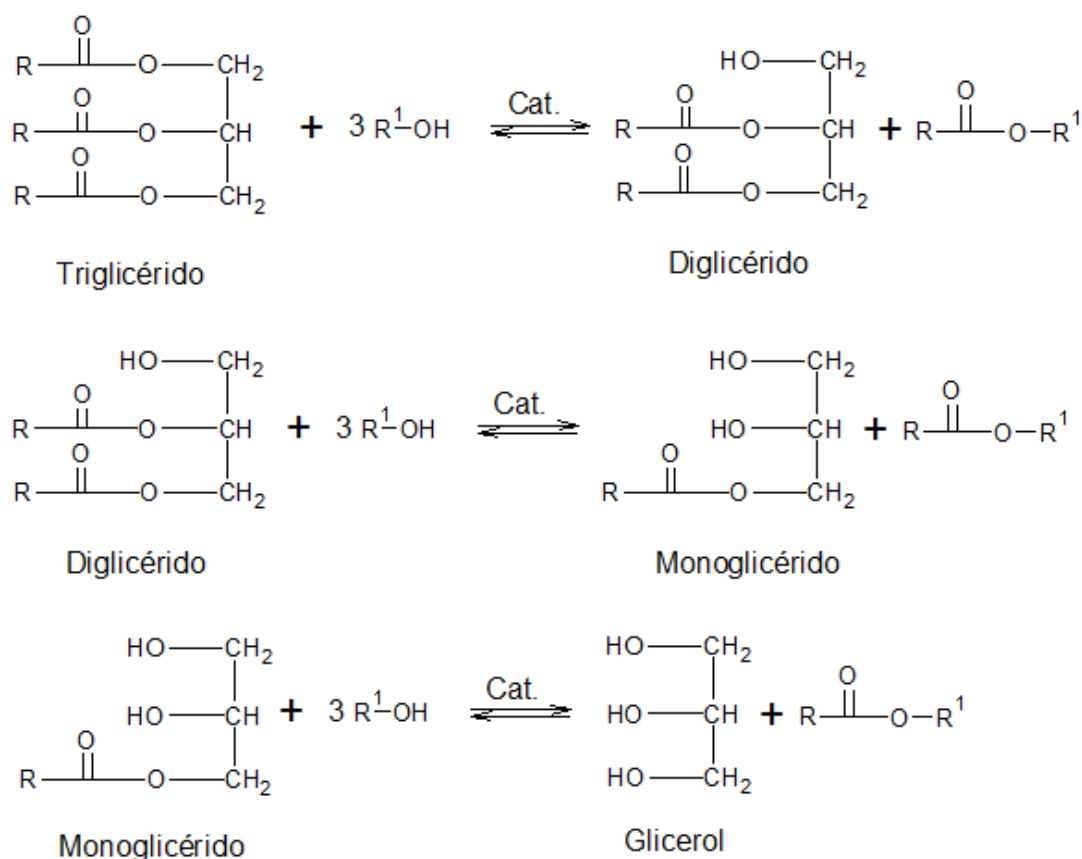


Figura 5 - Reacção de transesterificação em três etapas (Meneghetti, S., et al., 2013)

A transesterificação ocorre na presença de catalisadores ácidos, como o HCl, H_2SO_4 e de catalisadores básicos, como o NaOH e KOH, ocorrendo a formação de sabão quando o teor de FFA é maior que 0.5 mg KOH/g óleo sendo mais complicado o processo de purificação do biodiesel.

De modo a ultrapassar as dificuldades que a catálise homogénea apresenta, pode-se substituir este métodos convencional pelo método de produção de biodiesel através da catálise heterogénea, em que os catalisadores utilizados são sólidos. Este método apresenta uma maior rentabilidade, uma maior compatibilidade ambiental, a eliminação dos vários

passos de lavagem e de recuperação do catalisador garantindo uma maior eficiência do processo e, desta forma, uma redução dos custos de produção. (Gomes, J., *et al.*, 2012), (Puna, J.F. *et al.*, 2011)

Muitos autores realizaram experiências com catalisadores heterogêneos de modo a determinar qual o melhor catalisador na produção de biodiesel.

Kiss *et al.*, (2006) testaram vários catalisadores heterogêneos como zeólitos Y, β e ZSM-5, resinas catiónicas Amberlyst-15 e Nafion-50, óxidos metálicos sulfatados (ZrO_2/SO_4^{2-} e SnO_2/SO_4^{2-}) e catalisadores de Césio. O melhor rendimento de produção de biodiesel foi com o catalisador ZrO_2/SO_4^{2-} . (Kiss, A., *et al.*, 2006)

Rosa *et al.*, (2006) utilizou carbonatos como catalisadores heterogêneos (K_2CO_3 , Na_2CO_3 e $CaCO_3$) na reação de transesterificação de óleos vegetais (óleo de mamona) com metanol. A razão molar de óleo/metanol/catalisador que se utilizou foi de 100/600/1. Os tempos reacionais efectuados foram até 10h. O catalisador que apresentou maior actividade e maior eficiência na obtenção de biodiesel foi o K_2CO_3 . (Rosa, M. e Oliveira, A., 2006)

1.5.1. Vantagens e desvantagens da catálise ácida versus catálise básica

Tanto a reação com catalisador ácido como a reação com catalisador básico apresentam vantagens e inconvenientes na produção do biodiesel, como se verifica na tabela 2.

Tabela 2 - Catálise ácida versus catálise básica (Delatorre, A. *et al.*, 2011)

| | | Reação Química (catálise ácida vs básica) | |
|-----------------|--|---|--|
| | | Vantagens | Desvantagens |
| Catálise ácida | Pode ser utilizada na presença de água e de ácidos gordos livres | | Cinética da reação muito lenta |
| | As matérias primas não precisam de um passo adicional de secagem | | Remover o catalisador depois da reação para não danificar os reactores |
| | | Vantagens | Desvantagens |
| Catálise básica | Cinética da reação mais rápida | | Sensíveis na presença de água e de ácidos gordos livres |
| | Rendimentos elevados | | Formação de sabão |

1.5.2. Catalisadores enzimáticos

Outra possibilidade de catalisadores são as enzimas, nomeadamente as lipases (triacilglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3). que catalisam a hidrólise de triglicéridos na presença de água produzindo os correspondentes ácidos gordos livres e glicerol. As lipases podem ser produzidas e extraídas a partir de órgãos de animais, plantas, bactérias, fungos e de leveduras. (Meneghetti, S., *et al.*, 2013)

A transesterificação catalisada por enzimas ainda não está desenvolvida à escala industrial devido ao reduzido rendimento do biodiesel, ao elevado tempo de reacção e ao custo elevado do biocatalisador. Para que esta reacção tenha umas características adequadas para a aplicação industrial, terá que ter as suas condições de reacção optimizadas, tais como, o solvente, o pH, a temperatura, o tipo de microrganismo a utilizar para produzir a enzima necessária, se a enzima será utilizada livre ou imobilizada num suporte, entre outros factores. (Demirbas, A., 2005)

Tanto a reação química como a enzimática apresentam vantagens e inconvenientes na produção do biodiesel, como se verifica na tabela 3. (Delatorre, A. *et al.*, 2011; Salvador, A. A., 2009)

Tabela 3 – Vantagens e desvantagens do processo enzimático em relação aos processos químicos com catálise homogénea

| Vantagens | Desvantagens |
|---|--|
| Não necessita de passos adicionais, como a neutralização e a lavagem da matéria-prima | Rendimento reduzido |
| Favorece a recuperação do glicerol | Necessário elevadas quantidades de catalisador |
| O catalisador pode ser recuperado no final do processo | |
| Catalisadores mais específicos | Custo elevado |
| Não formam sabões | Optimização das condições de reação |
| Reduz o impacto ambiental | |
| Produtos com elevado grau de pureza | |

As diferenças entre o processo químico homogéneo e o processo enzimático são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Diferenças entre o processo químico homogéneo e o processo enzimático (Aarthy, M., *et al.*, 2014 ; Z.Yaakob *et al.*, 2013)

| Factores | Método químico | | Método enzimático |
|-----------------------------------|---|--------------------------------------|---------------------------------------|
| | Processo ácido | Processo alcalino | |
| Rendimento de biodiesel | > 90% para um rácio maior de álcool:óleo, elevada [catalisador] e temperatura | Maior que 96% | Cerca de 90% |
| Conteúdo de FFA na matéria-prima | Convertidos em ésteres | Formação de sabão | Convertidos em ésteres metílicos |
| Conteúdo de água na matéria-prima | Desactivação do catalisador | Formação de sabão; hidrólise do óleo | Não há influência |
| Recuperação do glicerol | Complexa | Complexa | Fácil recuperação |
| Velocidade de reacção | Lenta | Elevada | Baixa |
| Temperatura de reacção | Maior que 100°C | 60-80°C | 20-50°C |
| Recuperação do catalisador | Muito difícil | Muito difícil | Fácil; não está estudado o suficiente |
| Reutilização do catalisador | Não | Não | Sim |
| Custo do catalisador | Baixo | Baixo | Elevado |
| Generação de águas residuais | Elevado; é necessário tratamento | Elevado; é necessário tratamento | Baixo; não é necessário tratamento |

1.4.3. Factores que afectam a reacção de transesterificação

Os factores que afectam a reacção de transesterificação na produção do biodiesel são o conteúdo de água, a temperatura, a inibição pelo álcool e pelo glicerol e o efeito do uso de solventes. (Guldhe, A., *et al.*, 2015)

O conteúdo de água numa reacção pode ser determinado pela actividade da água ou pela percentagem de peso do óleo usado como matéria prima. A actividade da água é a relação entre a pressão de vapor de água em equilíbrio da amostra e a pressão de vapor da água pura à mesma temperatura. O conteúdo de água óptimo na reacção de transesterificação depende da matéria-prima, da lipase utilizada, da técnica de imobilização da lipase e o tipo de solvente utilizado.

As lipases de diferentes fontes apresentam uma gama de temperatura óptima de 20 a 70°C. Aumentando a temperatura a actividade da enzima aumenta até à temperatura óptima. Se se continuar a aumentar a temperatura, ocorre a desnaturação da enzima ocorrendo a diminuição da sua actividade enzimática. Os factores decisivos para se otimizar a reacção de transesterificação catalisada por lipases são a imobilização da lipase e a sua estabilidade, a razão molar de álcool/óleo e o tipo de solvente utilizado.

O álcool é um aceitador de grupos acilo (como por exemplo os ésteres) e o álcool mais utilizado na reacção de transesterificação é o metanol devido ao seu custo reduzido e ao comprimento da cadeia reduzido resultando num maior rendimento de biodiesel. Para ultrapassar o problema da inibição da lipase pelo álcool utilizado, recorreu-se a várias alternativas como adicionar gradualmente o álcool em quantidades reduzidas, utilizar outro tipo de aceitador de grupos acilo (acetato de metilo e acetato de etilo) utilização de solventes e utilizar lipases tolerantes ao metanol.

Altas temperaturas e elevadas concentrações de álcool são responsáveis pela inibição da actividade da lipase. (Guldhe, A., *et al.*, 2015)

O glicerol é um dos produtos resultantes da reacção de transesterificação e tem um efeito inibidor na actividade da lipase. A solução para minimizar a inibição pelo glicerol é a sua remoção gradual da mistura reaccional e a utilização de solventes como butanol terciário que dissolvem o glicerol (Guldhe, A., *et al.*, 2015)

Os solventes mais utilizados são hexano, n-heptano, éter de petróleo e butanol terciário. Os solventes orgânicos hidrofóbicos são os mais utilizados na reacção de transesterificação uma vez que estes solventes permitem as moléculas de água agregarem-se próximas à enzima, sendo necessário para melhorar a actividade enzimática (Guldhe, A., *et al.*, 2015)

Tabela 5 – Alguns factores que afectam a reacção de transesterificação na produção do biodiesel (Guldhe, A., *et al.*, 2015)

| Conteúdo de água | | Inibição pelo glicerol | Efeito do uso de solventes | |
|--|--|---|--|--|
| Vantagens | Desvantagens | | Vantagens | Desvantagens |
| Aumenta a área entre as fases aquosa e orgânica onde as lipases se encontram | Excesso de água conduz à reacção de hidrólise e reduz o rendimento de ésteres alquílicos | O equilíbrio da reacção de transesterificação ocorre no sentido inverso | Aumenta a solubilidade dos óleos e do álcool minimizando a inibição da lipase pelo álcool e aumentando a interacção do substrato pelos centros activos da enzima | Aumenta o custo total de produção sendo necessário um passo adicional de separação do solvente dos produtos finais |
| A água dilui o metanol (o metanol provoca um efeito inibidor na lipase) | Conteúdo de água em menores quantidades pode levar à esterificação | As moléculas de glicerol formam um ambiente hidrofílico à volta da lipase imobilizada prevenindo o substrato de entrar em contacto com a enzima | Reduz a viscosidade, ajuda na transferência de massa e elevado rendimento de produto final | São tóxicos, inflamáveis e apresentam um efeito de deterioração do ambiente |

1.6. Lipase – Produção, caracterização e purificação

As lipases são enzimas hidrolíticas que catalisam a síntese de acilgliceróis numa interface água-lípidos. Catalisam reacções de hidrólise, aminólise, acidólise (troca de um éster com um ácido), alcoólise (troca de um éster com um álcool), aminólise, interesterificação (troca de um éster por outro éster) e também reacções de esterificação e de transesterificação.

Tabela 6 - Diversas reacções catalisadas pelas lipases (Sharma, S. e Kanwar, S., 2014)

| | |
|--------------------|---|
| Hidrólise | $\text{RCOOR}' + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCOOH} + \text{R}'\text{OH}$ |
| Interesterificação | $\text{RCOOR}' + \text{R}''\text{COOR}'_1 \rightarrow \text{RCOOR}'_1 + \text{R}''\text{COOR}'$ |
| Alcólise | $\text{RCOOR}' + \text{R}''\text{OH} \rightarrow \text{RCOOR}'' + \text{R}'\text{OH}$ |
| Acidólise | $\text{RCOOR}' + \text{R}''\text{COOH} \rightarrow \text{R}''\text{COOR}' + \text{RCOOH}$ |
| Esterificação | $\text{RCOOH} + \text{R}'\text{OH} \rightarrow \text{RCOOR}' + \text{H}_2\text{O}$ |

As reacções catalisadas por lipases na presença de solventes orgânicos apresentam vantagens em relação a meios aquosos, tais como: (Sharma, S. e Kanwar, S., 2014)

- As lipases são capazes de reter a sua actividade e manter a estabilidade em solventes orgânicos;
- Aumenta a regioespecificidade e a estereoselectividade;
- Maior solubilidade dos substratos e dos produtos;
- Facilidade de recuperar produtos;
- Fazer com que o equilíbrio da reacção ocorra no sentido da transesterificação e não da hidrólise;
- Facilidade de remoção do solvente devido ao reduzido ponto de ebulição da maioria dos solventes em relação à água;
- Elevada estabilidade térmica da enzima (a água inactiva a enzima em temperaturas elevadas);
- Eliminação de contaminações microbianas.

Devido às suas propriedades regioselectivas e estereosselectivas por ácidos gordos de cadeia longa, a lipase tem sido usada nas indústrias farmacêutica, dos detergentes, dos cosméticos e dos textéis. Tem sido usada, também, nos produtos lácteos, na indústria alimentar e na produção de biodiesel. (Ferrarezi, A. *et al.*, 2014)

1.6.1. Produção e caracterização de lipases de origem microbiana

As lipases microbianas são maioritariamente extracelulares com um peso molecular de 30-50 kDa, com uma gama de pH óptimo de 7.5 – 9 e uma

gama de temperatura óptima de actividade de 35-50 °C. (Christopher, L., et al., 2014)

A produção de lipases depende de vários factores, tais como, as fontes de carbono (hidratos de carbono, aminoácidos, entre outros), de azoto, de agentes indutores e as condições de crescimento do microrganismo como o arejamento, pH e a temperatura. Estes factores afectam a produção de lipase extracelular e intracelular. (Christopher, L., et al., 2014)

Pode-se recorrer ao uso de indutores para estimular a produção de lipase, tais como, triglicéridos, ácidos gordos livres, ésteres hidrolisáveis e sais biliares. (Salis, A. et al., 2007)

As diferentes fontes de carbono e de azoto utilizadas para a produção de lipases encontram-se na tabela 7.

Tabela 7 - Fontes de carbono e de azoto e indutores de lipases (Uscátegui, Y., et al., 2012)

| Fontes de Carbono | | Fontes de Azoto | Agentes indutores de lipase |
|-------------------|---------------------|----------------------|---------------------------------|
| Óleos vegetais | Soja | Peptona | Tween 20, 80, 100 (surfactante) |
| | Milho | Extracto de levedura | Óleo de palma |
| | Azeitonas | Licor de milho | Azeite |
| | Girassol | Sulfato de amónia | Triacilgliceróis |
| | Hidratos de carbono | | |

Elevadas concentrações de fontes de carbono reprimem a actividade lipolítica, no entanto, é necessário uma pequena quantidade de fonte de carbono para que ocorra um crescimento inicial dos microrganismos libertando, assim, lipase extracelular.

O uso de um surfactante como agente indutor (exemplo de Tween 20, 80 ou 100) aumenta a produção de lipases. O surfactante vai solubilizar os lípidos membranares formando micelas e extrai as proteínas de membrana (proteínas intrínsecas e periféricas) que são responsáveis pela actividade lipolítica.

A produção da lipase pode ser realizada através de fermentação no estado sólido (FES) ou através da fermentação no estado submerso (FSm)

usando estirpes microbianas apropriadas. É possível a produção microbiana de lipases usando resíduos agro-industriais tais como licor de milho, farelos de arroz e de trigo, cascas de amendoim e óleos de amendoim e sementes de canola.

A fermentação no estado submerso (FSm) utiliza um meio de fermentação líquido onde os nutrientes necessários são solúveis e as condições de produção da lipase são mais fáceis de controlar tais como a temperatura, pH e arejamento entre outros . Utiliza-se um agente indutor que poderá ser um triglicérido como o azeite e óleos usados, para induzir os microrganismos a produzirem a lipase. (Feitosa, I. *et al.*, 2010)

Actualmente, existem novas vias bioquímicas para se produzir biodiesel a partir de lipases. Existem um elevado número de estirpes microbianas que têm sido utilizadas para a produção de lipase, como as bactérias, os bolores e as leveduras. Alguns exemplos de microrganismos são os *Bacillus* spp., as *Pseudomonas* spp., os *Staphylococcus* spp., entre outros. (Christopher, L. *et al.*, 2014)

Os microrganismos que produzem lipases são apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Microrganismos produtores de lipases (adaptado de Christopher, L. *et al.*, 2014 e Sharma, R. *et al.*, 2001)

| Bactérias | Bolores | Leveduras |
|--|--------------------------------|-----------------------------|
| <i>Achromobacter lipolyticum</i> | <i>Alternaria brassicicola</i> | <i>Candida antarctica</i> |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | <i>Acremonium strictum</i> | <i>Candida curvata</i> |
| <i>Acinetobacter pseudoalcaligenes</i> | <i>Ashbya gossypii</i> | <i>Candida cylindracea</i> |
| <i>Acinetobacter radioresistens</i> | <i>Aspergillus awamori</i> | <i>Candida deformans</i> |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | <i>Aspergillus carneus</i> | <i>Candida parapsilosis</i> |
| <i>Archaeoglobus fulgidus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Candida parapsilosis</i> |
| <i>Bacillus acidocaldarius</i> | <i>Aspergillus fumigates</i> | <i>Candida quercitrusa</i> |
| <i>Bacillus brevis</i> | <i>Aspergillus japonicas</i> | <i>Candida rugosa</i> |
| <i>Bacillus cereus</i> | <i>Aspergillus nidulans</i> | <i>Candida tropicalis</i> |
| <i>Bacillus coagulans</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Candida valida</i> |
| <i>Bacillus megaterium</i> | <i>Aspergillus oryzae</i> | <i>Geotrichum candidum</i> |
| <i>Bacillus pumilus</i> | <i>Aspergillus repens</i> | <i>Pichia bispora</i> |
| <i>Bacillus</i> sp. | <i>Beauveria bassiana</i> | <i>Pichia burtonii</i> |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> | <i>Thermomyces lanuginous</i> | <i>Pichia maxicana</i> |
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Eurotrium herbanorium</i> | <i>Pichia sivicola</i> |

| | | |
|--|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Bacillus thermocatenulatus</i> | <i>Fusarium heterosporum</i> | <i>Pichia xylosa</i> |
| <i>Bacillus thermoleovorans</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Rhodotorula glutinis</i> |
| <i>Burkholderia glumae</i> | <i>Geotrichum candidum</i> | <i>Rhodotorula pilimornae</i> |
| <i>Burkholderia</i> sp. | <i>Geotrichum</i> sp. | <i>Saccharomyces crataegensis</i> |
| <i>Chromobacterium viscosum</i> | <i>Humicola lanuginosa</i> | <i>Saccharomyces lipolytica</i> |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Mucor javanicus</i> | <i>Torulospora globora</i> |
| <i>Lactobacillus</i> sp. | <i>Mucor circinelloides</i> | <i>Trichosporon asteroides</i> |
| <i>Micrococcus freudenreichii</i> | <i>Mucor hiemalis</i> | <i>Yarrowia lipolytica</i> |
| <i>Micrococcus luteus</i> | <i>Mucor miehei</i> | |
| <i>Moraxella</i> sp. | <i>Mucor racemosus</i> | |
| <i>Mycobacterium chelonae</i> | <i>Oospora lactis</i> | |
| <i>Pasteurella multocida</i> | <i>Ophiostoma piliferum</i> | |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | <i>Penicillium camambertii</i> | |
| <i>Propionibacterium avidium</i> | <i>Penicillium citrinum</i> | |
| <i>Propionibacterium granulosum</i> | <i>Penicillium cyclopium</i> | |
| <i>Proteus vulgaris</i> | <i>Penicillium fusiculosum</i> | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Penicillium roqueforti</i> | |
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i> | <i>Penicillium</i> sp. | |
| <i>Pseudomonas cepacia</i> | <i>Penicillium wortmanii</i> | |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | <i>Rhizomucor miehei</i> | |
| <i>Pseudomonas fragi</i> | <i>Rhizopus arrhizus</i> | |
| <i>Pseudomonas glumae</i> | <i>Rhizopus chinensis</i> | |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> | <i>Rhizopus delemar</i> | |
| <i>Pseudomonas nitroreducens</i> var. <i>Thermotolerans</i> | <i>Rhizopus japonicus</i> | |
| <i>Pseudomonas putida</i> | <i>Rhizopus microsporous</i> | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | <i>Rhizopus nigricans</i> | |
| <i>Psychrobacter immobilis</i> | <i>Rhizopus niveus</i> | |
| <i>Serratia marcescens</i> | <i>Rhizopus nodosus</i> | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Rhizopus oryzae</i> | |
| <i>Staphylococcus canosus</i> | <i>Streptomyces cinnamomeus</i> | |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | <i>Streptomyces exfoliates</i> | |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | <i>Streptomyces fradiae</i> | |
| <i>Staphylococcus hyicus</i> | <i>Streptomyces</i> sp. | |
| <i>Staphylococcus warneri</i> | | |
| <i>Staphylococcus xylosus</i> | | |
| <i>Statphylococcus stolonifer</i> | | |
| <i>Streptococcus lactis</i> | | |
| <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> | | |
| <i>Vibrio chloreae</i> | | |

1.6.2. Métodos de doseamento de lipases

Os vários métodos de doseamento da actividade lipolítica de lipases encontram-se na tabela 9. Existem vários kits de teste para a determinação da actividade enzimática da lipase, como por exemplo MarkerGene™ fluorescent e QuantiChrom™ lipase assay kit.

Outros métodos para o doseamento de lipases são o método de doseamento de lipase usando *p*-NPP e o método de doseamento de lipase por titulação.

O método de doseamento de lipase usando *p*-NPP é um método espectrofotométrico rápido da actividade de lipases usando *p*-NPP como substrato, havendo a sua hidrólise produzindo um cromogeno amarelo, o *p*-nitrofenol. Uma unidade internacional de enzima (1 U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produção da libertação de 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto em determinadas condições experimentais. (Lopes, D., *et al.*, 2011)

O método de doseamento de lipase por titulação utiliza o azeite como substrato e depende da determinação dos ácidos gordos libertados pelo hidróxido de potássio. (Abd-Elhakeem, M., *et al.*, 2013)

Tabela 9 - Métodos de detecção de lipases (adaptado de Hasan, F. et al., 2009)

| Métodos | Designação |
|---|---|
| Método de triagem em meios sólidos | Modificação da aparência do substrato, como tributina e trioleína, que é colocado em meios de cultura. A produção de lipase é indicada pela formação de halos claros à volta das colónias. |
| Gema de ovo como substrato | A lipase actua na fracção lípidica da lipoproteína da gema do ovo resultando em alterações na solubilidade da lipoproteína. |
| Métodos de titulação | A reacção lipolítica liberta um ácido que pode ser titulado pelo método de pH-stat. Este método mede a actividade da lipase numa emulsão de triacilglicéridos, neutralizando os FFA livres pela adição de NaOH. |
| Conductividade eléctrica | Durante a reacção de hidrólise da lipase, a condutividade eléctrica do meio aumenta devido ao desenvolvimento de cargas eléctricas transportadas pelos FFA livres. |
| Conductividade da onda acústica | Libertação de um ácido gordo com um substrato (trioleína) havendo alteração da condutividade da solução. |
| Métodos colorimétricos | Estes métodos envolvem a complexação dos FFA em solventes orgânicos com um metal bivalente (cobre) seguido por análise espectrofotométrica do metal na fase orgânica. |
| Métodos fluorimétricos | Interacção da Rodamina B com ácidos gordos libertados durante a hidrólise enzimática dos triglicéridos. |
| Espectrometria de massa | Monitorização da diminuição da actividade enzimática e alterações na sua estrutura molecular. |
| Métodos cromatográficos | HPLC e GC |
| Monitorização da tensão interfacial | Monitorização da actividade enzimática através de alterações na pressão da superfície das interfaces. |
| Métodos imunológicos | ELISA detecta e quantifica a lipase lipoproteica em tecidos ou em cultura de células. |
| Microscopia de força atómica (AFM) | Fornece uma imagem da cinética de degradação lípidica pelas lipases. |
| Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR) | Medição da hidrólise de triacilglicerois catalisada por lipases em micelas inversas. |
| Ensaio radioactivos | Método que envolve o uso de triacilglicerois que apresentam as suas cadeias acilo radiomarcadas. |

1.6.3. Purificação de lipases de origem microbiana

A purificação de proteínas consiste na separação da proteína alvo de outras proteínas contaminantes, utilizando determinadas técnicas que se baseiam nas propriedades das proteínas, tais como, o seu tamanho, a sua carga, a solubilidade, natureza hidrófoba, ou a bio- e imuno-especificidades. As técnicas de purificação existentes são as técnicas cromatográficas de alta

resolução tais como as cromatografias de afinidade, afinidade com metal imobilizado (IMAC) e imunoafinidade. (Quintas, A., *et al.*, 2008)

Analisando a bibliografia, constata-se que vários autores purificaram várias lipases usando diferentes técnicas cromatográficas mas a autora não tem conhecimento de nenhum trabalho de purificação de lipase publicado usando a cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC). (Chartrain, M., *et al.*, 1993)

A purificação de lipase envolve três etapas cromatográficas muito usadas já que só um passo de purificação é insuficiente para se obter um grau de pureza elevado da lipase purificada. Estas etapas são as cromatografias de troca iónica, por filtração em gel e de afinidade. (Saxena, R., *et al.*, 2003)

A cromatografia de troca iónica é uma técnica mais utilizada utilizando dietilaminoetilo e carboximetilcelulose como troca de anião e catião, respectivamente. Recentemente utiliza-se mais trietilaminoetil e Q-Sepharose. A cromatografia por filtração em gel é a segunda técnica mais utilizada pois a filtração em gel separa as proteínas em função do seu tamanho.

A selecção dos métodos cromatográficos para purificar as lipases microbianas depende da preparação inicial da lipase e dos esquemas de purificação a utilizar. Os procedimentos de purificação das lipases são, normalmente, problemáticos e resultam em rendimentos finais de actividade reduzidos. (Saxena, R., *et al.*, 2003)

Chartrain *et al.*, (1993) purificaram a lipase de *P. aeruginosa* MB5001 usando um procedimento de três passos, ou seja, usaram a ultrafiltração seguida de cromatografia de troca iónica e de filtração em gel. A lipase apresentava uma massa molar de 29 kDa por SDS-PAGE, uma actividade máxima a 55°C e um pH óptimo de 8. (Sharma, R., *et al.*, 2001)

O IMAC baseia-se na afinidade entre uma proteína e um metal de transição, permitindo a separação, purificação e análise estrutural topológica de proteínas. Consiste na interação entre proteínas presentes em solução e iões metálicos imobilizados em suporte sólido contendo metais de transição (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} ou Co^{2+}), através dos grupos electro-doadores presentes nas cadeias

laterais dos aminoácidos das proteínas (histidina e cisteína) que se apresentam à sua superfície, de modo a haver interações com os metais de transição.

Esta imobilização pode ser feita através da ligação de um grupo quelante à matriz cromatográfica, tal como ácido iminodiacético (IDA) a uma matriz cromatográfica (Sephacrose 6B, Sepharose 4B ou Sephadex G-100). A retenção em IMAC apenas é possível através da formação de um complexo ternário entre o quelato, ião metálico e a proteína. (Karmali, A., 2000)

1.7. Imobilização da lipase

A imobilização da lipase é uma opção para reduzir o custo de produção de biodiesel, onde se imobiliza, ou se confina, a lipase num suporte sólido ou numa região espacial., Deste modo, depois de ocorrer a transesterificação para a produção de biodiesel, a lipase é facilmente separada do produto final e poderá ser reutilizada várias vezes na mesma reacção. As técnicas de imobilização de enzimas podem ser a adsorção, o aprisionamento ou método de oclusão (*entrapment*), por ligação covalente e a encapsulação e a ligação cruzada (*cross-linking*). Estas técnicas de imobilização são alvo de estudo para as diversas lipases pois são uma mais valia para a produção de biodiesel. (Ghaly, A. *et al.*, 2010)

A imobilização de lipases facilita a separação dos produtos de uma determinada reacção, aumenta a flexibilidade do contacto da enzima com o substrato e melhora as propriedades das lipases (como a termoestabilidade e a actividade enzimática em meios não aquosos).

A imobilização da lipase permite aumentar a área do catalisador tornando-se a enzima mais estável, a lipase pode ser regenerada e reutilizada e a lipase não é inibida pela utilização de solvente (Knezevic, Z., *et al.*, 2004)

A imobilização de uma enzima tem que ter em conta alguns critérios para se obter um sistema eficiente de imobilização. Os critérios que têm que ser otimizados são os seguintes. (Knezevic, Z., *et al.*, 2004)

- Tipo de lipase;
- Sistema de reação (sistema aquoso, solventes orgânicos ou sistema de duas fases);
- Condições do processo (temperatura, pH e pressão);
- Configuração do bioreactor e regime de operação;
- Objectivo da imobilização.

Cada método de imobilização apresenta as suas vantagens e os seus inconvenientes devido às alterações na actividade enzimática, na temperatura e pH óptimos e na estabilidade da enzima.

A adsorção baseia-se na adsorção física e/ou por ligação iónica da lipase na superfície de um suporte. As ligações que se estabelecem entre enzima e suporte são ligações fracas, como de Van der Waals, ligações de hidrogénio e interações hidrofobas. Em sistemas não aquosos, este tipo de imobilização pode ser muito útil pois a desadsorção da lipase pode ser desprezada devido à reduzida solubilidade da lipase em solventes orgânicos.

O método de adsorção depende de factores, tais como pH, força iónica, ponto isoeléctrico da lipase utilizada, a superfície e as propriedades da proteína e a dependência cinética da lipase. (Knezevic, Z., *et al.*, 2004)

As vantagens, os inconvenientes e os tipos de suporte para a adsorção encontram-se na tabela 10.

Tabela 10 - Método de Imobilização – Adsorção (Knezevic, Z., *et al.*, 2004)

| Adsorção | |
|-------------------------------|---|
| Vantagens | Inconvenientes |
| Mais barata | Ligações fracas entre enzima e suporte |
| Mais fácil | |
| Regeneração do biocatalisador | A enzima pode ser desadsorvida do suporte |
| Útil em sistemas não aquosos | |

| Tipos de suporte | |
|-------------------|---------------|
| Óxido de alumínio | Poliétileno |
| Sílica | Polipropileno |
| Celite | Poliestireno |
| Cerâmicas | Nylons |
| Óxidos metálicos | Poliacrilatos |
| Vidro poroso | Celulose |
| Sepharose | Zeólitos |
| Sephadex | |

A ligação covalente é realizada por moléculas activas que formam uma ligação covalente entre a enzima e o agente químico, tais como o brometo de cianogénio (CNBr) e o glutaraldeído (GA).

Os suportes utilizados, neste método de imobilização, não possuem grupos reactivos que possam acoplar com a enzima directamente sendo necessário activar os seus grupos funcionais. Os grupos funcionais que serão activados são os hidroxilos, amino, amida e grupos carboxílicos.

As vantagens, os inconvenientes e os tipos de suporte para a ligação covalente encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 - Método de Imobilização - Ligação Covalente (Knezevic, Z., et al., 2004)

| Ligação Covalente | |
|--|--|
| Vantagens | Inconvenientes |
| Diminuição de restrições difusionais do substrato/produtos | Activação do suporte |
| Aumento da estabilidade da enzima | A aplicação dos suportes orgânicos e a sua activação é realizada apenas por algumas técnicas |
| Elevada estabilidade na ligação enzima-suporte | |

| Tipos de suporte | |
|----------------------------------|----------------------|
| Óxido de alumínio poroso | Amido |
| Óxidos metálicos | Quitina |
| Aço inoxidável | Sepharose |
| Vidro de poros controlados (CPG) | Polímeros sintéticos |
| Celulose | |

O método de imobilização por aprisionamento baseia-se em aprisionar a enzima numa matriz em forma de malha. A reduzida porosidade da matriz, que mantém a enzima dentro do suporte, proporciona a difusão do substrato ou dos produtos.

O encapsulamento consiste na imobilização da enzima no interior de esferas, cuja membrana é um polímero semipermeável. O Microencapsulamento consiste em confinar a enzima no interior de micelas.

As vantagens, os inconvenientes e os tipos de suporte para o aprisionamento encontram-se na tabela 12.

Tabela 12 - Método de Imobilização - Aprisionamento/Encapsulação (Knezevic, Z., et al., 2004)

| Aprisionamento | |
|--|--|
| Vantagens | Inconvenientes |
| A enzima têm um contacto mais próximo com a solução envolvente | Alguns suportes utilizados apresentam problemas de difusão e de libertação da enzima |
| | Reduzida eficiência de aprisionamento |
| Preserva a mobilidade da enzima | Possibilidade da enzima se incorporar na parede da membrana |
| Permite o aumento da actividade da enzima | Restrição do substrato para as substâncias de baixo peso molecular |
| | Ruptura da membrana do suporte |

| Tipos de suporte |
|---|
| Alginato |
| Cross-linked com cadeias lineares de iões Ca^{2+} |
| Gelatina |
| Agarose |
| Carragenina |
| Quitina |
| Quitosana |
| Polímeros sintéticos |

O cross-linking resulta da formação e da precipitação de agregados enzimáticos da proteína, sem perturbar a sua estrutura terciária, adicionando solventes orgânicos, polímeros não iónicos ou sais a uma solução aquosa de proteínas. A formação de agregados físicos ocorre devido à alteração no estado de hidratação das moléculas enzimáticas e por alteração da sua constante electrostática. Posteriormente, os agregados físicos formam uma estrutura mais estável devido à adição de uma agente de ligação cruzada (*cross-linking*). Este agente estabelece ligações covalentes entre as moléculas da enzima tornando-as insolúveis permanentemente.

Esta técnica apresenta as vantagens da enzima manter a sua actividade enzimática, a estrutura produzida apresenta uma elevada estabilidade, não ser necessário um passo de purificação nem ser necessário um suporte de imobilização, o custo de produção é reduzido, simplicidade e uma vasta aplicabilidade. No entanto é necessário optimizar a quantidade de agente de ligação cruzada com a quantidade de enzima a utilizar. (Torres, M., et al., 2013)

A comparação entre os diversos métodos de imobilização encontra-se na tabela 13.

Tabela 13 - Comparação dos diferentes métodos de imobilização (Gupta, V., et al., 2013)

| Características | Aprisionamento | Ligação covalente | Ligação cruzada | Adsorção |
|--------------------------------------|----------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------|
| Protecção contra microrganismos | Sim | Não | Possível | Não |
| Processo de imobilização | Difícil | Difícil | Difícil | Fácil |
| Interação | Forte | Forte | Forte | Fraca |
| Natureza da imobilização | Irreversível | Irreversível | Irreversível | Reversível |
| Recuperação da actividade da lipase | Elevada | Reduzida | Moderada | Reduzida |
| Perda de enzima | Sim | Não | Não | Sim |
| Regeneração da lipase imobilizada | Impossível | Impossível | Impossível | Possível |
| Custo de imobilização | Reduzido | Elevado | Moderado | Reduzido |
| A eficiência da imobilização depende | Natureza do polímero | Superfície dos grupos -CHO do suporte e dos resíduos aminoacídicos da enzima | Interação entre a enzima e o suporte | pH, temperatura e força iónica |
| Estabilidade da enzima | Elevada | Elevada | Elevada | Reduzida |
| Centro activo | Não é afectado | É afectado | É afectado | Não é afectado |
| Limitação de transferência de massa | Sim | Não | Não | Não |

1.8. Valorização do sub-produto (glicerol) para tornar o processo economicamente mais viável

A molécula de glicerol apresenta três grupos hidróxilo OH ligados a três átomos de carbono. Deste modo, a molécula de glicerol pode ser utilizada para várias reacções químicas e biológicas valorizando, assim, o glicerol e tornando o processo de transesterificação economicamente mais viável. No entanto, o glicerol também pode ser utilizado directamente em várias indústrias e em vários produtos, não excedendo o consumo a sua produção. (Umpierre, A. e Machado, F., 2013)

Uma rota química será a polimerização do glicerol formando polímeros biodegradáveis e com boas propriedades mecânicas, tais como, os poliésteres e os poliuretanos, as resinas alquídicas (utilizadas em tintas e para

revestimentos) e epóxicas, as poliolefinas, entre outros. Uma outra alternativa será a utilização do glicerol em processos de pirólise e de gaseificação para a produção de gás de síntese.

A oxidação catalítica do glicerol leva à formação de álcoois, que por sua vez, conduz à produção de gliceraldeído, ácido glicérico, ácido hidroxipirúvico, di-hidroxiacetona, ácido mesoxálico, entre outros. Estes produtos são de alto valor acrescentado comparado com o glicerol. Alguns produtos derivados do glicerol e a sua aplicabilidade encontram-se na figura 6. (Mota, C., *et al.*, 2009)

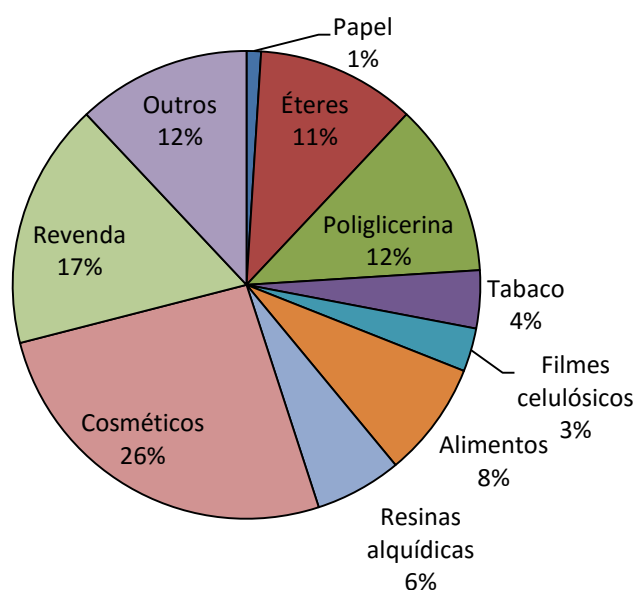


Figura 6 – Principais indústrias que utilizam a glicerina como matéria-prima [Bondioli, P., 2003]

Emprega-se o nome glicerol ao componente químico puro 1,2,3-propanotriol. O nome glicerina emprega-se aos produtos comerciais purificados que contêm pelo menos 95% de glicerol.

A glicerina tem uma vasta aplicabilidade nas indústrias de cosméticos, na higiene pessoal, nos alimentos, nos medicamentos, aditivo para combustíveis, surfactantes e solventes. Também pode sofrer transformações químicas apresentando aplicações na produção de explosivos e de resinas alquídicas. Alguns destes exemplos encontram-se na tabela 14.

Tabela 14 - Produtos derivados do glicerol e sua aplicação (Mota, C., et al., 2009)

| | | Aplicabilidades |
|---------------------------|---|---|
| | Cetais | |
| | Acetais como [1,3]-dioxan-5-ol e [1,3]-dioxolan-4-metanol | Aditivo para combustíveis, surfactantes e solventes |
| | Éteres de glicerina como mono, di e tri t-butil-glicerol | Aditivo para combustíveis e solventes |
| | 1-alkil-glicerol monoéteres | Perfumes, tintas e surfactante |
| | Oligomerização do glicerol | Surfactantes não iônicos |
| | Mono e diacilgliceróis | Surfactantes |
| Acetinas | Monoacetina (ou monoacetato de glicerol) | Fabricação de explosivos, agente gelatinizante e solvente para tinturas |
| | Diacetina | Lubrificante, agente amaciante e solvente |
| | Triacetina | Fabricação de filtros de cigarros, fixador de perfume, cosméticos e fungicidas |
| | Acroleína | Produção de metionina |
| | Ácido Acrílico | Polímeros super absorventes (fraldas), tintas e adesivos |
| Hidrogenólise do glicerol | 1,2 propanodiol | Agente anticongelante e produção de polímeros |
| | 1,3 propanodiol | Produção de fibras sintéticas de poliésteres |
| | Propeno | Plásticos |
| Oxidação do glicerol | 1,3-di-hidróxi-acetona (DHA) | Bronzeadores e polímeros |
| | Gliceraldeído | Intermediário no metabolismo de hidrocarbonetos |
| | Gás de síntese | Síntese de metanol |
| | Epiclorohidrina | Intermediário usado na produção de resinas e polímeros. |
| | Carbonato de glicerina | Solvente e monômero na preparação de policarbonatos, poliésteres, poliuretanos e poliamidas |

1.8. Uso de células intactas para produção de biodiesel

Uma alternativa à utilização da lipase para a produção de biodiesel é utilizar as células intactas, ou seja, utilizar as células do microrganismo que produz a lipase. A utilização de células intactas para a produção de biodiesel é uma

tecnologia relativamente nova e que denota vantagens no custo de produção do biodiesel e na sua simplificação. (Aguieiras, E., *et al.*, 2015)

Utilizando enzimas extracelulares é necessário a purificação e a imobilização da lipase. Utilizando as enzimas intracelulares consegue-se utilizar as células intactas como catalisadores sem os processos de purificação e de imobilização apresentando vantagens como o reduzido custo do biocatalisador. Recentemente, tem-se utilizado *Rhizopus* spp. para a produção de biodiesel utilizando células intactas, como se verifica na tabela 15. (Jin, G. e Bierma, T. 2010)

Tabela 15 - Exemplos de produção de biodiesel catalisada por células inteiras (Aguieiras, E., *et al.*, 2015)

| Biocatalisador | Grupo acil | Álcool | Condições optimizadas | Rendimento e tempo |
|---------------------------|--|---------|---|--------------------|
| <i>Rhizopus chinensis</i> | Óleo de soja | Metanol | Sem adição de solvente com uma proporção de 3:1 de metanol/óleo e adições sucessivas do álcool, a 30°C e com um conteúdo de água de 2% (v/v) | 86% em 72h |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | Óleo de soja | Metanol | Sem adição de solvente com uma proporção de 3:1 de metanol/óleo e adições sucessivas do álcool, a 35°C e com um conteúdo de água de 15% (v/v) | 91,1% em 70h |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | Óleo de jatrofa | Metanol | Sem adição de solvente com uma proporção de 3:1 de metanol/óleo e adições sucessivas do álcool, a 30°C e com um conteúdo de água de 5% (v/v) | 80% em 60h |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | Óleo de soja | Metanol | Reactor de com adição de metanol em quatro passos | 90,9% em 50h |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | Óleo não comestível de <i>Calophyllum inophyllum</i> | Metanol | Reactor com uma proporção de metanol/óleo de 12:1, a 35°C e com um conteúdo de água de 15% (v/v) e sem adição de solvente | 87% em 72h |

1.9. Métodos de doseamento de biodiesel

Utilizam-se vários métodos de doseamento de biodiesel, tais como métodos cromatográficos, fluorescência e métodos colorimétricos, como se

verifica na tabela 16. Os mais utilizados são os métodos cromatográficos como a cromatografia em coluna, cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC), cromatografia de troca iônica, cromatografia de camada fina (TLC) e cromatografia de exclusão molecular (SEC). (Yahaya, M., *et al.*, 2013).

A TLC é usado devido à sua simplicidade, ao seu custo reduzido e é um método que analisa e que se verifica, visualmente, a separação dos diversos componentes de diferentes soluções. Este método é utilizado tanto para determinar os componentes do biodiesel como para determinar a existência de glicerol nas amostras. (Bansal, K. *et al.*, 2008)

Tabela 16 - Métodos cromatográficos utilizados para doseamento de biodiesel (P. L. Ivon e L. C. F. Sérgio, 2009)

| Método | Designação | |
|----------------------------------|--|---|
| TLC/FID | Cromatografia em camada fina (TLC) com detecção por ionização de chama (FID) | Detecção de ésteres metílicos, mono-, di- e triglicéridos. Baixa precisão, método sensível à humidade e equipamento apresenta um custo elevado. |
| HTGC/FID | Cromatografia gasosa a temperaturas elevadas (HTGC) com FID | Análise de ésteres, mono-, di- e triglicéridos em simultâneo. Método rápido. |
| HPLC | Cromatografia líquida de eficiência elevada | Detecção de ésters metílicos, mono-, di- e triglicéridos. |
| GC/MS e GC/FID | Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC/MS) e cromatografia gasosa com FID | Avaliação dos sistemas de detecção FID e MS para análise de glicerol livre. A detecção por MS evita a sobreposição de picos, permitindo o uso de colunas mais curtas. |
| HTGC/FID | Cromatografia gasosa a temperaturas elevadas (HTGC) com FID | Quantificação de glicerol livre, mono-, di- e triglicéridos em simultâneo na mesma corrida cromatográfica. |
| HPLC/API-MS, HPLC/UV e HPLC/ELSD | * | Detecção de determinados ésteres metílicos, mono-, di- e triglicerídeos. UV não quantifica os compostos saturados. API-MS e ELSD apresentam um decréscimo na sensibilidade com incremento das ligações duplas nos ésteres alquílicos. |
| HTGC e HPLC | | Não existe nenhuma diferença significativa entre estes dois métodos. Os produtos de oxidação do biodiesel são detectados por HPLC e não por HTGC. |
| SEC | Cromatografia de exclusão molecular | Na mesma corrida cromatográfica quantificou-se os teores de mono-, di- e triglicéridos, ésteres metílicos, ácidos gordos, glicerol livre e metanol. |
| HTGC | Cromatografia gasosa a temperaturas elevadas (HTGC) | Análise de álcool, glicerol livre, ésteres, mono-, di- e triglicéridos utilizando uma corrida cromatográfica. |

* HPLC com detecção por espectrometria de massa por ionização química à pressão atmosférica (HPLC/API-MS), HPLC com detecção por raios ultravioleta (HPLC/UV) e HPLC com detecção por dispersão de luz evaporativa (HPLC/ELSD)

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Foi usado o azeite de “Castelo de Moura” – Selecção Azeite Virgem Extra, o óleo foi fornecido de casa do Professor Amin Karmali, o óleo usado foi fornecido pela cantina do ISEL e o biodiesel, obtido pelo método tradicional, foi fornecido pelo professor Jaime Puna.

Os reagentes usados foram o Tween 20, os marcadores da SDS-PAGE e da PAGE nativa, acrilamida, imidazole, triton X 100, azul de Comassie, glutaraldeído 25%, *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) e a goma arábica (Sigma-Aldrich, EUA), o di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), sulfato de magnésio anidro (MgSO_4), cloreto de manganês (II) ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), sulfato de amónio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), cloreto de cálcio (CaCl_2), bisacrilamida, azul de bromofenol, nitrato de prata (AgNO_3), formaldeído, hidrogenofosfato de disódio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfato de cobre cristalino (CuSO_4), cloreto de níquel (II) ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cloreto de cobre (II) (CuCl_2), cloreto de zinco (ZnCl_2), tritriplex (EDTA), propanol, indicador de fenolftaleína e de timolftaleína, butanol, permanganato de potássio (KMnO_4), cloreto de cálcio (CaCl_2), o carbono activado, o tiosulfato de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), éter dietílico e a acetilacetona (Merck S.A), o agar (Oxoid, UK), o di-hidrogenofosfato de sódio hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), etanol, hidrogenofosfato de di-potássio anidro (K_2HPO_4) e o periodato de sódio (Panreac), a peptona e o extracto de levedura (Himedia, India), o N,N,N',N' – tetra-metiletilenodiamina (Temed) (Biorad, EUA), o glicerol (Scharlau, Espanha), a glicina, carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3), ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e o hidroximetil-aminometano (TRIS) (Riedel – de Haen, EUA), placas de TLC de sílica (MACHEREY-NAGEL (MG)).

O hidróxido de sódio (NaOH) e o éter de petróleo, o cloreto de sódio (NaCl), o hidrosulfito de sódio ou diotionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), o acetato de etilo, o metanol e o alginato de sódio foram adquiridos à Pronolab (EUA), na VWR Chemicals Prolabo, na M&B (Canadá), ao José Manuel Gomes dos

Santos (Portugal), na Fisher e na Fagron, respectivamente. As lipases imobilizadas comerciais foram adquiridas à Novozymes.

2.1.2. Equipamento

O equipamento utilizado está a seguir discriminado: um medidor de pH (da WTW multical), leitor de microplacas de 96 poços (Biorad – Biorad Model 680, microplate reader), centrífuga com rotor de microplacas de 96 poços (da Hermle, Alemanha), centrífuga de tubos eppendorfs (MiniSpin eppendorf, EUA), agitador vortex (da Labnet VX100, Canadá), incubadora com agitação orbital (Certomat-H, Reino Unido), incubadora com agitação orbital (daGallenkamp, Reino Unido), incubadora com agitação orbital (Gallenkamp, Reino Unido, modelo antigo), balança técnica (Kern 444-33, Alemanha), balança analítica (Kern ALS 120-4, Alemanha), autoclave (de A. J. Costa (irmãos) LDA, A.J.C, Portugal), agitador com aquecimento (Tehtnica RotaMix SHP-10) e banho termoestabilizado (Reagentes – Química e Electrónica LDA, Portugal).

2.2. Métodos

2.2.1. Cultivo e manutenção de estirpes bacterianas em meio de cultura sólido

As três estirpes bacterianas mutantes (*Ph3B*, *A13* e *L10*) de *Pseudomonas aeruginosas* foram cultivadas a temperatura de 37°C e mantidas em cinco meios de cultura sólidos a pH 7.2

O meio de cultura A continha 2 g de agar, 1 mL de azeite, 0.3 g de extracto de levedura, 0.1 g de peptona, 70 mg de K_2HPO_4 , 30 mg de KH_2PO_4 , 50 mg de $MgSO_4$, 10 mg de $MnCl_2$, 25 mg de $(NH_4)_2SO_4$ e 10 mg de $CaCl_2$, num volume final de 100 mL de água desmineralizada.

Foram feitos dois meios de cultura B. O meio de cultura B continha 2 g de agar, 1 mL de Tween 20, 0.3 g de extracto de levedura, 0.1 g de peptona, 70 mg de K_2HPO_4 , 30 mg de KH_2PO_4 , 50 mg de $MgSO_4$, 10 mg de $MnCl_2$, 25 mg de $(NH_4)_2SO_4$ e 10 mg de $CaCl_2$, num volume final de 100 mL de água desmineralizada. O meio de cultura B' apresentou a mesma composição

química que o meio de cultura B com a excepção da substituição de Tween 20 por óleo usado.

O meio de cultura C continha uma composição química igual ao meio de cultura A, à excepção da peptona e do extracto de levedura.

O meio de cultura D continha uma composição química igual ao meio de cultura A, à excepção da peptona, do extracto de levedura e da substituição do azeite por óleo usado.

2.2.2. Produção de lipase a partir de estirpes bacterianas em meio de cultura líquido

Para a produção da lipase, as estirpes foram inoculadas em quatro meios de cultura líquidos diferentes com um volume de meio de cultura de 25 mL. Os meios de cultura líquidos A, B, B', C e D apresentam a composição química acima mencionada com a excepção da remoção do agar.

Para a realização deste estudo foram usadas três estirpes mutantes da *P. aeruginosa* (*AI3*, *Ph3B* e *L10*) e três meios de cultura (meio de cultura com azeite (A), meio com tween 20 (B) e meio de cultura com óleo usado (B')). As estirpes foram cultivadas a 37°C e a 150 rpm numa incubadora com agitação orbital durante 6 dias (para os meios de cultura A, B, C e D) e ao fim de 4 dias (para o meio de cultura B') e as amostras foram retiradas a determinados intervalos de tempo e centrifugadas a 13000 rpm durante um minuto e o sobrenadante e o sedimento foram conservados a – 20°C. Seguidamente o doseamento enzimático destas amostras nos sobrenadantes foi efectuado de acordo com o procedimento 2.2.6.

2.2.3. Produção da lipase em balões maiores de erlenmeyers a partir de estirpes bacterianas

Por fermentação no estado submerso, as estirpes *Ph3B*, *AI3* e *L10* foram cultivadas em balões de erlenmeyers de 100 mL contendo 25 mL de cada meio de cultura líquido durante um dia (o meio de cultura A continha azeite e o meio de cultura B' continha óleo usado). No dia seguinte retiraram-se amostras, registou-se a A_{540} e doseou-se a actividade enzimática das lipases. No dia seguinte, os balões de erlenmeyers de 1 L contendo 230 mL de meio de cultura

A e de meio de cultura B foram inoculado com 1% do inoculo previamente crescido. A incubação das culturas foi realizada numa incubadora com agitação orbital a 37°C e a 150 rpm. Nos dias seguintes, as amostras da cultura foram retiradas com vista à leitura da A_{540} e doseamento da actividade enzimática das lipases em função do tempo de cultivo.

2.2.4. Crescimento e manutenção de estirpes fúngicas em meio de cultura sólido

Os fungos da classe de Basidiomicetos, *Phlebia rufa* (PM), *Ganoderma lucidum violeta* (GV), *Pleurotus ostreatus* (PO) e *Ganoderma carnosum* (G) foram cultivados à temperatura de 25°C e mantidos em três meios de cultura sólidos a pH 5.5.

O meio de cultura A continha 4 g de agar, 2 mL de azeite, 2 g de peptona, 1 g de NaCl, 20 mg de CaCl_2 , 140 mg de K_2HPO_4 , 60 mg de KH_2PO_4 , 100 mg de MgSO_4 num volume final de 200 mL de água desmineralizada.

O meio de cultura B continha 4 g de agar, 2 mL de óleo usado, 2 g de peptona, 1 g de NaCl, 20 mg de CaCl_2 , 140 mg de K_2HPO_4 , 60 mg de KH_2PO_4 , 100 mg de MgSO_4 num volume final de 200 mL de água desmineralizada.

O meio de cultura C continha 4 g de agar, 2 mL de Tween 20 peptona, 1 g de NaCl, 20 mg de CaCl_2 , 140 mg de K_2HPO_4 , 60 mg de KH_2PO_4 , 100 mg de MgSO_4 num volume final de 200 mL de água desmineralizada.

2.2.5. Produção de lipase a partir das estirpes fúngicas em meio de cultura líquido

Para a produção da lipase, as estirpes fúngicas foram inoculadas em dois meios de cultura líquidos diferentes, por fermentação no estado submerso, durante 14 dias com um volume de meio de cultura de 50 mL. Os meios de cultura líquidos A e B apresentam a mesma composição química acima mencionada dos meios de cultura A e C, respectivamente, à excepção do agar.

Para a realização deste estudo foram usadas quatro estirpes da classe de Basidiomicetos, *Phlebia rufa* (PM), *Ganoderma lucidum violeta* (GV), *Pleurotus ostreatus* (PO) e *Ganoderma carnosum* (G), e dois meios de cultura (meio de cultura com azeite (A) e meio de cultura com Tween 20 (B)). As estirpes foram cultivadas a 25°C e a 150 rpm numa incubadora com agitação

orbital durante 14 dias e as amostras foram retiradas a determinados intervalos de tempo e centrifugadas a 13000 rpm durante um minuto e o sobrenadante e o sedimento foram conservados a -20°C . Seguidamente o doseamento enzimático destas amostras nos sobrenadantes e nos sedimentos foi efectuado de acordo com o procedimento 2.2.6.

2.2.6. Doseamento da actividade enzimática da lipase

A actividade enzimática da lipase foi medida através de espectrofotometria na região do visível, que consiste na hidrólise de *p*-NPP produzindo *p*-nitrofenol.

A solução de *p*-NPP foi preparada da seguinte forma: 6.229 mg de *p*-NPP, 1 mL de 2-propanol, 0.04 g de Triton X 100, 0.01 g de goma arábica em 10 mL de Tampão Tris-HCl 20mM pH 8. A mistura reaccional continha 80 μL de solução de substrato e 20 μL de solução de amostra da enzima e a actividade enzimática foi monitorizada a A_{415} no leitor de microplacas de 96 poços durante um período de tempo apropriado. O coeficiente de extinção molar de *p*-NPP é de $\epsilon = 18.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Uma unidade internacional de enzima (1 U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produção de 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto em determinadas condições experimentais. (Zivkovic, L., *et al.*, 2015)

2.2.6.1. Doseamento da actividade de lipase nas células intactas de *P. aeruginosa* Ph3B

O doseamento da actividade enzimática das células de *Ph3B* foi realizado em microplacas de 24 poços, onde se colocou 6 μL de células e 150 μL de *p*-NPP e incubou-se a microplaca durante 15 minutos a 37°C . Em seguida, centrifugou-se a microplaca, retiraram-se 100 μL de sobrenadante que foi lido a A_{415} como leitura ponto final.,

2.2.7. Doseamento de proteína

O doseamento de proteína no caldo de fermentação e nas fracções purificadas foi determinado pelo método de ligação do corante de azul de Comassie. Estes ensaios foram realizados em triplicados usando BSA como proteína padrão (Bradford, M., 1976).

2.2.8. Planeamento experimental para otimização das condições de produção de lipase

Este estudo sistemático foi organizado por um factorial completo de dois níveis em três factores, em duplicados, num total de oito experiências. Este planeamento foi concebido com dois níveis de temperatura (25°C e 37°C) e com dois níveis de meio de cultura (azeite e óleo usado) e de estirpe (*A13* e *Ph3B*) como variáveis categóricas. A resposta medida foi a actividade enzimática da lipase.

Os níveis inferiores (-) e superiores (+) foram seleccionados de acordo com os resultados obtidos num estudo preliminar. A matriz de teste foi desenvolvida e os dados obtidos foram introduzidos na equação do modelo factorial da seguinte forma:

$$y = \beta_0 + \beta_A x_A + \beta_B x_B + \beta_C x_C + \beta_{AB} x_A x_B + \beta_{AC} x_A x_C$$

Onde y é a variável de resposta da actividade da lipase, β_0 é a média de todas as respostas, os β são os coeficientes de regressão e os x são as variáveis de previsão. A análise estatística do modelo foi avaliada de acordo com a metodologia ANOVA. (Semedo, M., *et al.*, 2015)

2.2.9. Preparação das matrizes cromatográficas de IMAC

De acordo com a literatura (Armisen P. *et al.*, 1999), preparou-se um gel de agarose epoxi-activado contendo um braço espaçador, éter 1,4-butanediol diglicidílico (BDGE). A matriz de agarose contém 30 μmol de grupos epóxi por mL de gel sedimentado. A agarose epoxi-activada reagiu com um agente quelante, o ácido iminodiacético (IDA), e com a fase estacionária obtendo-se a Sepharose 6B-BDGE-30-IDA ou BDGE 30. A matrix cromatográfica foi lavada com água e foi conservada a 4°C em 0.01% (m/v) de solução de azida de sódio. Foram preparados suportes cromatográficos com grupos epóxi por mL de gel sedimentado contendo epicloridrina (EPI), como braço espaçador. As fases estacionárias que se obtiveram são a Sepharose 6B epoxi-activada com epiclorohidrina-ácido imino diacético (R6), Sepharose 6B epoxi-activada com butanodiol-diglicidil éter- ácido imino diacético (R2), Sepharose 4B epoxi-

activada com butanodiol-diglicidil éter- ácido imino diacético (R3) e Sepharose 4B epoxi-activada com epiclorohidrina-ácido imino diacético (R4).

2.2.10. Comportamento cromatográfico das lipases das estirpes de *P. aeruginosa* Ph3B e L10, *Phlebia rufa* (PM) e *Ganoderma lucidum violeta* (GV) em quelatos de metal imobilizados (IMAC)

Foram utilizadas as microplacas de 96 poços para se estudar a adsorção da lipase de *P. aeruginosa* Ph3B e L10, de PM e de GV em suportes de quelatos de metal imobilizados de Cu(II), Ni(II), Zn(II) e Co(II). As enzimas foram diluídas em tampão fosfatos de sódio 20 mM contendo NaCl 1M ao pH correspondente. Foram testados três valores de pH (pH 6, pH 7 e pH 8) para se verificar as melhores condições que promovem a melhor adsorção da enzima com os quelatos de metais. A desadsorção da enzima dos quelatos de metais foi efectuada através de tampão fosfatos 20 mM contendo NaCl 1M e imidazole 500 mM.

Estas experiências foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicados.

2.2.11. Purificação das lipases das estirpes mutantes de *P. aeruginosa* Ph3B e A13

De acordo com os resultados do comportamento cromatográfico realizado em microplacas de 96 poços, foram seleccionados um conjunto de condições experimentais com vista à purificação da lipase da estirpe de *P. aeruginosa*.

Foi preparada uma coluna contendo 5 mL de resina 6 sedimentada. A resina 6 foi lavada com 20 mL EDTA, água, 50 mM de sulfato de cobre, água e depois com 20 mL de tampão de equilíbrio a pH correspondente. A amostra de enzima foi diluída 1:2 em tampão de equilíbrio e foi aplicada à coluna a um caudal de 15 mL/h . De seguida, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio e recolheram-se as fracções cromatográficas. À medida que se foram recolhendo as fracções a absorvância das mesmas foi lida a 280 nm. Assim que a absorvância das fracções foi menor que 0.05 procedeu-se à desadsorção da enzima com um gradiente linear de imidazole (de 0-500 mM e de 0-250 mM) a um caudal de 30 mL/h. As fracções foram doseadas enzimaticamente e analisadas em função da A_{280} .

2.2.12. Análise eletroforética por SDS e Page Nativa das lipases das estirpes A13 e Ph3B de *P. aeruginosa*

Devido à inactivação da enzima a temperaturas elevadas com o SDS-PAGE, as amostras contendo a enzima foram diluídas 1:2 com tampão de aplicação e foram colocadas a uma temperatura de 100°C. De seguida as amostras foram centrífugadas e foram aplicadas nos poços dos géis.

Os géis de electroferese para a SDS-PAGE e para a PAGE Nativa foram preparados com um gel de resolução de 10% e de 7.5%, respectivamente.

Para a SDS-PAGE e para a PAGE Nativa, depois da corrida electroforética, os géis foram cortados ao meio. Uma das metades teve como objectivo a coloração com nitrato de prata. (Pick n Post, *Protocol for Silver Staining of gels*). A outra metade foi utilizada para detectar a actividade da lipase *in situ*.

Para a detecção da actividade da lipase, uma das metades do gel foi colocada na solução do substrato da lipase (*p*-NPP) sob agitação.

2.2.13. Imobilização da lipase

A imobilização da lipase foi realizada através da encapsulação com alginato de cálcio e através de um método covalente utilizando GA.

2.2.13.1. Método de encapsulação com alginato de cálcio

Pelo método de encapsulação com alginato de cálcio, foi preparada uma solução de 4% (m/v) de alginato de sódio e uma solução de 2% (m/v) de cloreto de cálcio (CaCl₂). Na solução de alginato de sódio, foram colocados 2 mL de enzima da estirpe *P. aeruginosa* Ph3B (apresenta actividade enzimática de 0.102 UI/mL) e com o auxílio de uma micropipeta automática obtiveram-se partículas esféricas de 3 a 4 mm de diâmetro na solução de CaCl₂ (aqui irá haver uma troca dos iões cálcio com os iões sódio criando, assim, uma matriz de alginato de cálcio que retêm as lipases no seu interior). A solução de cloreto de cálcio foi suavemente agitada durante 30 min à temperatura ambiente e as partículas de alginato de cálcio contendo a lipase foram obtidas por filtração da solução de CaCl₂. Estas partículas da enzima imobilizada foram conservadas em tampão de fosfatos 25 mM a pH 8 e a 4°C. (Pashova, S., *et al.*, 1999)



Figura 7 – Lipase encapsulada em alginato de cálcio

2.2.13.2. Método covalente utilizando glutaraldeído

Através do método com GA, foi utilizada uma microplaca de 96 poços e de 24 poços de cultura de tecidos como suporte de imobilização.

Nos poços da microplaca de 96 poços, adicionou-se 10 μL , 20 μL , 40 μL , 60 μL , 80 μL e 100 μL de lipase livre da estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* e deixou-se secar à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se 25% (v/v) de GA com diferentes concentrações (2%, 4%, 6%, 10%, 15% de GA e sem GA) e deixou-se secar. Lavou-se os poços três vezes com tampão de fosfatos 0.1 M a pH 8. A enzima imobilizada foi conservada a 4°C neste mesmo tampão. Realizaram-se três doseamentos de actividade enzimática para se verificar a actividade da lipase imobilizada. Este método foi adaptado de Charneca, A. *et al.*, 2015.

Nos poços da microplaca de 24 poços, adicionou-se 50 μL , 100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL e 500 μL de enzima da estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* e deixou-se secar à temperatura ambiente. Depois da enzima secar, adicionou-se 25% (v/v) de GA com diferentes concentrações (2%, 4%, 6% e 8% de GA) e deixou-se secar à temperatura ambiente. Lavou-se os poços três vezes com tampão de fosfatos 0.1 M a pH 8. Realizou-se dois doseamentos de actividade enzimática para se verificar a actividade da lipase imobilizada.

2.2.14. Doseamento da actividade enzimática da lipase imobilizada em alginato de cálcio

A actividade enzimática da lipase imobilizada e a sua reutilização foram medidas através de espectrofotometria à temperatura ambiente, baseada na hidrólise do substrato *p*-NPP usando uma, duas e três partículas de enzima imobilizada com 100 µL de solução de substrato. A actividade enzimática da lipase foi medida a A_{415} durante 10 minutos. Uma unidade (1 U) é definida como a quantidade de enzima que, sob condições de teste, liberta 1 µmol de *p*-NPP por minuto (ϵ (*p*-NPP) = 18.1 mM⁻¹cm⁻¹).

2.2.15. Doseamento da actividade enzimática da lipase imobilizada em glutaraldeído

A actividade enzimática da lipase imobilizada em glutaraldeído foi medida através de espectrofotometria à temperatura ambiente, baseada na hidrólise do substrato *p*-NPP usando a microplaca de 96 poços e de 24 poços com a lipase imobilizada.

Na microplaca de 96 poços, colocou-se 100 µL de *p*-NPP e doseou-se a actividade enzimática da enzima lendo-se a A_{415} e ao fim de 10 minutos.

Na microplaca de 24 poços, colocou-se 150 µL de *p*-NPP e incubou-se a placa durante 10 minutos. Ao fim deste tempo, retirou-se 100 µL de sobrenadante e leu-se a A_{415} nm. Uma unidade (1 U) é definida como a quantidade de enzima que, sob condições de teste, liberta 1 µmol de *p*-NPP por minuto (ϵ (*p*-NPP) = 18.1 mM⁻¹cm⁻¹).

2.2.16. Produção enzimática de biodiesel catalisada pela lipase de *Pseudomonas aeruginosa Ph3B*

Foi realizada a reacção de transesterificação em microplacas de 48 e de 24 poços utilizando uma mistura reaccional contendo como biocatalisador lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica* (NS-88002 e NS-88003), lipase livre, lipase imobilizada or células congeladas. As células de *P. aeruginosa* (estirpe *Ph3B* cultivadas em meio de cultura com azeite) congeladas, foram descongeladas e a sua actividade enzimática com *p*-nitrofenil palmitato foi quantificada, obtendo-se 0.0198 UI/mL.

A reacção de transesterificação foi efectuada numa mistura reaccional contendo um volume apropriado da suspensão celular da estirpe *Ph3B*, 675 μL de azeite, 90 μL de metanol e 750 μL de tert-butanol. Foram usados volumes diferentes de suspensão celular bem como dois controlos positivos (0,1 g enzima imobilizada comercial I NS-88002 e NS-88003). Nos doseamentos com as lipases comerciais imobilizadas foram adicionados 40 μL de água desmineralizada.

O controlo negativo foi realizado para cada concentração de células usando soro fisiológico. Assim, o controlo negativo continha todos os componentes acima mencionados bem como soro fisiológico a um volume metade da suspensão celular. Uma alíquota foi retirada a $t=0$ e as placas foram colocadas na incubadora com agitação orbital a 40°C e 150 rpm. Foram retiradas alíquotas a tempos de intervalo apropriados sendo as amostras doseadas em termos de quantificação do glicerol e do FAME. (Ji, Q. *et al.*, 2010)

2.2.17. Doseamento do biodiesel

As placas de TLC foram usadas para doseamento de biodiesel. Foram aplicados, às placas, 2 μL das seguintes amostras: 2 μL de controlo negativo (mistura de 4.5 g de azeite, 600 μL de MeOH, 270 μL de água e 5 mL de tert-butanol), metanol e/ou glicerol, e de amostras de biodiesel diluído em óleos (diluições de 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10 e 1:20). As placas de TCL foram transferidas para um recipiente contendo 200 mL de solvente cuja composição era 70:30:1 de éter de petróleo, éter dietílico e ácido acético glacial, respectivamente. A corrida cromatográfica foi efectuada até que o eluente estava a cerca de 1 cm da extremidade superior da placa de TLC. Seguidamente, a placa de TLC foi seca na horizontal e as bandas dos vários componentes químicos foram revelados com vapor de iodo. As placas foram analisadas de acordo com a área das bandas de biodiesel em função da concentração de biodiesel. (Sendzikiene, E. *et al.*, 2014)

As amostras obtidas através da reacção de transesterificação também foram analisadas desta maneira.

2.2.18. Doseamento do glicerol

Este doseamento foi efectuado usando periodato de sódio (reagente I) e acetilacetona (Reagente 2) sendo necessário construir uma recta de calibração de glicerol na gama de 0 a 1.5% (v/v).

O reagente I consistiu em 18 mg/mL de periodato de sódio dissolvido em água desmineralizada contendo 10 % (v/v) de ácido acético sendo agitado adequadamente. Seguidamente, foi adicionado 77 mg/mL de acetato de amónia com agitação e aquecimento.

O reagente II consistiu em 1% (v/v) de acetilacetona em álcool isopropílico. Este reagente foi conservado num frasco coberto com papel de alumínio.

As leituras de A_{415} foram realizadas em microplacas de 96 poços, adicionando 40 μ L de amostra com 40 μ L de reagente I e misturando adequadamente. A microplaca foi incubada durante 10 minutos e seguidamente foi adicionado 125 μ L de reagente II e misturado adequadamente. Após o aparecimento da cor amarela, a microplaca foi centrifugada a 4000 rpm durante 1 min. O sobrenadante (50 μ L) foi retirado dos poços e transferido para uma nova placa e lido a A_{415} no leitor de microplacas. (Kuhn, J. *et al.*, 2015)

3. Resultados e discussão

3.1. Produção de lipase a partir de estirpes bacterianas em meio de cultura líquido

Analisou-se os diferentes meios de cultura para a produção de lipases. Utilizou-se três meios de cultura com peptona e extracto de levedura (meio de cultura A com azeite, meio de cultura B com Tween 20 e meio de cultura B' com óleo usado) e utilizou-se outros dois meios de cultura sem peptona e extracto de levedura (meio de cultura C com azeite e meio de cultura D com óleo). Estes ensaios permitiram verificar se as lipases são produzidas nestes meios sem a peptona e o extracto de levedura.

Os valores de A_{540} lidos no dia seguinte à inoculação, das várias estirpes nos diversos meios de cultura, apresentam-se na tabela 17.

Tabela 17 – A_{540} das culturas bacterianas em diferentes meios de cultura após 24h de incubação (C1 e C2 – colónias)

| | | A_{540} |
|-------------------|------------------|-----------|
| Meio de cultura A | <i>Ph3B</i> , C1 | > 1 |
| | <i>Ph3B</i> , C2 | > 1 |
| | <i>L10</i> , C1 | > 1 |
| | <i>L10</i> , C2 | > 1 |
| | <i>AI3</i> , C1 | > 1 |
| | <i>AI3</i> , C2 | > 1 |
| Meio de cultura B | <i>Ph3B</i> , C1 | > 1 |
| | <i>Ph3B</i> , C2 | > 1 |
| | <i>L10</i> , C1 | > 1 |
| | <i>L10</i> , C2 | > 1 |
| | <i>AI3</i> , C1 | > 1 |
| | <i>AI3</i> , C2 | > 1 |
| Meio de cultura C | <i>Ph3B</i> , C1 | 0,695 |
| | <i>Ph3B</i> , C2 | 0,338 |
| | <i>L10</i> , C1 | 0,634 |
| | <i>L10</i> , C2 | 0,801 |
| | <i>AI3</i> , C1 | 0,377 |
| | <i>AI3</i> , C2 | 0,64 |
| Meio de cultura D | <i>Ph3B</i> , C1 | 0,365 |
| | <i>Ph3B</i> , C2 | 0,26 |
| | <i>L10</i> , C1 | 0,206 |
| | <i>L10</i> , C2 | 0,158 |
| | <i>AI3</i> , C1 | 0,283 |
| | <i>AI3</i> , C2 | 0,333 |

Os valores de A_{540} lidos no dia seguinte à inoculação, das várias estirpes no meios de cultura B', apresentam-se na figura 8.

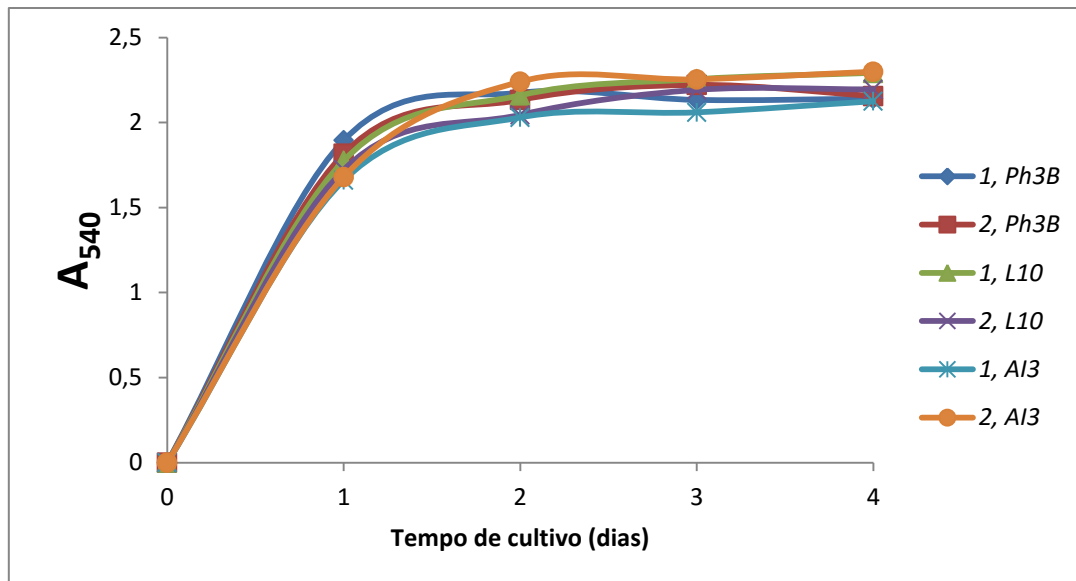


Figura 8 – Curvas de crescimento das culturas bacterianas no meio de cultura B' com óleo usado

A actividade de lipase no caldo fermentativo relativa ao cultivo das diversas estirpes nos diversos meios de cultura apresentam-se nas figuras seguintes.

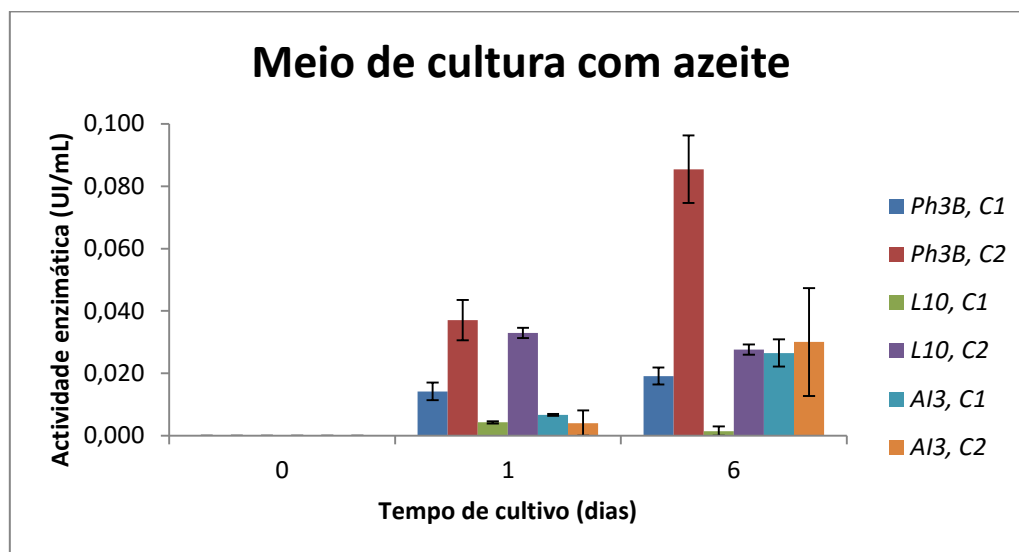


Figura 9 – Actividade enzimática das várias estirpes mutantes bacterianas no meio de cultura A (C1 e C2 – colónias)

De acordo com a figura 9, verifica-se que a estirpe que melhor se adaptou a este meio de cultura foi a estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* apresentando uma actividade enzimática de 0.0370 UI/mL ao fim de 1 dia e 0.0854 UI/mL ao fim de 6 dias. A segunda estirpe com uma elevada actividade enzimática é a estirpe *L10* de *P. aeruginosa* com uma actividade enzimática de 0.0329 UI/mL ao fim de 1 dia.

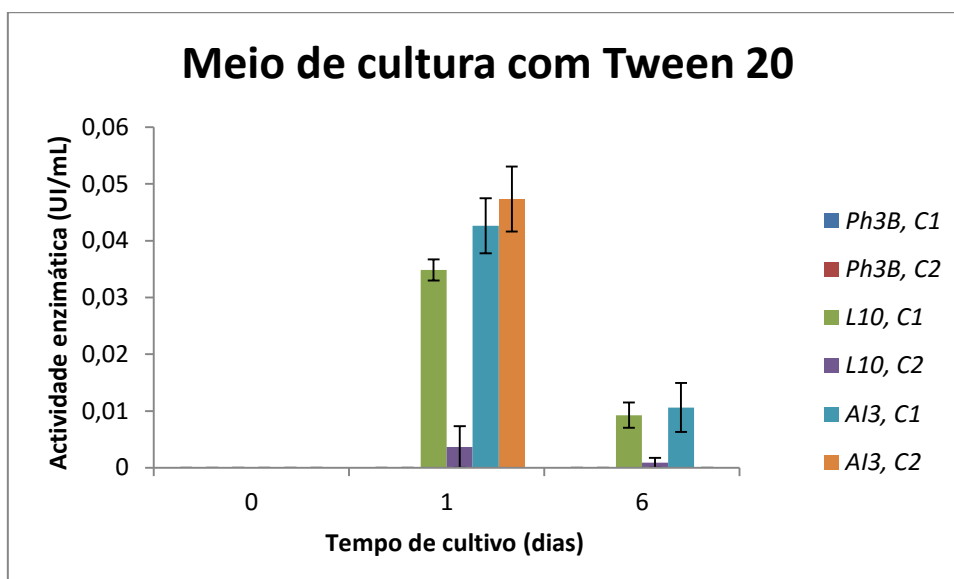


Figura 10 - Actividade enzimática das várias estirpes mutantes bacterianas no meio de cultura B (C1 e C2 – colónias)

De acordo com a figura 10, verifica-se que a estirpe que melhor se adaptou a este meio de cultura foi a estirpe A13 de *P. aeruginosa* apresentando uma actividade enzimática de 0.0473 UI/mL ao fim de 1 dia, seguida da *P. aeruginosa* L10 com uma actividade enzimática de 0.0348 UI/mL ao fim de 1 dia.

Este meio de cultura não possui os nutrientes suficientes para as células sobreviverem durante muito tempo, pois verifica-se que ao fim de 7 dias já quase não há produção de lipase.

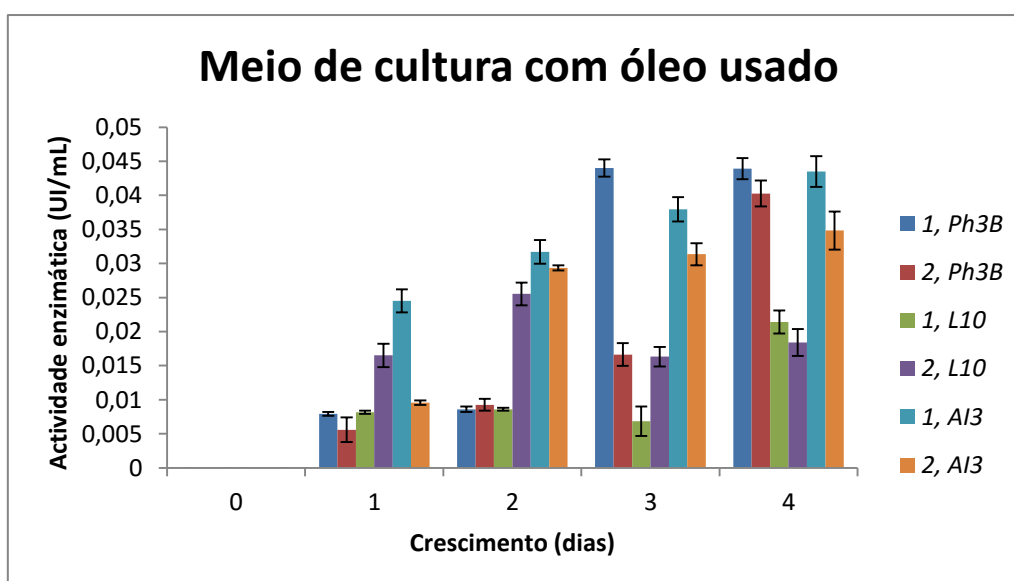


Figura 11 - Actividade enzimática das várias estirpes mutantes bacterianas no meio de cultura B' (1 e 2 – colónias)

De acordo com a figura 11, verifica-se que a estirpe que melhor se adaptou a este meio de cultura foi a estirpe *A13* de *P. aeruginosa* apresentando uma actividade enzimática de 0.0245 UI/mL, ao fim de 1 dia. A estirpe de *P. aeruginosa Ph3B* apresentou a actividade enzimática mais elevada de 0.0440 UI/mL ao fim de 3 dias.

Os caldos fermentativos obtidos com os meios de cultura C e D não apresentaram actividade enzimática para nenhuma das estirpes usadas devido ao facto de que, estes meios de cultura não apresentarem os nutrientes suficientes (peptona e extracto de levedura) para as células crescerem.

A tabela 18 apresenta os valores de actividade enzimática do meio de cultura B' das diversas estirpes bacterianas.

Tabela 18 - Média da actividade enzimática, em UI/mL, do meio de cultura B' inoculado com diversas estirpes bacterianas (1 e 2 – colónias)

| Actividade enzimática (UI/mL) | | | | | |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|
| Dias | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Estirpe bacteriana de <i>P. aeruginosa</i> | 16/11/2015 | 17/11/2015 | 18/11/2015 | 19/11/2015 | 20/11/2015 |
| 1, <i>Ph3B</i> | 0 | 7,92E-03 | 8,60E-03 | 4,40E-02 | 4,39E-02 |
| 2, <i>Ph3B</i> | 0 | 5,58E-03 | 9,24E-03 | 1,66E-02 | 4,03E-02 |
| 1, <i>L10</i> | 0 | 8,15E-03 | 8,58E-03 | 6,83E-03 | 2,14E-02 |
| 2, <i>L10</i> | 0 | 1,65E-02 | 2,55E-02 | 1,63E-02 | 1,84E-02 |
| 1, <i>A13</i> | 0 | 2,45E-02 | 3,17E-02 | 3,80E-02 | 4,35E-02 |
| 2, <i>A13</i> | 0 | 9,57E-03 | 2,94E-02 | 3,14E-02 | 3,48E-02 |

3.2. Produção da lipase em grande escala (balões de erlenmeyers) a partir de estirpes bacterianas

Analisou-se qual a melhor estirpe bacteriana para a produção da lipase extracelular. Os valores lidos de A_{540} das várias estirpes nos diversos meios de cultura, apresentam-se na figura 12 e 13.

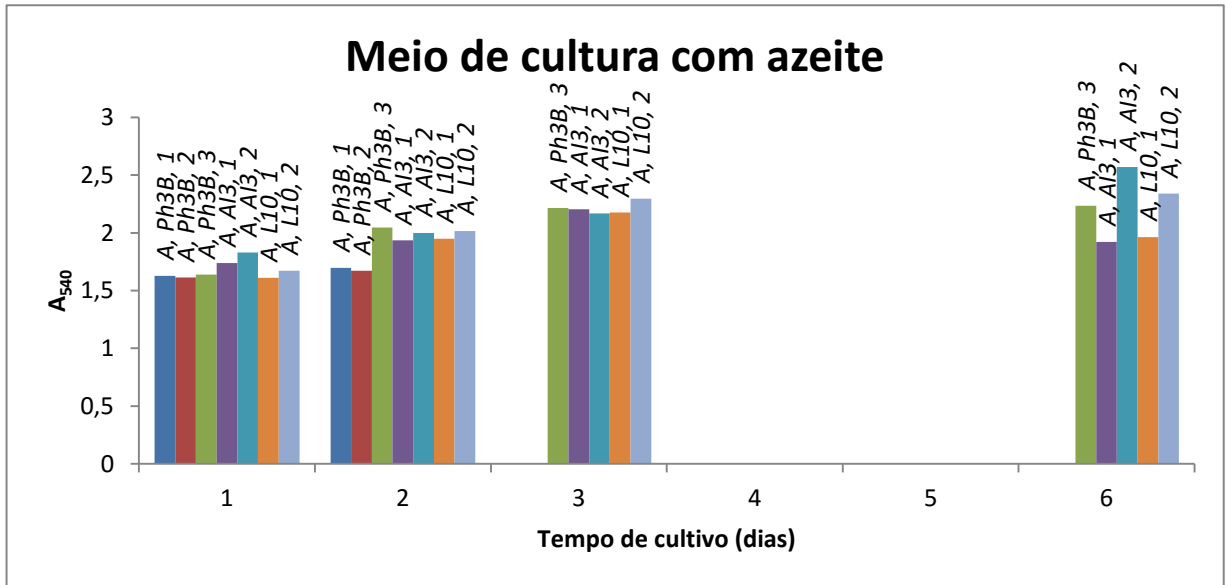


Figura 12 - A₅₄₀ das culturas bacterianas no meio de cultura A

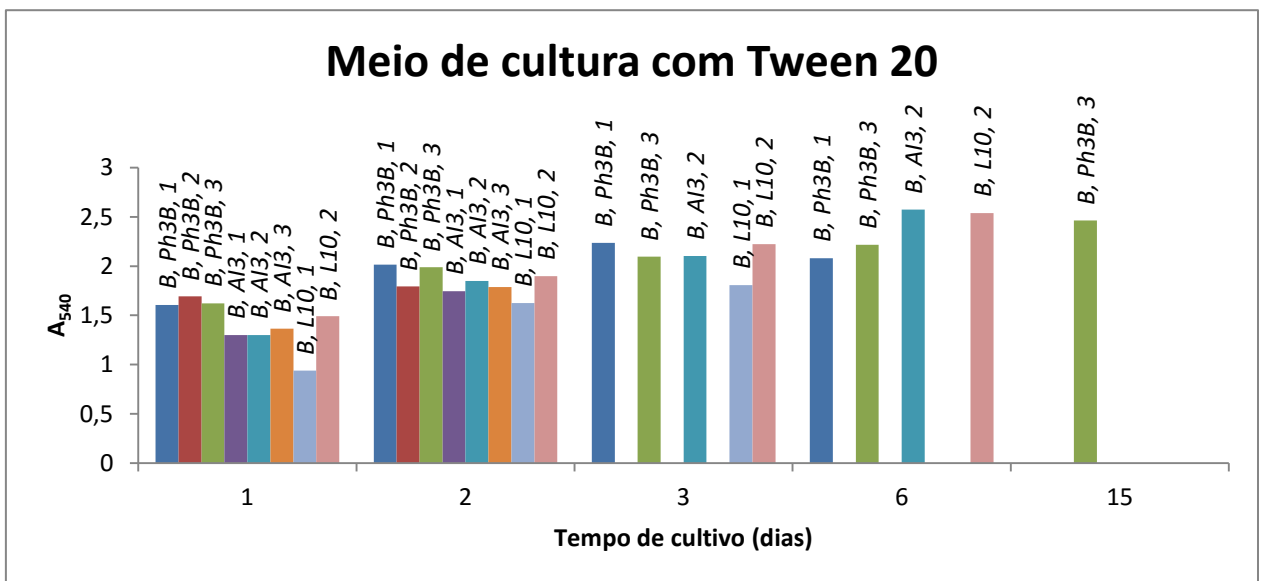


Figura 13 - A₅₄₀ das culturas bacterianas no meio de cultura B

A actividade enzimática relativa ao crescimento das diversas estirpes nos diversos meios de cultura apresentam-se a seguir juntamente com a tabela 19.

Tabela 19 – Média da actividade enzimática, em UI/mL, dos meios de cultura A e B inoculados com diversas estirpes bacterianas (1, 2 e 3 – colónias)

| DIAS | Actividade enzimática (UI/mL) | | | | | |
|--|-------------------------------|---|---------|---------|---------|---------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 6 | 15 |
| Estirpes bacterianas de <i>P. aeruginosa</i> | | | | | | |
| A, Ph3B, 1 | 0 | 0 | 5,9E-02 | | | |
| A, Ph3B, 2 | 0 | 0 | 7,2E-02 | | | |
| A, Ph3B, 3 | 0 | 0 | 6,5E-03 | 3,9E-03 | 2,8E-03 | 3,1E-02 |
| A, A13, 1 | 0 | 0 | 1,9E-03 | 2,7E-03 | 2,1E-02 | |
| A, A13, 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,5E-03 | 2,0E-02 |
| A, L10, 1 | 0 | 0 | 1,4E-03 | 9,0E-04 | 2,6E-02 | |
| A, L10, 2 | 0 | 0 | 0 | 2,7E-03 | 7,1E-03 | 2,8E-02 |
| B, Ph3B, 1 | 0 | 0 | 3,7E-03 | 5,2E-03 | 3,6E-02 | |
| B, Ph3B, 2 | 0 | 0 | 9,4E-02 | | | |
| B, Ph3B, 3 | 0 | 0 | 2,1E-03 | 3,8E-03 | 2,1E-03 | 2,7E-03 |
| B, A13, 1 | 0 | 0 | 1,7E-02 | | | |
| B, A13, 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,2E-03 | 2,4E-02 |
| B, A13, 3 | 0 | 0 | 2,9E-02 | | | |
| B, L10, 1 | 0 | 0 | 0 | 4,5E-02 | | |
| B, L10, 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6,5E-04 | 3,0E-02 |

A actividade de lipase extracelular das diversas estirpes nos diversos meios de cultura apresentam-se nas figuras seguintes.

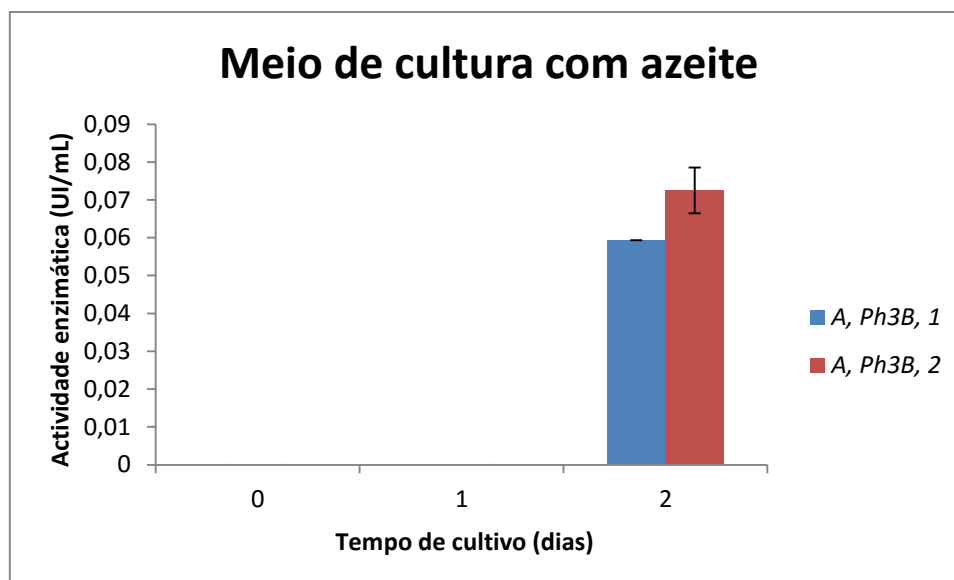


Figura 14 – Actividade de lipase nas culturas da estirpe Ph3B de *P. aeruginosa* (A – meio de cultura com azeite)

Na figura 14 verifica-se que ao fim de dois dias, a estirpe Ph3B de *P. aeruginosa* já apresentava uma actividade enzimática máxima de 0.0724 UI/mL.

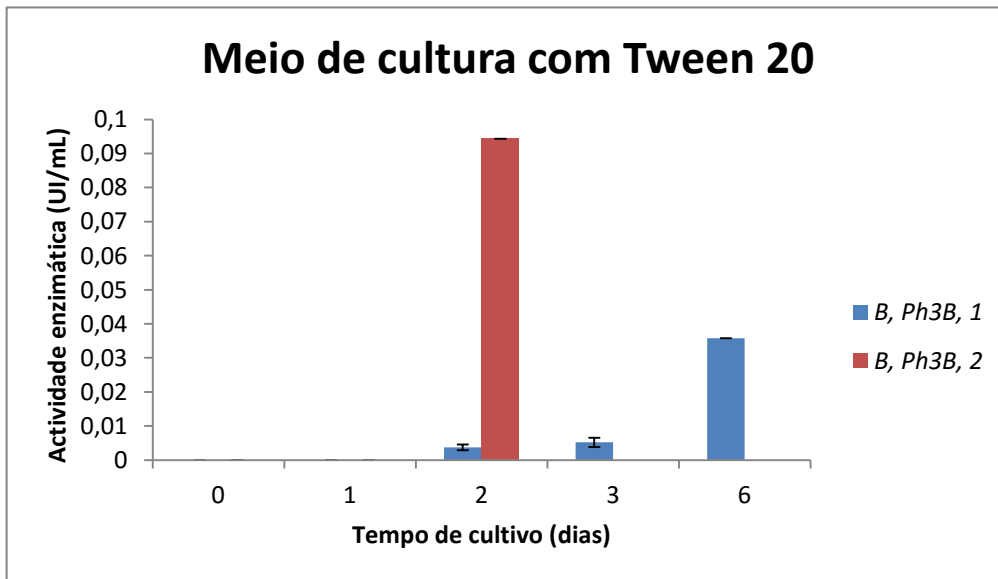


Figura 15 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* (B – meio de cultura com Tween 20)

De acordo com a figura 15, verifica-se que ao fim de dois dias a estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* já apresentava uma actividade enzimática máxima de 0.0943 UI/mL.

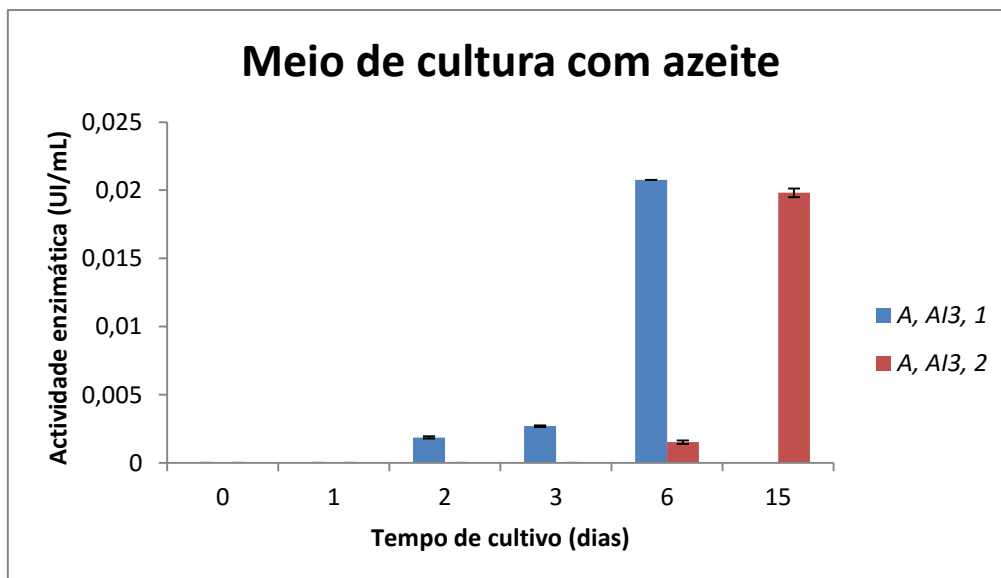


Figura 16 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *A13* de *P. aeruginosa* (A – meio de cultura com azeite)

De acordo com a figura 16, verifica-se que ao fim de 6 dias a estirpe *A13* de *P. aeruginosa* já apresentava uma actividade enzimática máxima de 0.0207 UI/mL.

Estas actividades enzimáticas não são muito elevadas em comparação à estirpe mutante *Ph3B* de *P. aeruginosa* tanto num meio de cultura com azeite ou com Tween 20.

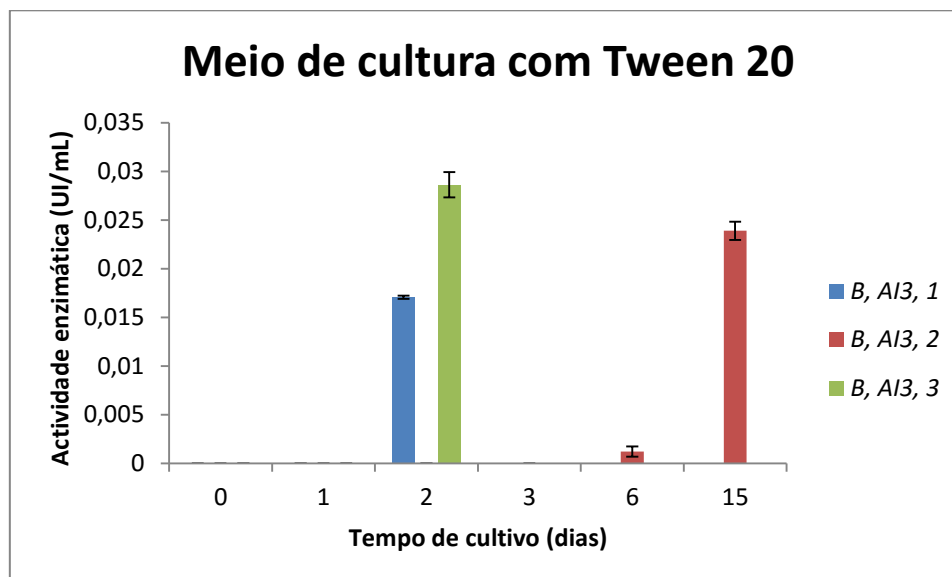


Figura 17 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe AI3 de *P. aeruginosa* (B – meio de cultura com Tween 20)

De acordo com a figura 17, verifica-se que ao fim de 2 dias a estirpe AI3 de *P. aeruginosa* já apresentava uma actividade enzimática máxima de 0.0286 UI/mL.

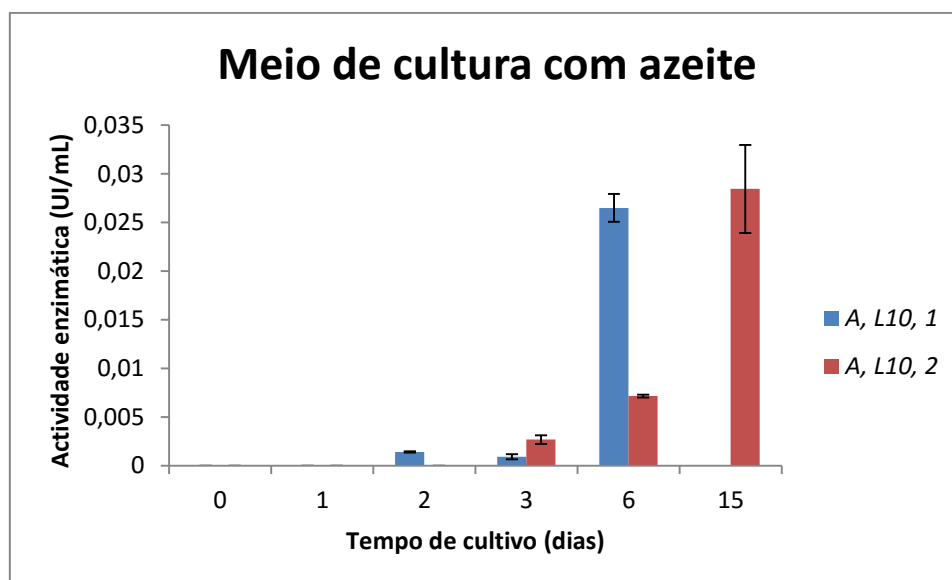


Figura 18 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe L10 de *P. aeruginosa* (A – meio de cultura com azeite)

De acordo com a figura 18, verifica-se que ao fim de 6 dias a estirpe L10 de *P. aeruginosa* já apresentava uma actividade enzimática máxima de 0.0264 UI/mL.

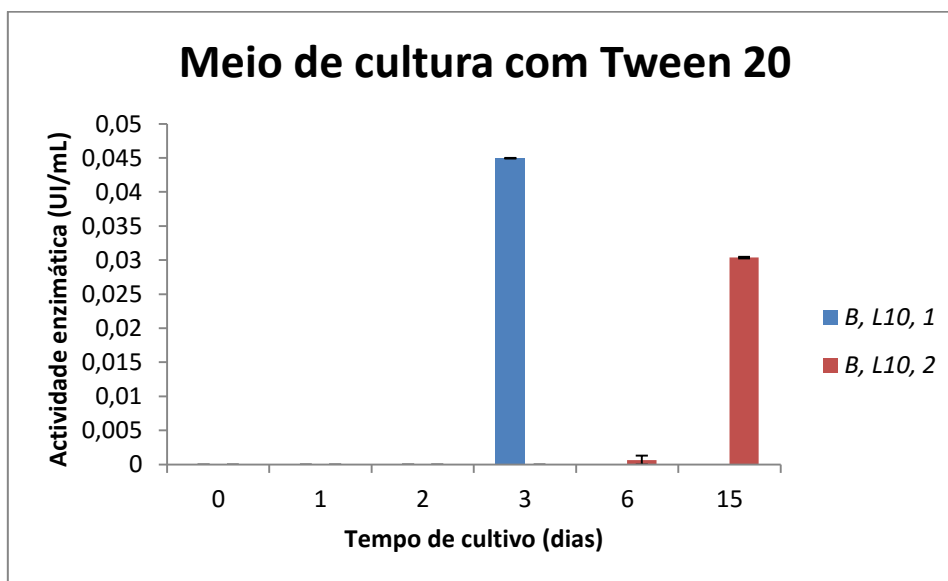


Figura 19 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe L10 de *P. aeruginosa* (B – meio de cultura com Tween 20)

De acordo com a figura 19, verifica-se que ao fim de 3 dias a estirpe L10 de *P. aeruginosa* já apresentava uma actividade enzimática máxima de 0.0449 UI/mL.

3.3. Produção de lipase a partir de estirpes fúngicas em meio de cultura líquido

O crescimento das estirpes fúngicas bem como a produção de lipase dependem de vários factores, tais como, a temperatura, o pH do meio de cultura, a velocidade de agitação e a composição do meio de cultura. Deste modo, analisou-se qual a melhor estirpe fúngica para a produção da lipase intra- e extracelular.

3.3.1. Produção de lipase extracelular

Para este estudo considerou-se quatro estirpes fúngicas (*Phlebia rufa*, *Ganoderma lucidum violeta*, *Pleurotus ostreatus* e *Ganoderma carnosum*) e dois meios de cultura (meio de cultura com azeite e meio de cultura com Tween 20).

As figuras e a actividade enzimática relativos ao crescimento das diversas estirpes nos diversos meios de cultura apresentam-se a seguir.

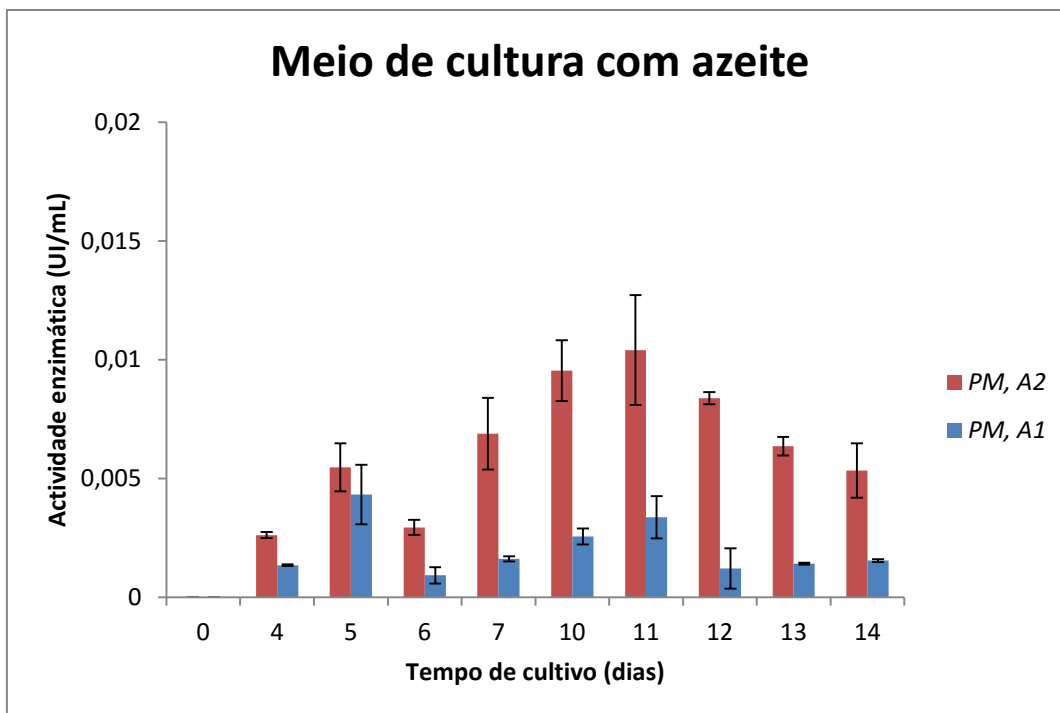


Figura 20 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *Phlebia rufa* (A1 e A2 – duplicados no meio de cultura com azeite)

De acordo com a figura 20, verifica-se que a actividade enzimática máxima da estirpe *PM* no meio de cultura com azeite foi no dia 11 com 0.0104 UI/mL. As culturas desta estirpe no meio de cultura com Tween 20 não apresentaram actividade enzimática ao fim de 14 dias.

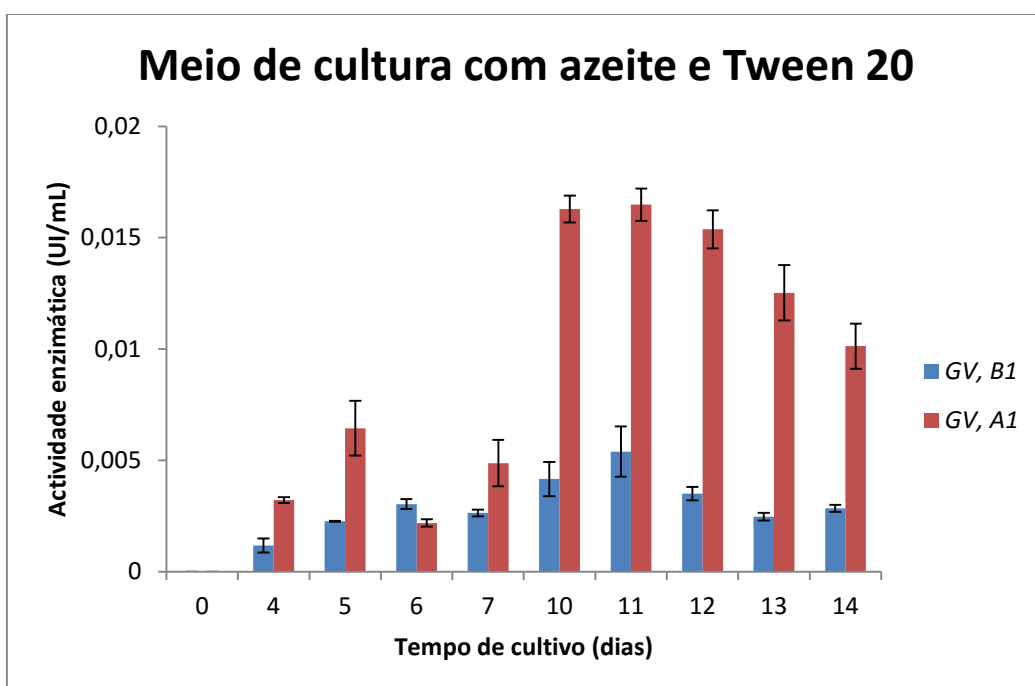


Figura 21 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *Ganoderma lucidum violeta* (A1 e B1 –meio de cultura com azeite e Tween 20, respectivamente)

De acordo com a figura 21, verifica-se que a maior actividade enzimática da estirpe *GV* e no meio de cultura com azeite foi no dia 11 com 0.0165 UI/mL. No meio de cultura com Tween 20, a maior actividade enzimática verificada foi de 0.00540 UI/mL no dia 11.

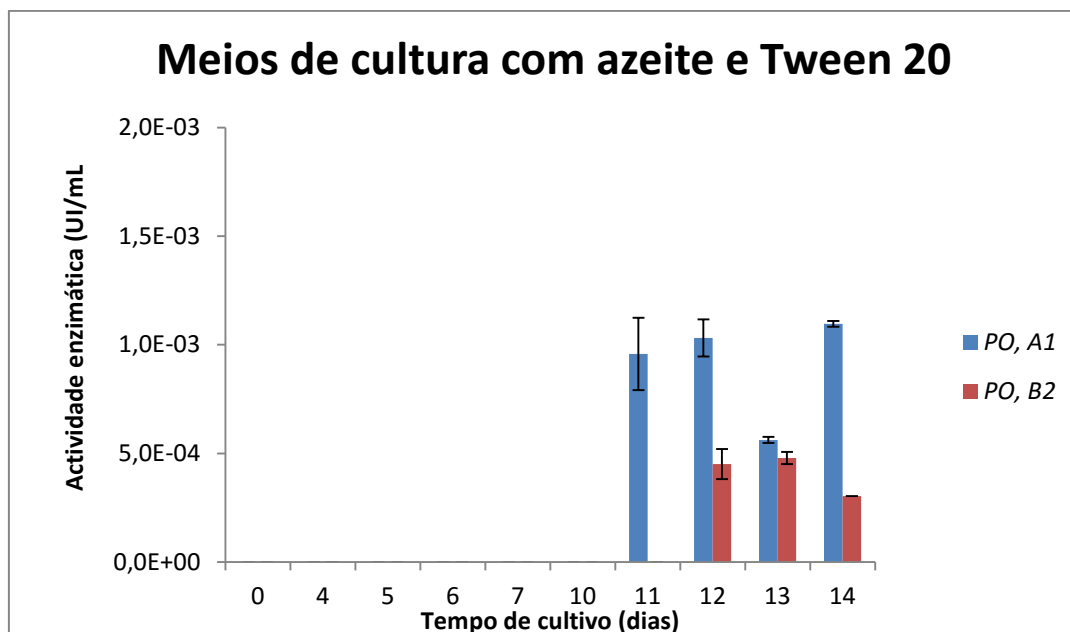


Figura 22 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *Pleurotus ostreatus* (A1 e B2 – meio de cultura com azeite e Tween 20, respectivamente)

De acordo com a figura 22, verifica-se que no meio de cultura com azeite, a estirpe *PO* teve a sua produção máxima de lipase ao fim de 14 dias com uma actividade enzimática máxima de 1.10×10^{-3} UI/mL. No meio de cultura com Tween 20, a estirpe *PO* teve a sua produção máxima de lipase ao fim de 13 com 4.79×10^{-4} UI/mL.

Conclui-se que o meio de cultura com azeite é melhor que o meio de cultura com Tween 20 mas esta estirpe fúngica não é uma boa estirpe para a produção de lipase com azeite pois possui uma actividade enzimática muito baixa e só ao fim de 11 dias.

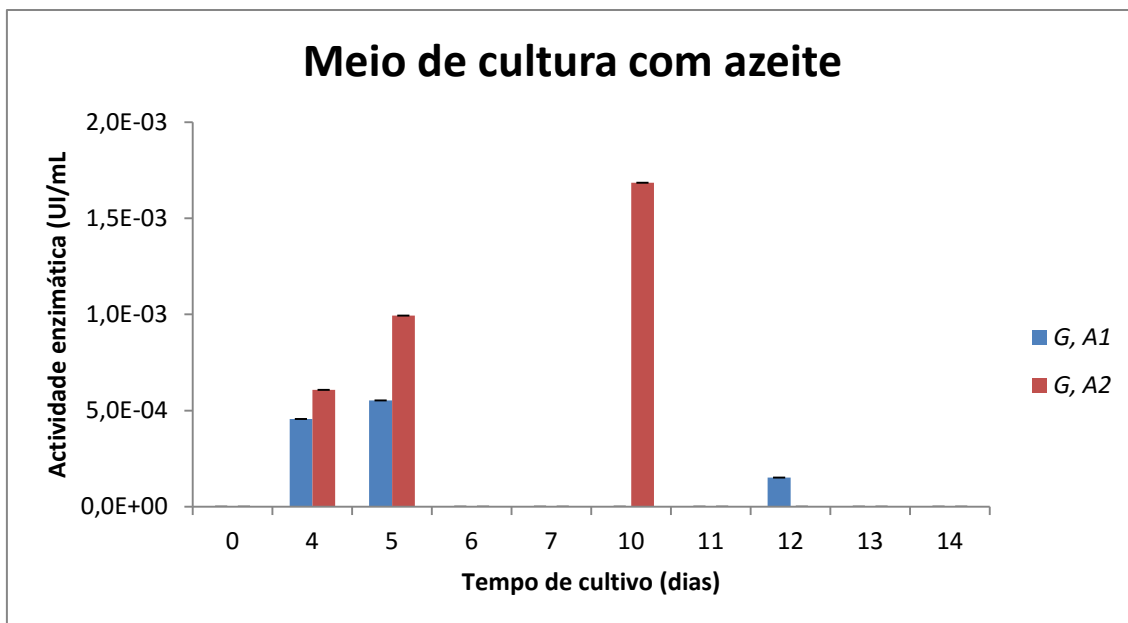


Figura 23 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *Ganoderma carnosum* (A1 e A2 – duplicados no meio de cultura com azeite)

De acordo com a figura 23, verifica-se que a estirpe G teve uma produção máxima de lipase no dia 10 apresentando uma actividade enzimática de 1.69×10^{-3} UI/mL.

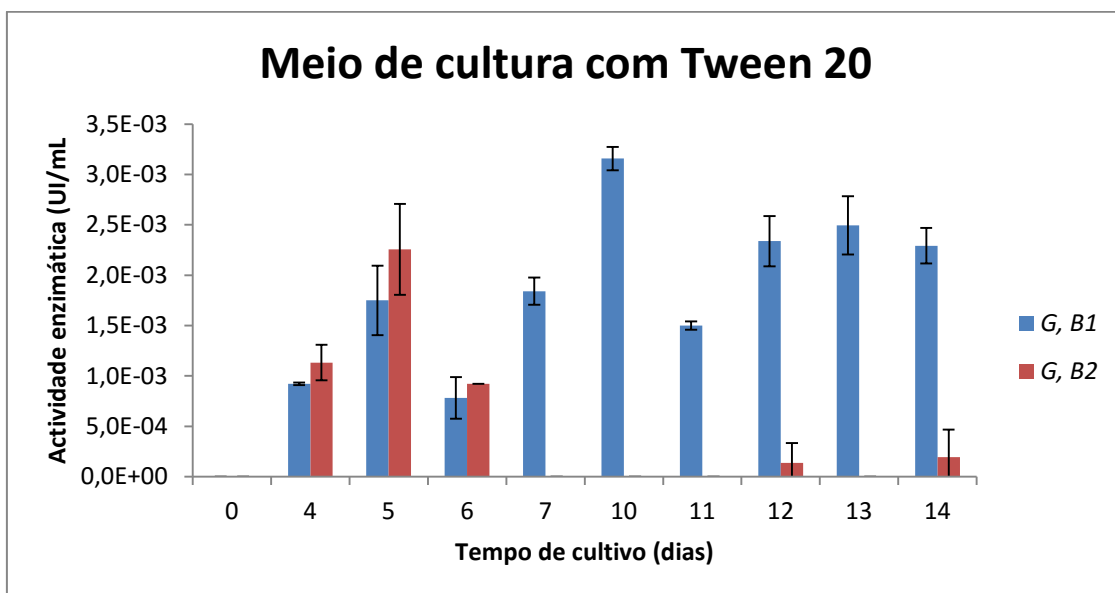


Figura 24 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *Ganoderma carnosum* (B1 e B2 – duplicados no meio de cultura com Tween 20)

De acordo com o figura 24, verifica-se a estirpe G teve uma actividade enzimática máxima no dia 10 apresentando uma actividade enzimática de 3.16×10^{-3} UI/mL.

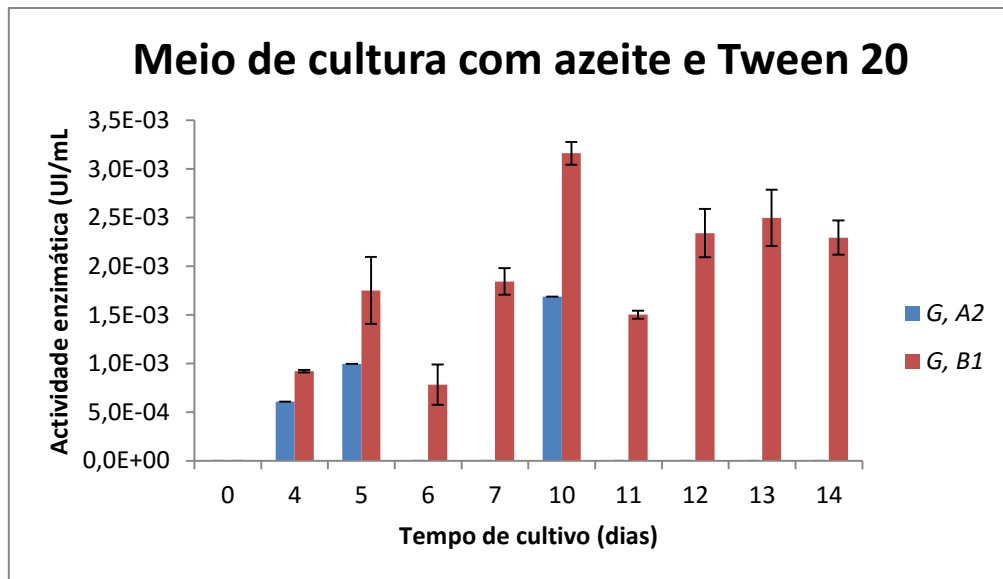


Figura 25 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *Ganoderma carnosum* (A2 e B1 –meio de cultura com azeite e com Tween 20, respectivamente)

De acordo com a figura 25, verifica-se que o meio de cultura com Tween 20 é melhor que o meio de cultura com azeite para esta estirpe. A estirpe G com o meio de cultura com Tween 20 apresenta uma actividade enzimática máxima no dia 10 de $3,16 \times 10^{-3}$ UI/mL.

3.3.2. Produção de lipase intracelular

Considerou-se quatro estirpes (*Phlebia rufa*, *Ganoderma lucidum violeta*, *Pleurotus ostreatus* e *Ganoderma carnosum*) e dois meios de cultura (meio de cultura com azeite e meio de cultura com tween 20).

A actividade enzimática relativa ao crescimento das diversas estirpes nos diversos meios de cultura apresentam-se a seguir.

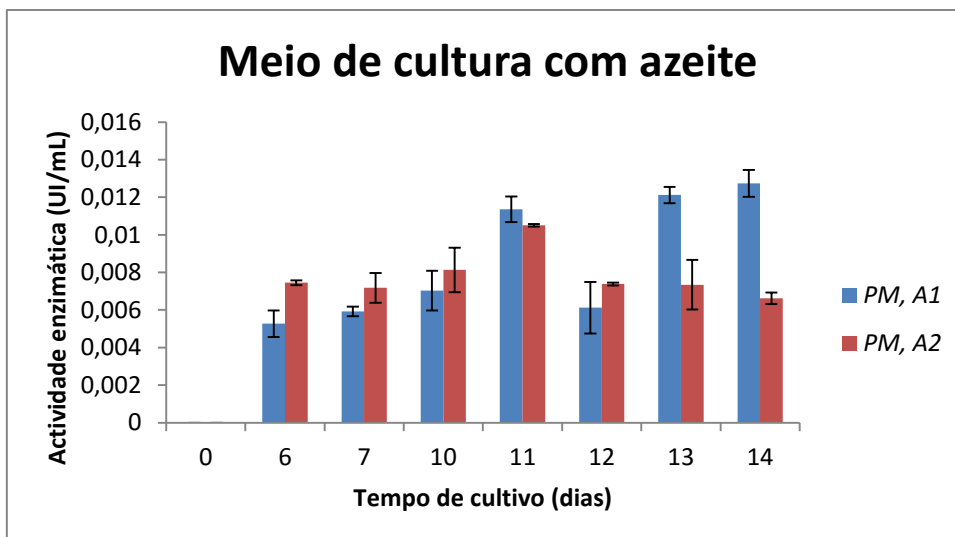


Figura 26 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *Phlebia rufa* (A1 e A2 – duplicados no meio de cultura com azeite)

De acordo com a figura 26, verifica-se que a estirpe *PM* teve uma produção máxima de lipase no dia 14 apresentando uma actividade enzimática de 0.0127 UI/mL.

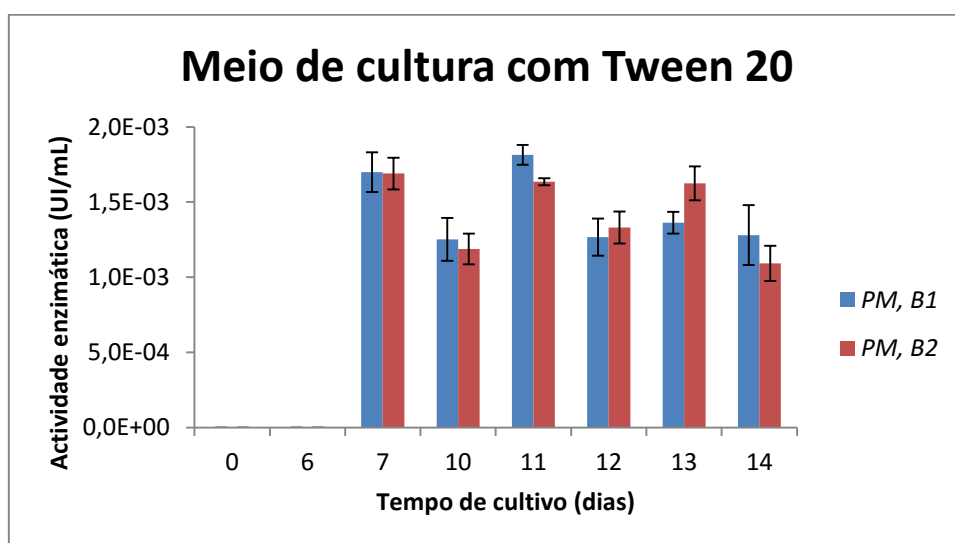


Figura 27 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *Phlebia rufa* (B1 e B2 – meio de cultura com Tween 20)

De acordo com a figura 27, verifica-se a estirpe *PM* teve uma produção máxima de lipase no dia 11 apresentando uma actividade enzimática de 1.81×10^{-3} UI/mL.

Estas actividades enzimáticas são muito baixas comparativamente ao meio de cultura com azeite. Deste modo, conclui-se que o meio de cultura com azeite é o melhor para esta estirpe.

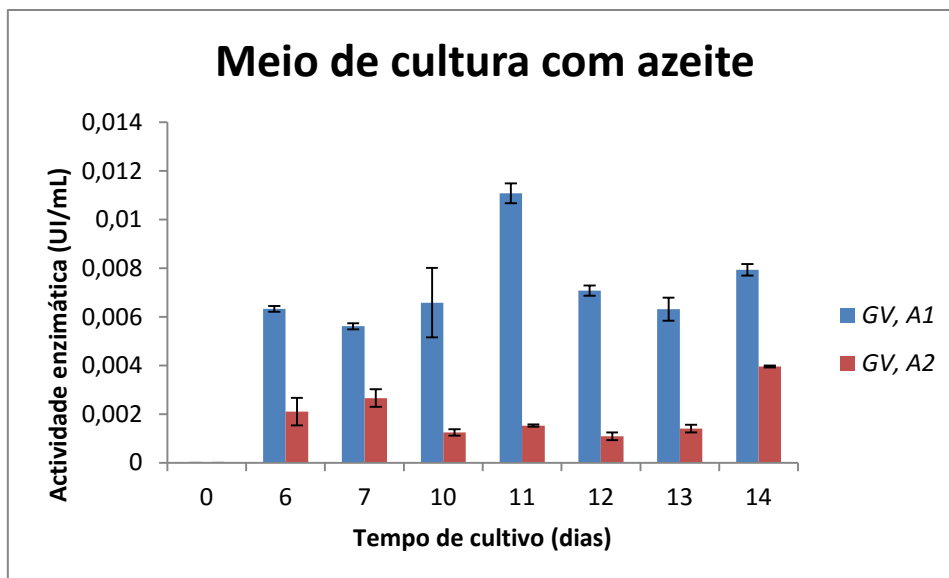


Figura 28 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *Ganoderma lucidum violtea* (A1 e A2 – meio de cultura com azeite)

De acordo com a figura 28, verifica-se que a estirpe GV teve uma produção máxima de lipase no dia 11 apresentando uma actividade enzimática de 0.0110 UI/mL.

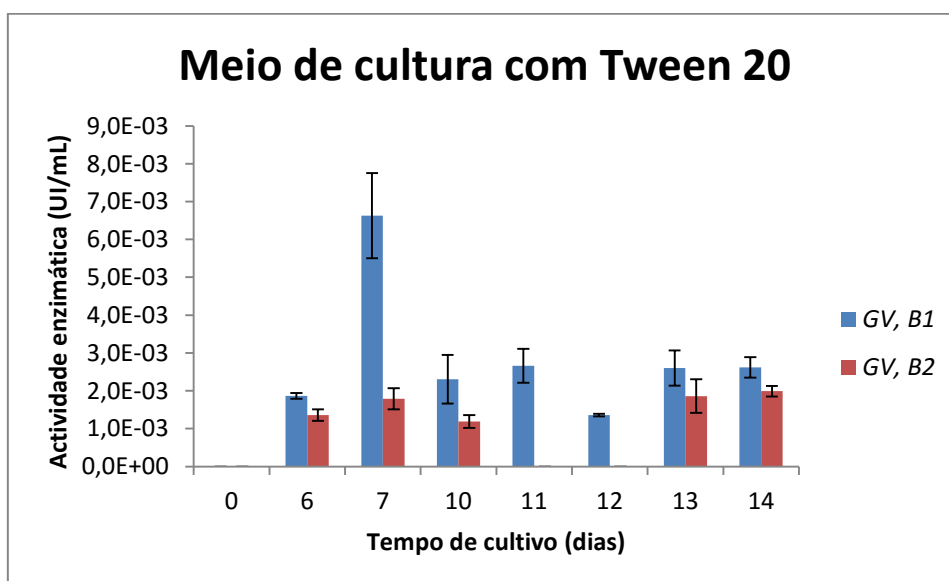


Figura 29 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *Ganoderma lucidum violtea* (B1 e B2 – meio de cultura com Tween 20)

De acordo com a figura 29, verifica-se a estirpe GV teve uma produção máxima de lipase no dia 7 apresentando uma actividade enzimática de 6.62×10^{-3} UI/mL.

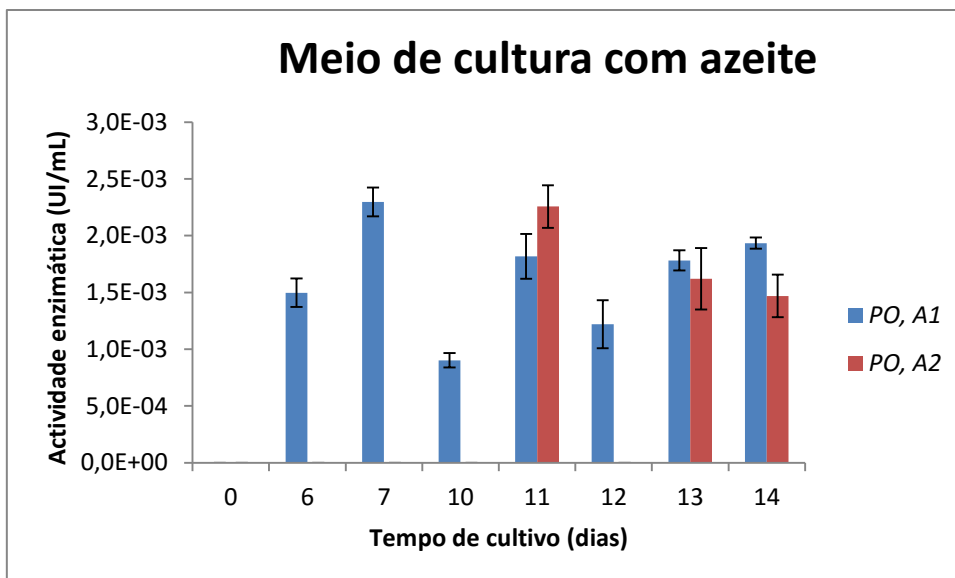


Figura 30 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *Pleurotus ostreatus* (A1 e A2 – duplicados no meio de cultura com azeite)

De acordo com a figura 30, verifica-se que a estirpe *PO* teve uma produção máxima de lipase no dia 7 e no dia 11 apresentando uma actividade enzimática de 2.29×10^{-3} UI/mL e de 2.25×10^{-3} UI/mL, respectivamente. Esta estirpe apresenta uma actividade enzimática baixa num meio de cultura com azeite.

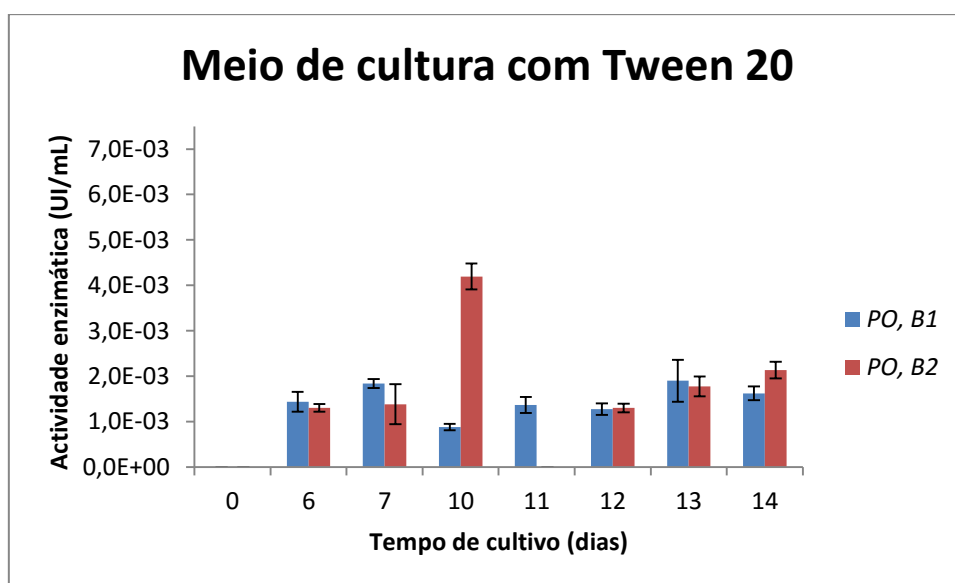


Figura 31 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *Pleurotus ostreatus* (B1 e B2 – duplicados no meio de cultura com Tween 20)

De acordo com a figura 31, verifica-se que a estirpe *PO* teve uma produção máxima de lipase no dia 10 apresentando uma actividade enzimática

de 4.19×10^{-3} UI/mL. Esta actividade enzimática é mais elevada que no meio de cultura com azeite, no entanto, é uma actividade enzimática baixa.

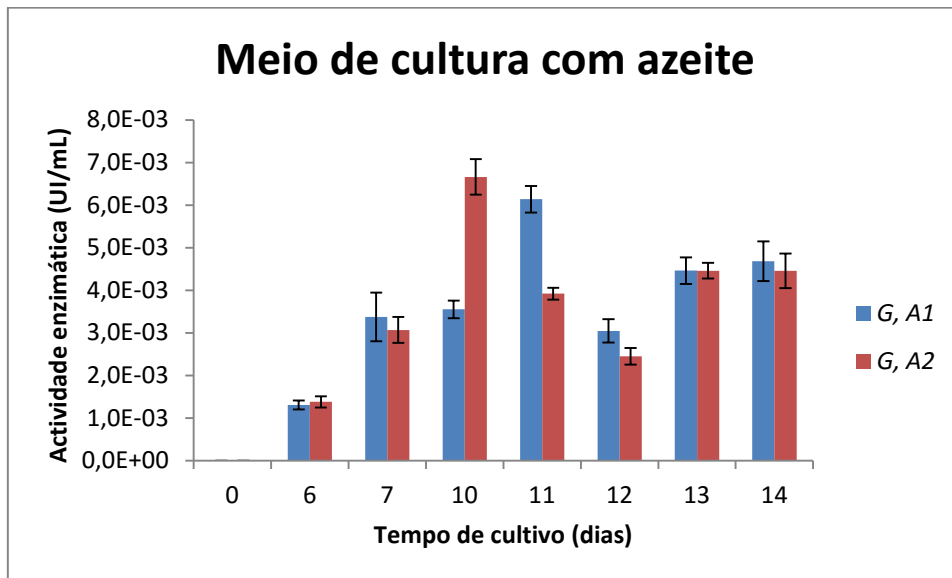


Figura 32 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *Ganoderma carnosum* (A1 e A2 – duplicados no meio de cultura com azeite)

De acordo com a figura 32, verifica-se que a estirpe G teve uma produção máxima de lipase no dia 10 apresentando uma actividade enzimática de 6.66×10^{-3} UI/mL.

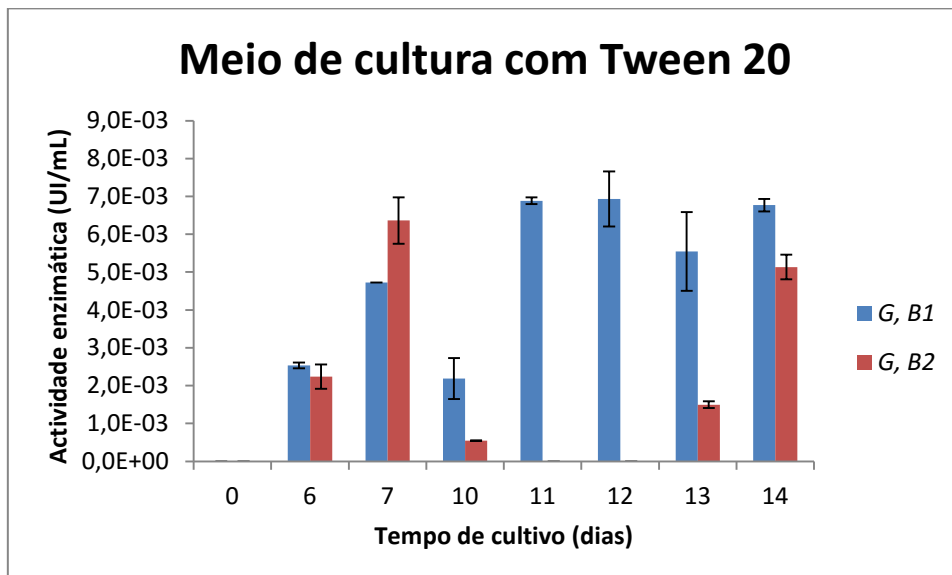


Figura 33 - Actividade de lipase nas culturas da estirpe *Ganoderma carnosum* (B1 e B2 – duplicados no meio de cultura com Tween 20)

De acordo com a figura 33, verifica-se que a estirpe G teve uma produção máxima de lipase no dia 7 e no dia 12. apresentando uma actividade enzimática de 6.36×10^{-3} UI/mL e de 6.93×10^{-3} UI/mL, respectivamente.

3.4. Actividade enzimática na biomassa e nos sobrenadantes das culturas bacterianas e fúngicas

Realizaram-se os doseamentos a seguir descritos para se averiguar se a lipase produzida pelas estirpes bacterianas e fúngicas é, maioritariamente, extra- ou intracelular.

Relativamente às estirpes bacterianas, utilizou-se um volume de pré inoculo de 25 mL de meio de cultura para as suas inoculações. Depois de se verificar que houve crescimento, centrifugou-se e obteve-se 23 mL de sobrenadante e 2 mL de células sedimentadas. Para se dosear a actividade enzimática das células sedimentadas, colocou-se 2 mL de tampão, perfazendo um volume total de 4 mL. Os valores de actividade encontram-se na tabela 20.

Tabela 20 - Valores de actividade de lipase extra- e intracelular das estirpes mutantes de *P. aeruginosa* (*Ph3B*, *L10* e *A13*) em meios de cultura com azeite e com Tween 20

| | Actividade enzimática (UI/mL) | | | |
|---------------------------|-------------------------------|----------------------|--------------|----------------------|
| | Azeite | | Tween 20 | |
| | Sobrenadante | Células sedimentadas | Sobrenadante | Células sedimentadas |
| <i>P. aeruginosa Ph3B</i> | 98,21 | 6,01 | 0 | 0 |
| <i>P. aeruginosa L10</i> | 37,84 | 2,18 | 40,02 | 1,25 |
| <i>P. aeruginosa A13</i> | 34,50 | 7,38 | 54,40 | 1,60 |

Relativamente às estirpes fúngicas, utilizou-se um volume de pré inoculo de 50 mL de meio de cultura para as suas inoculações. Depois de se verificar que houve crescimento, centrifugou-se e obteve-se 48 mL de sobrenadante e 2 mL de células sedimentadas. Para se dosear a actividade enzimática das células sedimentadas, colocou-se 2 mL de tampão, perfazendo um volume total de 4 mL. Os valores de actividade encontram-se na tabela 21.

Tabela 21 - Valores de actividade de lipase extra- e intracelular das estirpes mutantes fúngicas (*Phlebia rufa*, *Ganoderma lucidum violeta*, *Pleurotus ostreatus* e *Ganoderma carnosum*) em meios de cultura com azeite e com Tween 20

| | Actividade enzimática (UI/mL) | | | |
|----------------------------------|-------------------------------|----------------------|--------------|----------------------|
| | Azeite | | Tween 20 | |
| | Sobrenadante | Células sedimentadas | Sobrenadante | Células sedimentadas |
| <i>Phlebia rufa</i> | 24,96 | 1,27 | 0 | 0 |
| <i>Ganoderma lucidum violeta</i> | 39,60 | 1,10 | 12,96 | 0,66 |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | 2,64 | 0,23 | 1,15 | 0,42 |
| <i>Ganoderma carnosum</i> | 4,06 | 0,67 | 7,58 | 0,69 |

De acordo com as tabelas 20 e 21 verifica-se que a lipase produzida, tanto pelas estirpes bacterianas como pelas estirpes fúngicas, é maioritariamente extracelular pois a actividade enzimática é mais elevada no sobrenadante do que nas células sedimentadas. Esta conclusão está de acordo com a literatura que apresenta que as lipases são maioritariamente excretadas para o meio exterior. (Ghosh, P., *et al.*, 1996)

3.5. Planeamento experimental para optimização das condições de produção de lipase

O planeamento experimental foi realizado num factorial estatístico de 2^3 com um total de oito experiências em duplicado. Este estudo foi realizado para estabelecer o efeito de três factores: a temperatura de crescimento dos microrganismos (25°C e 37°C), a estirpe de *P. aeruginosa* (A13 e Ph3B) e o meio de cultura adequado (azeite e óleo usado). O resumo da análise das variáveis do modelo factorial apresentam-se na tabela 22.

Tabela 22 - Análise das variáveis de acordo com a metodologia ANOVA

| Fonte | Efeito | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média quadrada | Valor de F |
|-----------------|--------------|--------------------|--------------------|----------------|------------|
| Modelo (=soma) | | 5,430E-03 | 7 | 7,757E-04 | 132,729 |
| Temperatura (A) | 2,191 E-02 | 1,921E-03 | 1 | 1,921E-03 | 328,629 |
| Estirpe (B) | - 2,349 E-02 | 2,207E-03 | 1 | 2,207E-03 | 377,568 |
| Meio (C) | 4,89 E-03 | 9,555E-05 | 1 | 9,555E-05 | 16,349 |
| AB | 1,1 E-04 | 5,062E-08 | 1 | 5,062E-08 | 8,662E-03 |
| AC | - 6,81 E-03 | 1,856E-04 | 1 | 1,856E-04 | 31,764 |
| Erro | | 4,676E-05 | 8 | 5,844E-06 | |
| Total corrigido | | 5,477E-03 | 7 | | |

O valor elevado de F do modelo de 132,729 implica que o modelo é significativo e que existe uma pequena percentagem de que este valor elevado de F ocorra devido ao ruído.

Foi obtida uma equação empírica para se estimar o valor da resposta (declive/sensibilidade):

$$y = \beta_0 + \beta_A x_A + \beta_B x_B + \beta_C x_C + \beta_{AB} x_A x_B + \beta_{AC} x_A x_C$$

$$y = 0.04201 + 0.02191 A - 0.02349 B + 0.00489 C + 0.00011 AB - 0.00681 AC$$

Onde o y é a actividade enzimática da lipase e o A, B e C são os valores da temperatura, da estirpe e do meio, respectivamente. Esta equação serve para se determinar uma resposta optimizada.

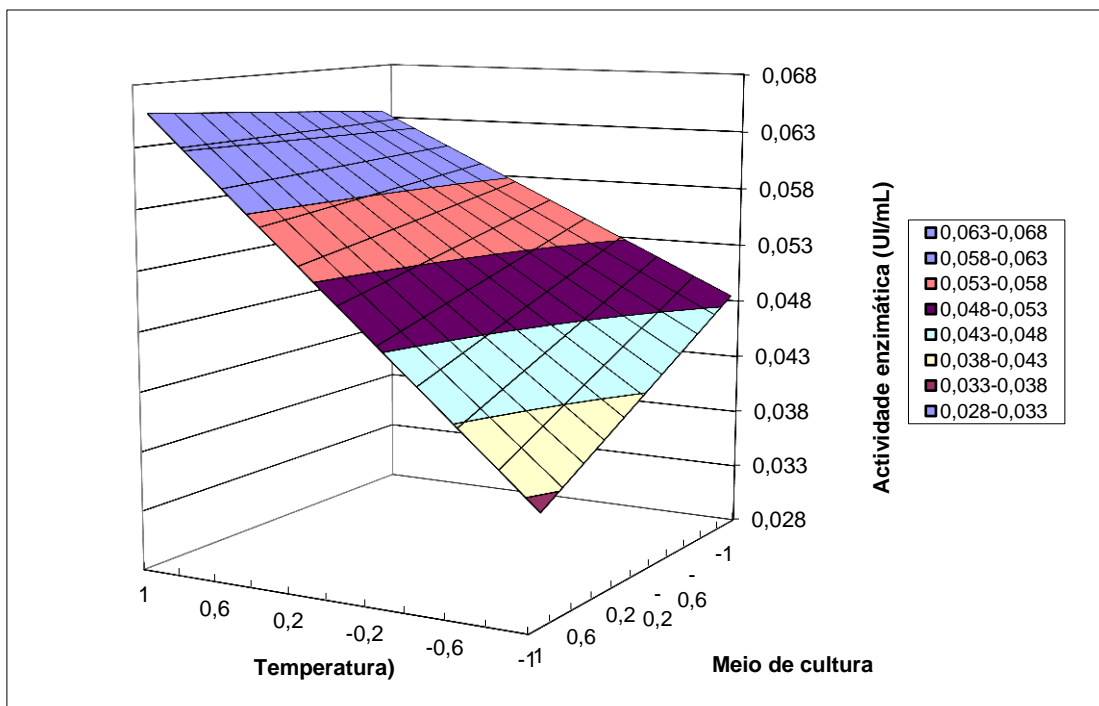


Figura 34 – Representação tridimensional da interação dos parâmetros temperatura e meio de cultura na actividade de lipase para *P. aeruginosa* da estirpe *Ph3B*

A figura 34 apresenta a relação da temperatura (25°C e 37°C) com o meio de cultura (azeite e óleo usado). As condições optimizadas consistem numa temperatura de 37°C e com um meio de cultura que apresente azeite, já que a figura 34 apresenta maiores actividades enzimáticas para estes valores.

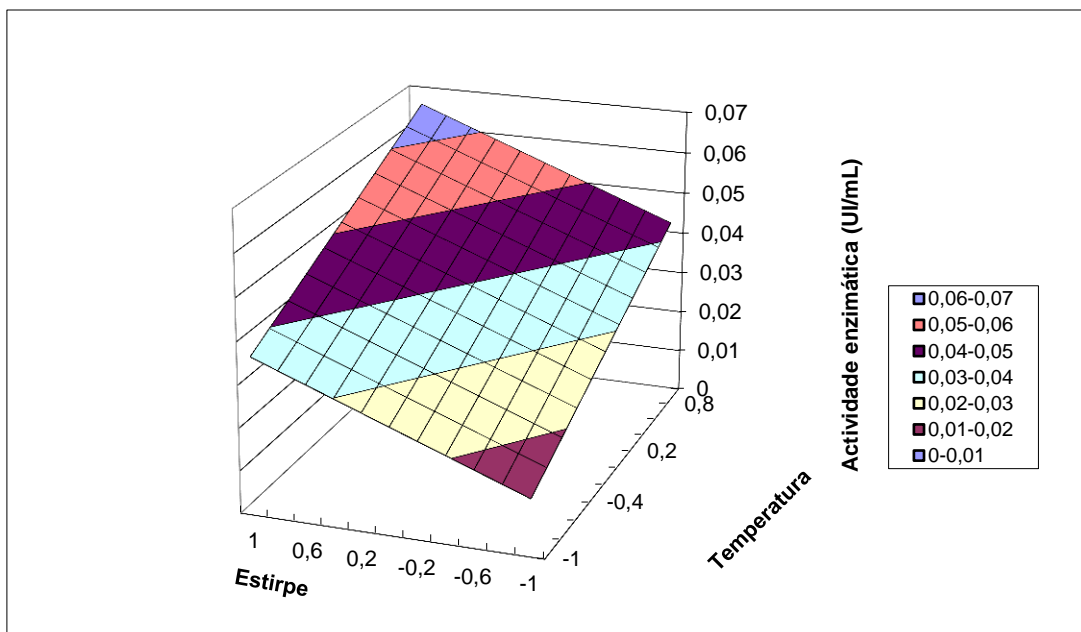


Figura 35 - Representação tridimensional da interação dos parâmetros estirpe e temperatura na actividade de lipase para *P. aeruginosa* no meio de cultura com azeite

A figura 35 apresenta a relação da temperatura (25°C e 37°C) com a estirpe (*AI3* e *Ph3B*). As condições optimizadas consistem numa temperatura de 37°C e com a estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa*, já que a figura 35 apresenta maiores actividades enzimáticas para estes valores.

3.6. Actividade enzimática da lipase imobilizada

3.6.1. Lipase imobilizada em alginato de cálcio

A actividade enzimática da lipase da estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* era de 0.586 UI/mL e da lipase diluída 1:5 era de 0.261 UI/mL.

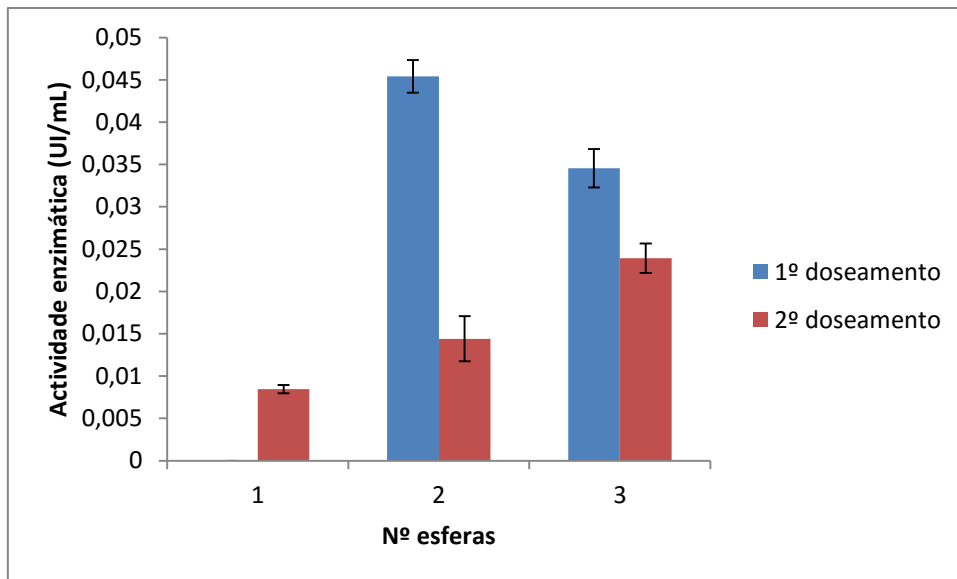


Figura 36 - Actividade enzimática da lipase da estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* imobilizada em esferas de alginato de cálcio

De acordo com a figura 36, verifica-se que no primeiro doseamento e utilizando uma esfera, não se obteve actividade enzimática devido à elevada resistência de transferência de massa do suporte pelo substrato. No segundo doseamento, já houve actividade enzimática (0,00845 UI/mL) devido ao primeiro contacto da esfera com o substrato.

No primeiro doseamento, a utilização de duas esferas apresenta uma actividade enzimática mais elevada (0,0454 UI/mL) que com três esferas (0,0345 UI/mL), devido ao substrato ser um factor limitante.

Calculou-se o rendimento da lipase diluída como mostrado na figura seguinte.

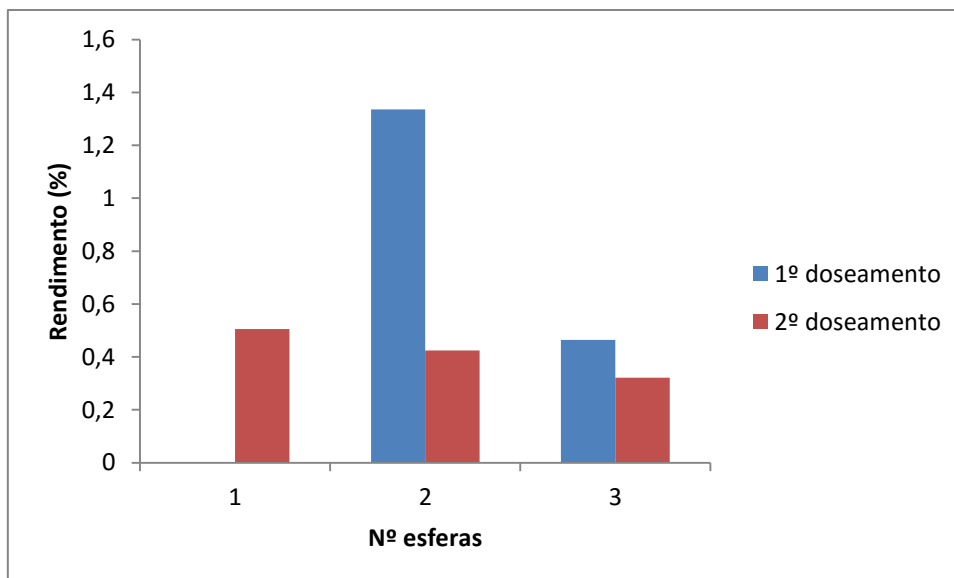


Figura 37 - Rendimento da lipase imobilizada em esferas de alginato de cálcio

De acordo com a figura 37 verifica-se que o rendimento da lipase imobilizada em alginato de cálcio é muito baixo. Isto é, possivelmente, devido à elevada resistência à transferência de massa do substrato pelo suporte.

3.6.2. Lipase imobilizada em glutaraldeído

3.6.2.1. Microplaca de 96 poços

Procedeu-se ao doseamento da actividade enzimática da lipase da estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* na microplaca de 96 poços.

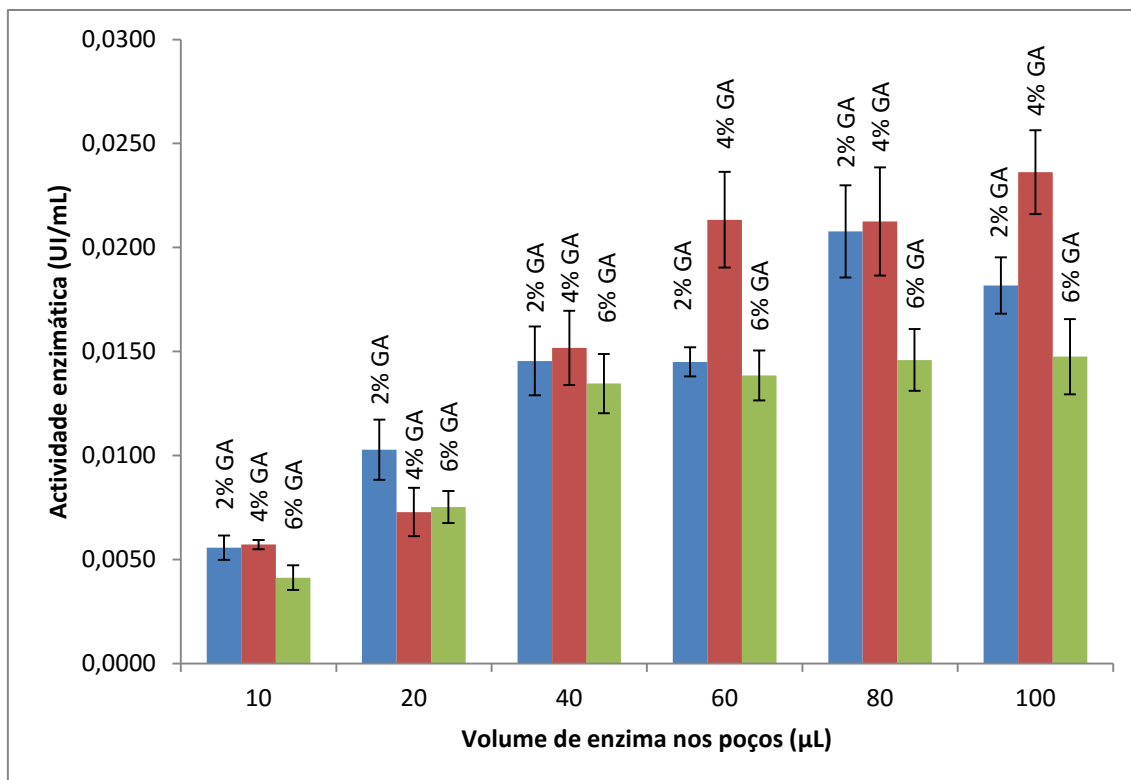


Figura 38 – Efeito do volume de enzima de *P. aeruginosa Ph3B* immobilizada nos poços da microplaca utilizando diferentes concentrações de glutaraldeído

De acordo com a figura 38, verifica-se que quanto maior a quantidade de lipase immobilizada, maior a actividade enzimática. Verifica-se também que quanto maior a quantidade de GA utilizado, menor actividade enzimática pois o GA inibe a actividade das enzimas. Portanto, com 20 μL de lipase immobilizada a quantidade de GA a utilizar será 2% (v/v) apresentando uma actividade enzimática de 0.0103 UI/mL.

A partir de 40 μL de lipase immobilizada, apresenta-se uma maior actividade enzimática com 4% de GA (v/v) apresentando uma actividade enzimática de 0.0152 UI/mL. A utilização de 2% de GA (v/v) apresenta uma maior actividade enzimática do que com 6% de GA (v/v).

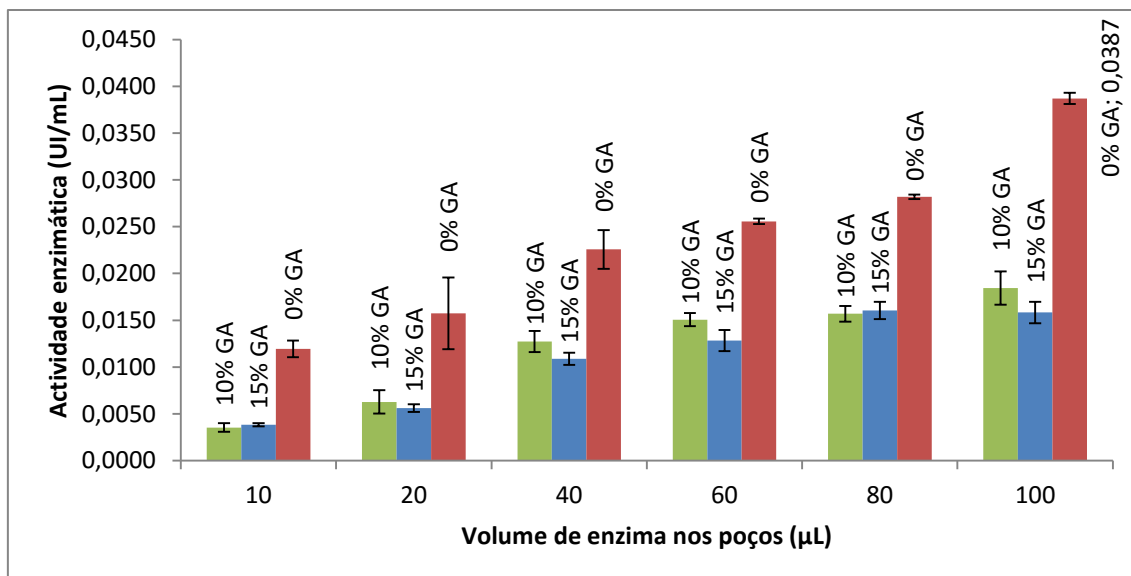


Figura 39 - Efeito do volume de enzima de *P. aeruginosa Ph3B* immobilizada nos poços da microplaca utilizando diferentes concentrações de glutaraldeído

De acordo com a figura 39, verificou-se que a lipase ficou immobilizada na microplaca sem a utilização de GA. Como o GA inibe a actividade das enzimas, esta immobilização sem GA apresenta uma maior actividade enzimática.

Comparando as duas figuras, verifica-se que quanto maior a quantidade de GA utilizado, menor actividade enzimática.

Procedeu-se a um segundo e a um terceiro doseamento da actividade enzimática da lipase da estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* desta microplaca de 96 poços, ao fim de alguns meses.

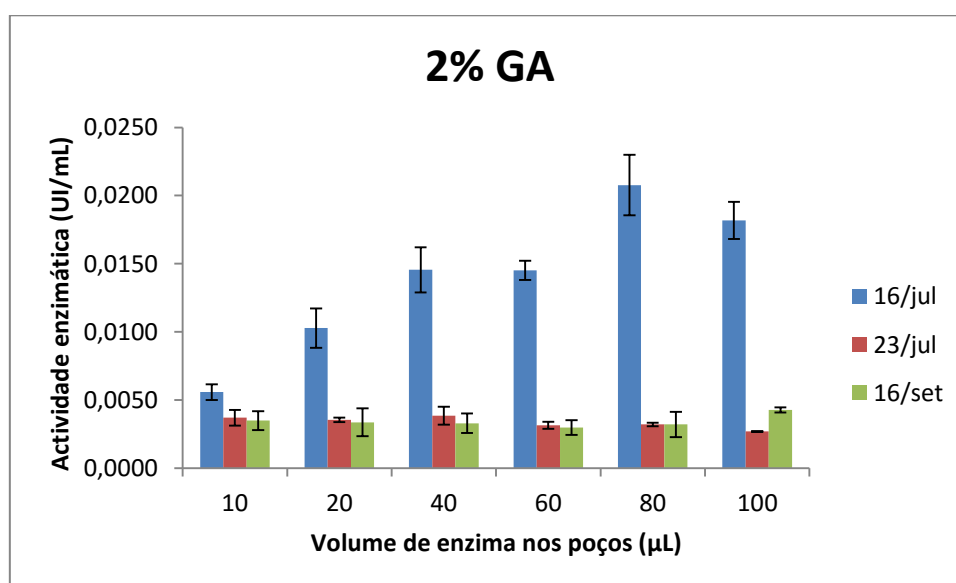


Figura 40 – Actividade enzimática da lipase de *P. aeruginosa Ph3B* immobilizada com 2% de GA (v/v) nos dias 16 e 23 de Julho e 16 de Setembro

De acordo com a figura 40, verifica-se que a lipase, ao longo do tempo, vai perdendo actividade.

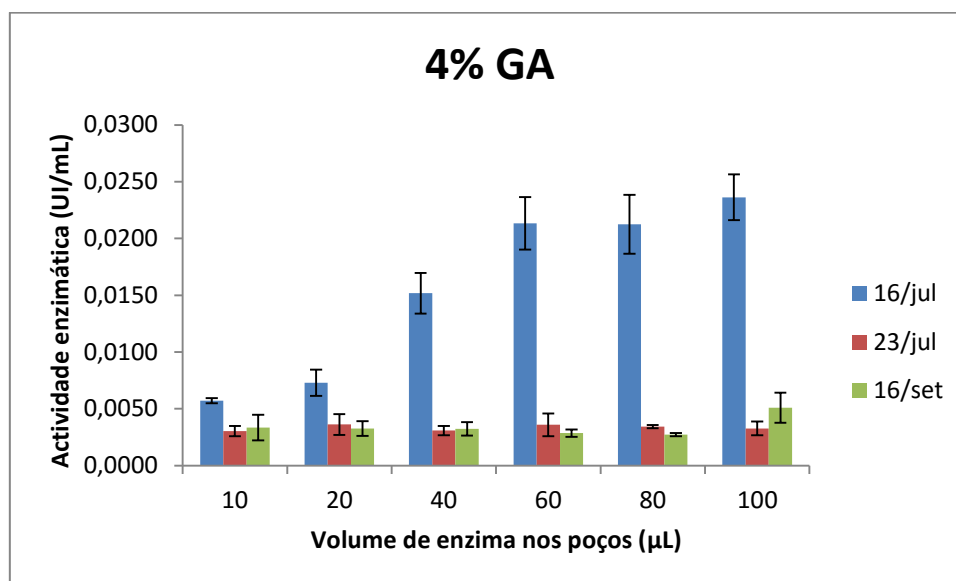


Figura 41 - Actividade enzimática da lipase de *P. aeruginosa Ph3B* imobilizada com 4% de GA (v/v) nos dias 16 e 23 de Julho e 16 de Setembro

De acordo com a figura 41, verifica-se que a lipase, ao longo do tempo, vai perdendo actividade.

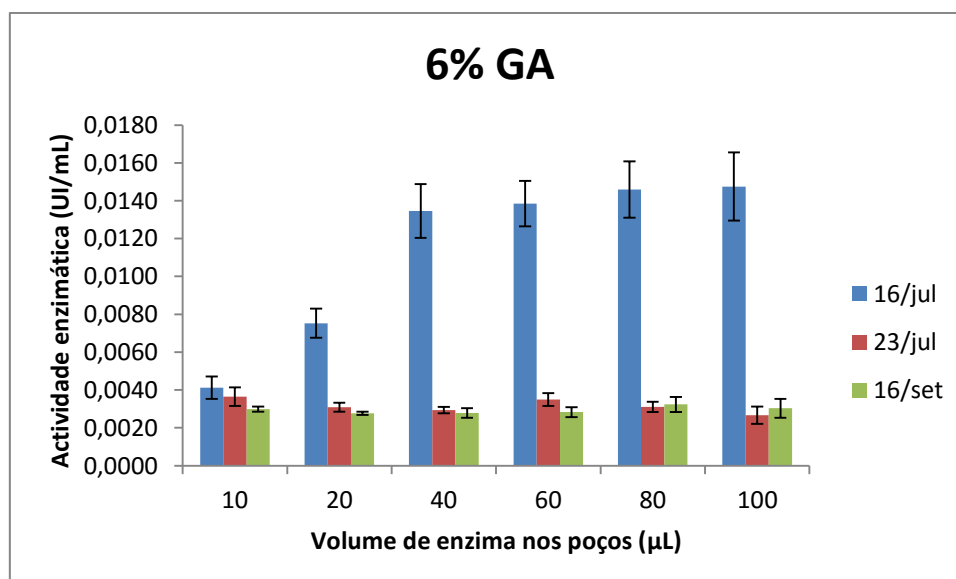


Figura 42 - Actividade enzimática da lipase de *P. aeruginosa Ph3B* imobilizada com 6% de GA (v/v) nos dias 16 e 23 de Julho e 16 de Setembro

De acordo com a figura 42, verifica-se que a lipase, ao longo do tempo, vai perdendo actividade.

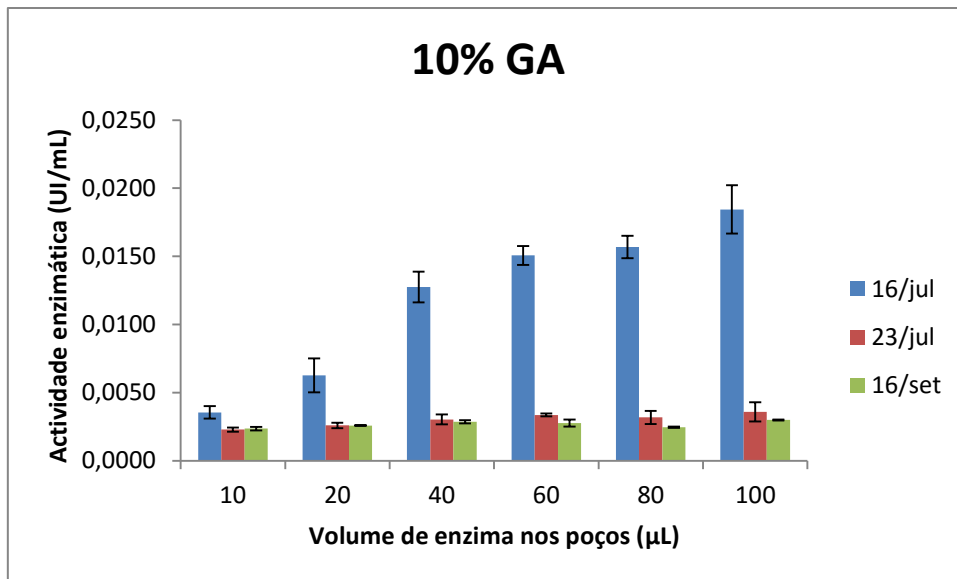


Figura 43 - Actividade enzimática da lipase de *P. aeruginosa Ph3B* imobilizada com 10% de GA (v/v) nos dias 16 e 23 de Julho e 16 de Setembro

De acordo com a figura 43, verifica-se que a lipase, ao longo do tempo, vai perdendo actividade.

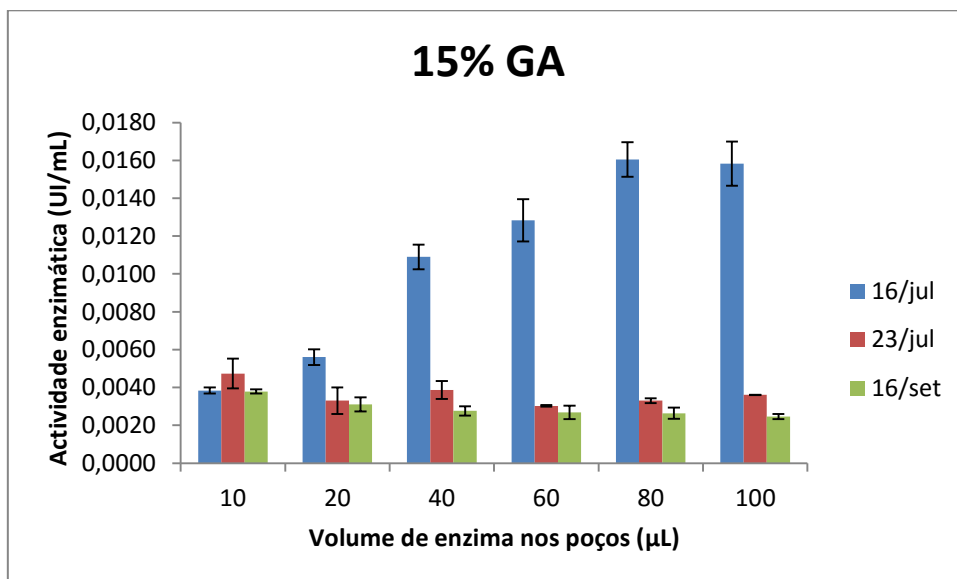


Figura 44 - Actividade enzimática da lipase de *P. aeruginosa Ph3B* imobilizada com 15% de GA (v/v) nos dias 16 e 23 de Julho e 16 de Setembro

De acordo com a figura 44, verifica-se que a lipase, ao longo do tempo, vai perdendo actividade.

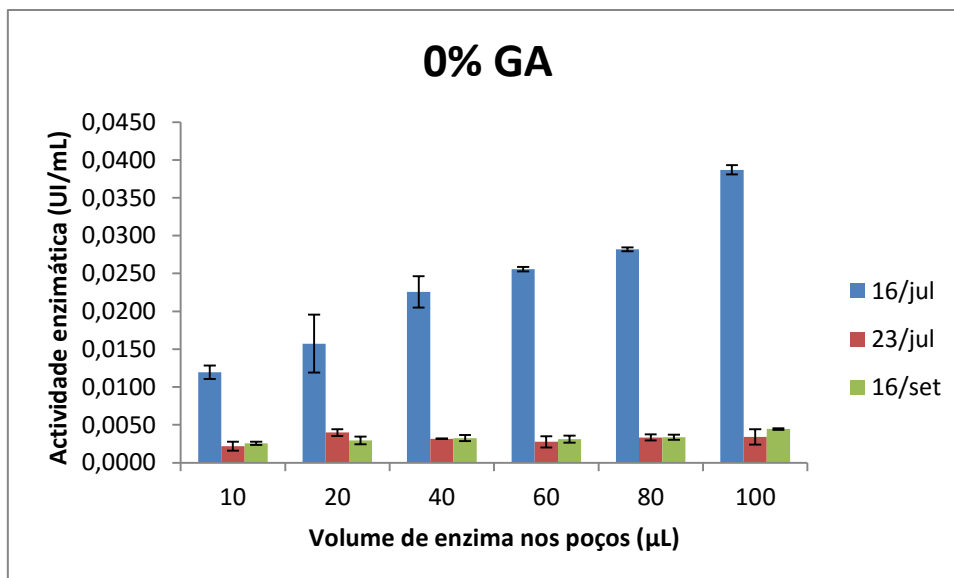


Figura 45 - Actividade enzimática da lipase de *P. aeruginosa Ph3B* imobilizada sem GA (v/v) nos dias 16 e 23 de Julho e 16 de Setembro

De acordo com a figura 45, verifica-se que a lipase, ao longo do tempo, vai perdendo actividade.

3.6.2.2. Microplaca de 24 poços

Procedeu-se a dois doseamentos da actividade enzimática (no próprio dia que se imobilizou a lipase e no dia seguinte) da lipase da estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* na microplaca de 24 poços. Como este ensaio foi realizado em microplacas de 24 poços não se conseguiu fazer duplicados.

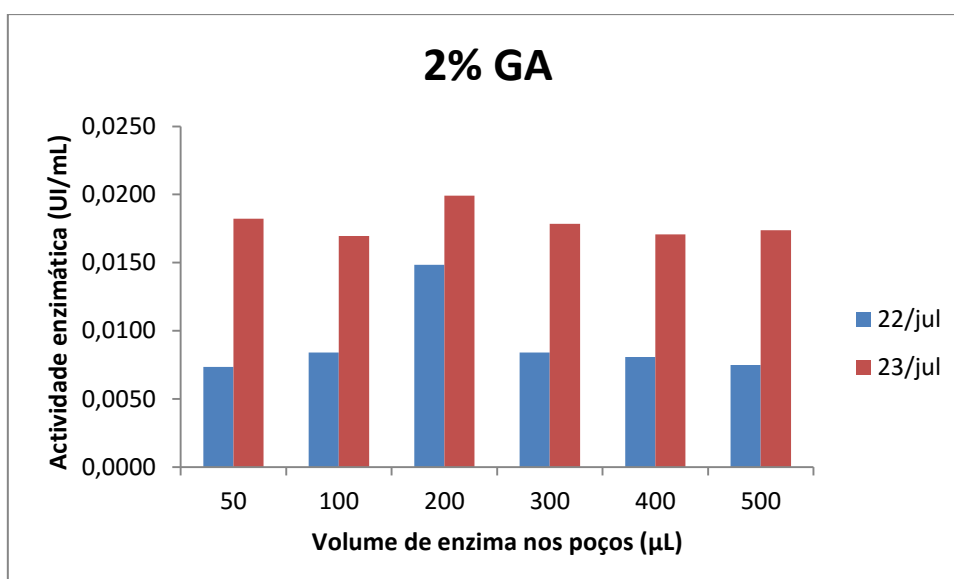


Figura 46 - Actividade enzimática da lipase de *P. aeruginosa Ph3B* imobilizada com 2% de GA (v/v) nos dias 22 e 23 de Julho

De acordo com a figura 46, verificou-se que no dia seguinte à imobilização da lipase houve um aumento da actividade enzimática. Isto ocorreu pois, ao realizar a imobilização e o doseamento, a microplaca estava à temperatura ambiente, inactivando a lipase.

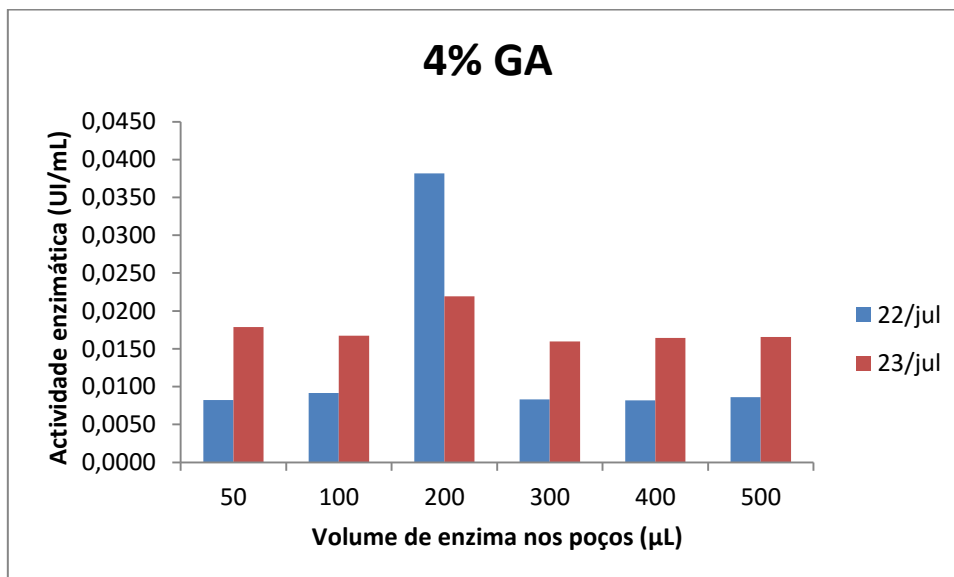


Figura 47 - Actividade enzimática da lipase de *P. aeruginosa* Ph3B imobilizada com 4% de GA (v/v) nos dias 22 e 23 de Julho

De acordo com a figura 47, verificou-se que, no primeiro doseamento de actividade enzimática, com 200 µL de lipase imobilizada e com 4% de GA (v/v), houve uma maior actividade enzimática de 0.0382 UI/mL. Com 2% de GA (v/v) só se obteve 0.0148 UI/mL.

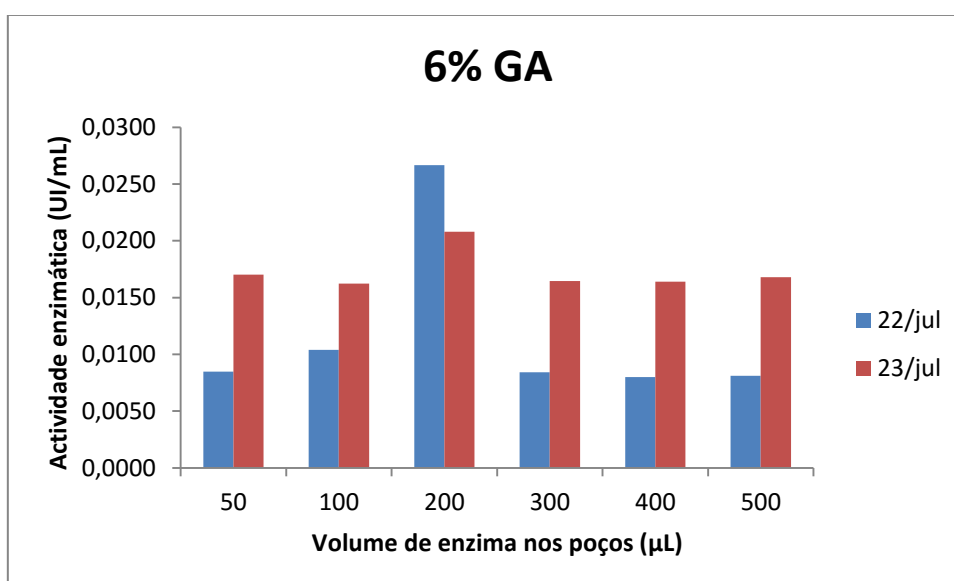


Figura 48 - Actividade enzimática da lipase de *P. aeruginosa* Ph3B imobilizada com 6% de GA (v/v) nos dias 22 e 23 de Julho

De acordo com a figura 48, verificou-se que com 200 μL de lipase e com 6% de GA (v/v) já houve uma diminuição de actividade enzimática de 0.0382 UI/mL para 0.0267 UI/mL.

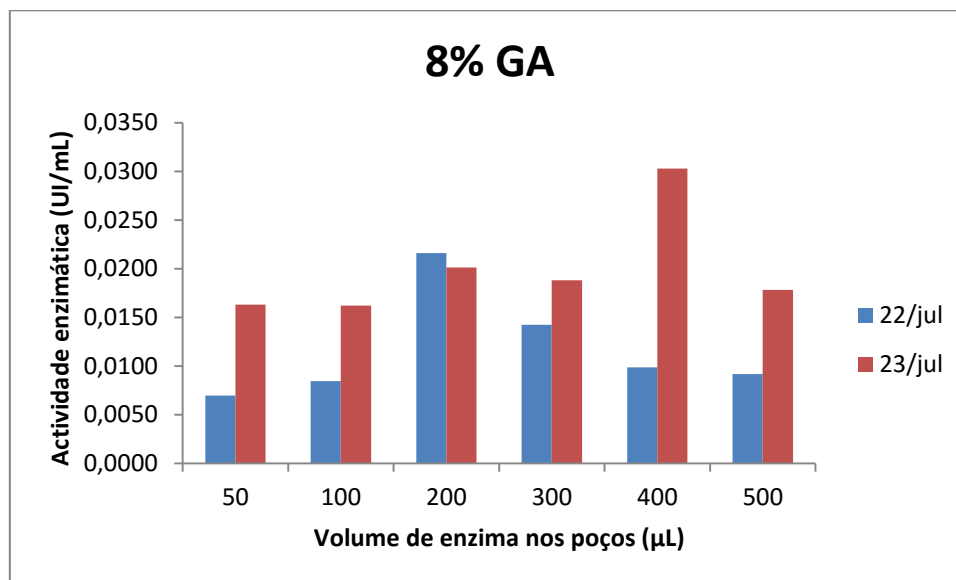


Figura 49 - Actividade enzimática da lipase de *P. aeruginosa Ph3B* imobilizada com 8% de GA (v/v) nos dias 22 e 23 de Julho

De acordo com a figura 49, verificou-se que com 200 μL de lipase e com 8% de GA (v/v) já houve uma diminuição de actividade enzimática de 0.0267 UI/mL para 0.0216 UI/mL.

3.7. Comportamento cromatográfico das lipases das estirpe *P. aeruginosa Ph3B* e *L10*, *Phlebia rufa* (PM) e *Ganoderma lucidum violeta* (GV) através de IMAC

O comportamento cromatográfico das lipases nos diferentes metais, a diferentes pH e com diferentes resinas está sumarizado na tabela 23.

Tabela 23 - Comportamento cromatográfico da lipase de várias estirpes microbianas em quelatos de metais imobilizados (R6 – resina Sepharose 6B-EPI-IDA, R2 – resina Sepharose 6B-BDGE-IDA, R3 – resina Sepharose 4B-BDGE -IDA e R4 – resina Sepharose 4B-EPI-IDA)

| | pH | Resina | Cu(II) | Ni(II) | Zn(II) | Co(II) |
|--|----|--------|--------|--------|--------|--------|
| Lipase da estirpe bacteriana Ph3B de <i>P. aeruginosa</i> | 6 | R6 | ± | + | + | + |
| | 7 | | + | - | + | - |
| | 8 | | + | + | + | + |
| Lipase da estirpe bacteriana L10 de <i>P. aeruginosa</i> | 6 | R6 | + | + | + | + |
| | | R2 | + | | | |
| | | R3 | + | | | |
| | | R4 | + | | | |
| | 7 | R6 | + | - | - | - |
| | | R2 | + | | | |
| | | R3 | + | | | |
| | | R4 | + | | | |
| | 8 | R6 | + | + | + | + |
| | | R2 | + | | | |
| | | R3 | + | | | |
| | | R4 | + | | | |
| Lipase da estirpe fúngica <i>Phlebia rufa</i> | 6 | R6 | + | + | + | + |
| | | R2 | + | | | |
| | | R3 | + | | | |
| | | R4 | + | | | |
| | 7 | R6 | + | + | - | - |
| | | R2 | + | | | |
| | | R3 | ± | | | |
| | | R4 | ± | | | |
| | 8 | R6 | + | + | + | + |
| | | R2 | + | | | |
| | | R3 | + | | | |
| | | R4 | + | | | |
| Lipase da estirpe fúngica <i>Ganoderma lucidum violota</i> | 6 | R6 | + | + | + | + |
| | | R2 | + | | | |
| | | R3 | + | | | |
| | | R4 | + | | | |
| | 7 | R6 | + | + | - | - |
| | | R2 | + | | | |
| | | R3 | - | | | |
| | | R4 | - | | | |
| | 8 | R6 | + | + | + | + |
| | | R2 | + | | | |
| | | R3 | + | | | |
| | | R4 | + | | | |

- + : Verificou-se adsorção da lipase à coluna, não foi detetada actividade enzimática na etapa de lavagem.
- : Verificou-se que a lipase não ficou adsorvida na coluna, uma vez que a actividade total foi recuperada na etapa de lavagem.

Verificou-se que o Cu (II) possui uma maior afinidade pelas lipases, retendo-as na fase de lavagem. O pH 7 não é o mais indicado para a purificação das lipases destas estirpes pois desadsorção da lipase na fase de lavagem.

3.8. Purificação da lipase das estirpes *Ph3B* e *AI3* de *P. aeruginosa* com o metal Cu(II)

De acordo com a informação retirada dos resultados do procedimento 3.6, procedeu-se à realização de diversas cromatografias em colunas com 5 mL de Sepharose 6B-EPI-IDA e Sepharose 6B-BDGE-IDA. A Sepharose 6B-EPI-IDA foi lavada com iões de Cu(II) a pH 7 e a eluição foi realizada com tampão contendo 500 mM de imidazole.

A Sepharose 6B-BDGE-IDA foi lavada com iões de Cu(II) a diferentes pH (7 e 8). A eluição das lipases da coluna foram realizada com tampão de eluição com 500 mM de imidazole, 250 mM de imidazole e com 10 mM de imidazole no tampão de equilíbrio.

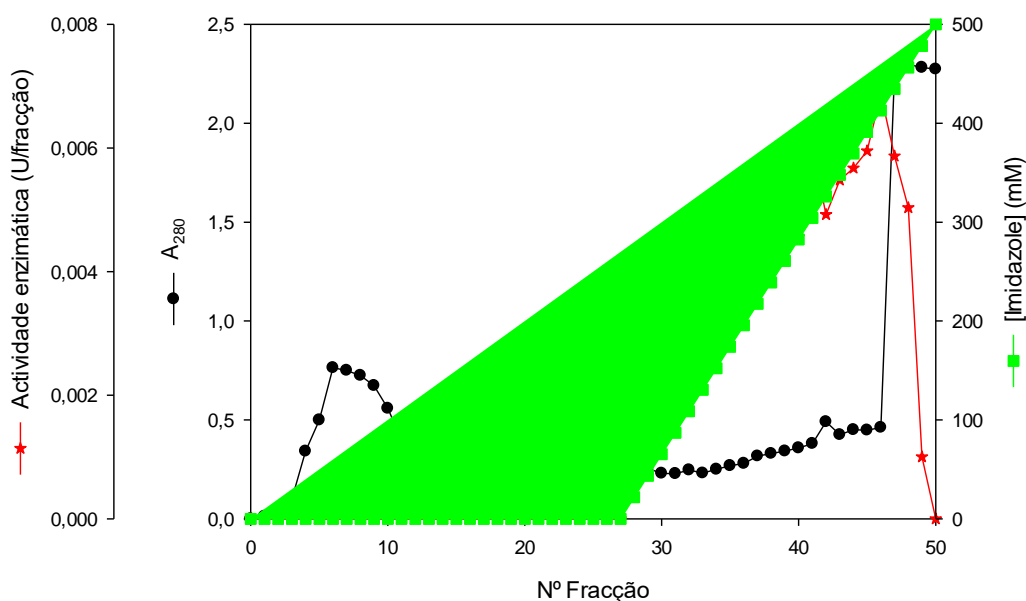


Figura 50 - Comportamento cromatográfico da lipase da estirpe mutante *AI3* de *P. aeruginosa* numa coluna com Sepharose 6B-BDGE-IDA-Cu(II), a pH 7 e com um gradiente de 0 a 500 mM (2 mL de cada fração)

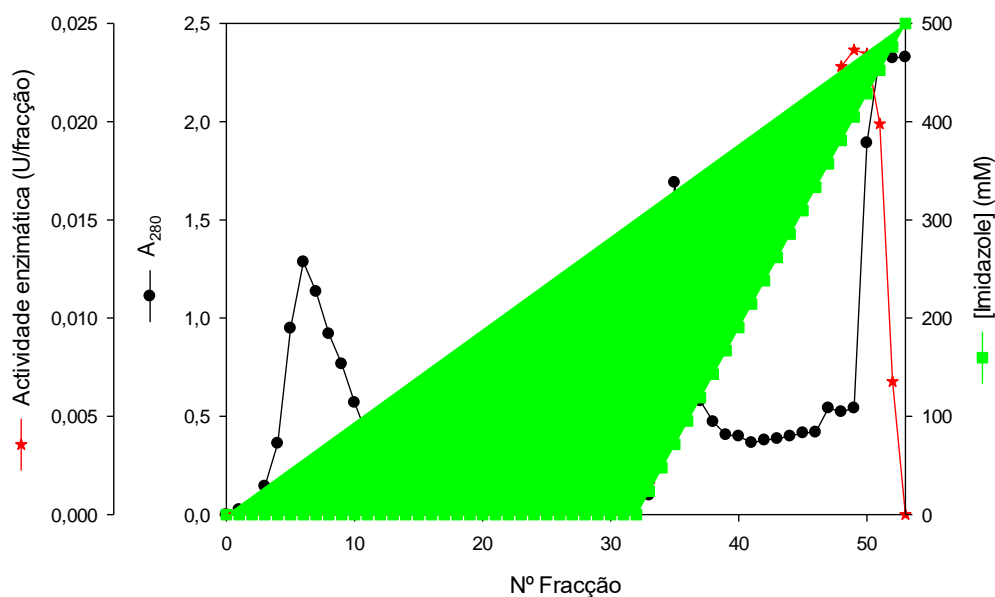


Figura 51 - Comportamento cromatográfico da lipase da estirpe mutante AI3 de *P. aeruginosa* numa coluna com Sepharose 6B-BDGE-IDA-Cu(II), a pH 8 e com um gradiente de 0 a 500 mM (2 mL de cada fracção)

De acordo com as figuras 50 e 51, verifica-se que a concentração de imidazole necessário para a desadsorção da proteína da coluna aumenta em função do pH da fase móvel.

O mesmo acontece com a retenção de proteínas que não possuem grupos de histidina. Este resultado acontece devido à ligação do grupo α -amino não protonada com o metal quelato a pH elevado. Ao diminuir o pH da fase móvel para 6, ocorre interações selectivas com os resíduos de histidina disponíveis na superfície da proteína, e assim, a desorção da proteína é conseguida com uma concentração de imidazole mais baixa na fase móvel. (Freixo, M., *et al.*, 2008)

Tabela 24 – Tabela de purificação da lipase da estirpe mutante AI3 de *P. aeruginosa* numa coluna com Sepharose 6B-BDGE-IDA-Cu(II), a pH 7 e com um gradiente de 0 a 500 mM (figura 47)

| | Proteína total (mg) | Actividade enzimática total (UI) | Act. Específica (UI/mg) | Rendimento (%) | Factor de purificação |
|-------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|----------------|-----------------------|
| Sobrenadante da cultura | 10,852 | 2,60E-01 | 0,024 | 100 | 1 |
| Eluído da coluna | 5,979 | 1,79E-01 | 0,03 | 69 | 1,25 |

Tabela 25 – Tabela de purificação da lipase da estirpe mutante *A13* de *P. aeruginosa* numa coluna com Sepharose 6B-BDGE-IDA-Cu(II), a pH 8 e com um gradiente de 0 a 500 mM (figura 48)

| | Proteína total (mg) | Actividade enzimática total (UI) | Act. Específica (UI/mg) | Rendimento (%) | Factor de purificação |
|-------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|----------------|-----------------------|
| Sobrenadante da cultura | 25,107 | 1,56E-01 | 6,20E-03 | 100 | 1 |
| Eluído da coluna | 24,982 | 4,12E-01 | 1,65E-02 | 265 | 2,66 |

O comportamento cromatográfico (utilizando Sepharose 6B-EPI-IDA-Cu(II)), pH 7 e um gradiente de 0 a 500 mM) das lipases das estirpes *Ph3B* e *A13* de *P. aeruginosa* apresentam-se nas figuras 52 e 53.

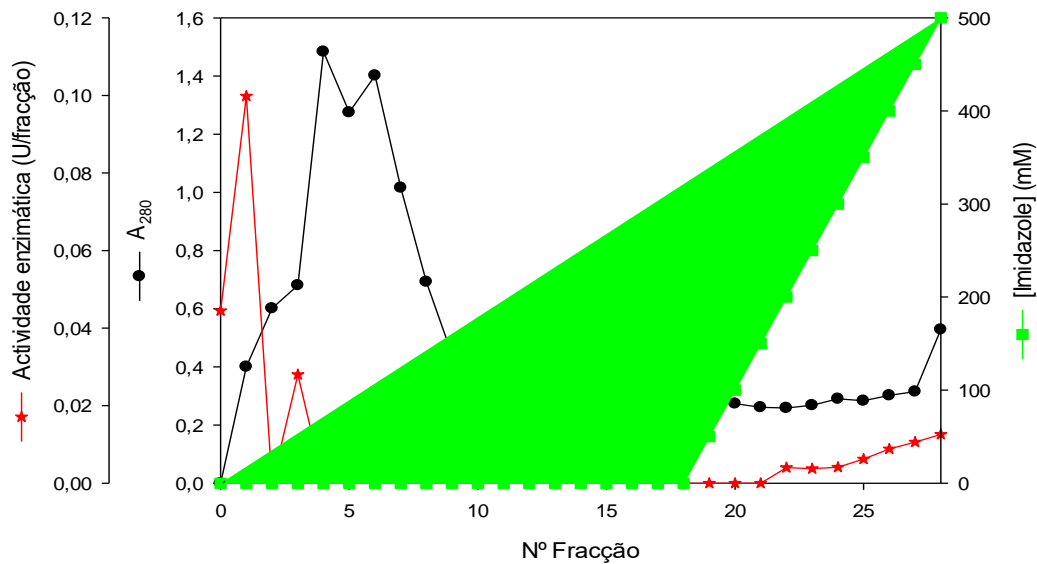


Figura 52 - Comportamento cromatográfico da lipase da estirpe mutante *A13* de *P. aeruginosa* numa coluna com Sepharose 6B-EPI-IDA-Cu(II), a pH 7 e com um gradiente de 0 a 500 mM (2 mL de cada fracção)

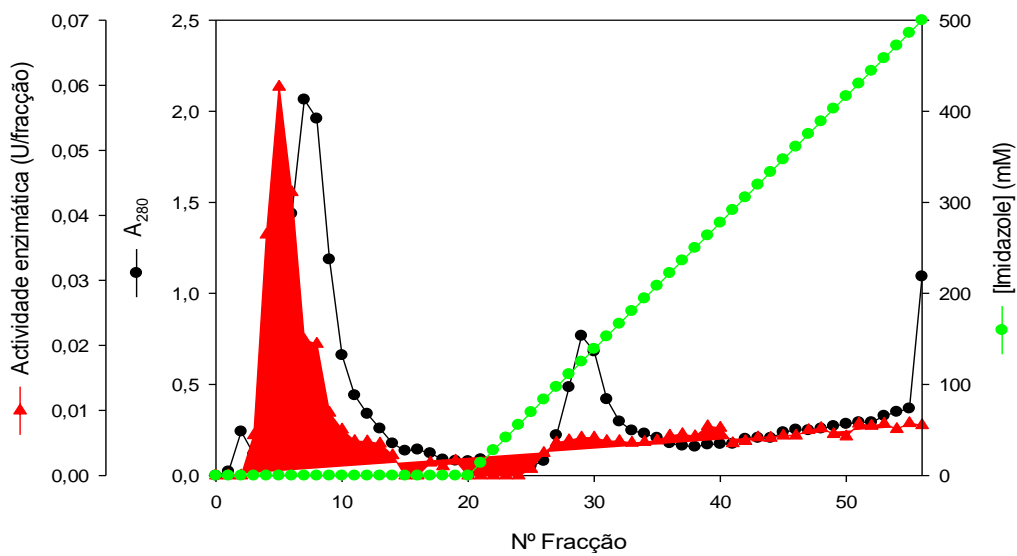


Figura 53 - Comportamento cromatográfico da lipase da estirpe mutante *Ph3B* de *P. aeruginosa* numa coluna com Sepharose 6B-EPI-IDA-Cu(II), a pH 7 e com um gradiente de 0 a 500 mM (2 mL de cada fracção)

Verifica-se que estas resinas não são adequadas para a purificação das lipases produzidas por estas estirpes, pois saí uma quantidade de lipase na fase de lavagem e quase nenhuma na fase de eluição.

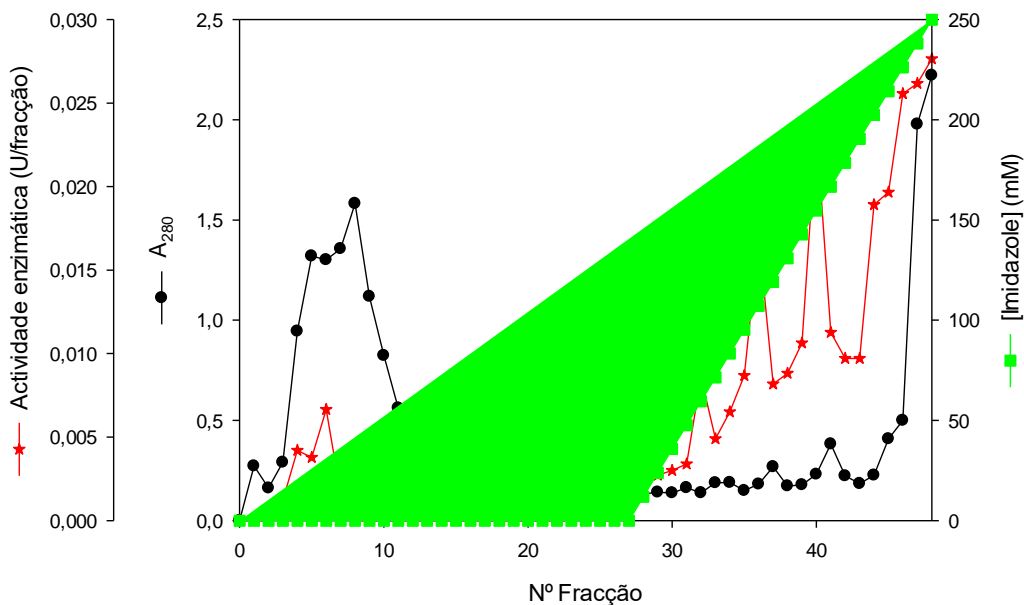


Figura 54 - Comportamento cromatográfico da lipase da estirpe mutante *A13* de *P. aeruginosa* numa coluna com Sepharose 6B-BDGE-IDA-Cu(II), a pH 8 e com um gradiente de 0 a 250 mM (2 mL de cada fracção)

De acordo com a figura 54, verifica-se que um gradiente de 0 a 250 mM não é o suficiente para haver a eluição completa da lipase da estirpe *A13* de *P. aeruginosa* desta resina.

De maneira a confirmar que as interações desta lipase com Cu(II) imobilizado são devido à coordenação entre os resíduos de histidina disponíveis na molécula da enzima e os íons quelatos metálicos, a corrida cromatográfica foi realizada com imizadole no tampão de equilíbrio. Os resultados apresentam-se na figura seguinte.

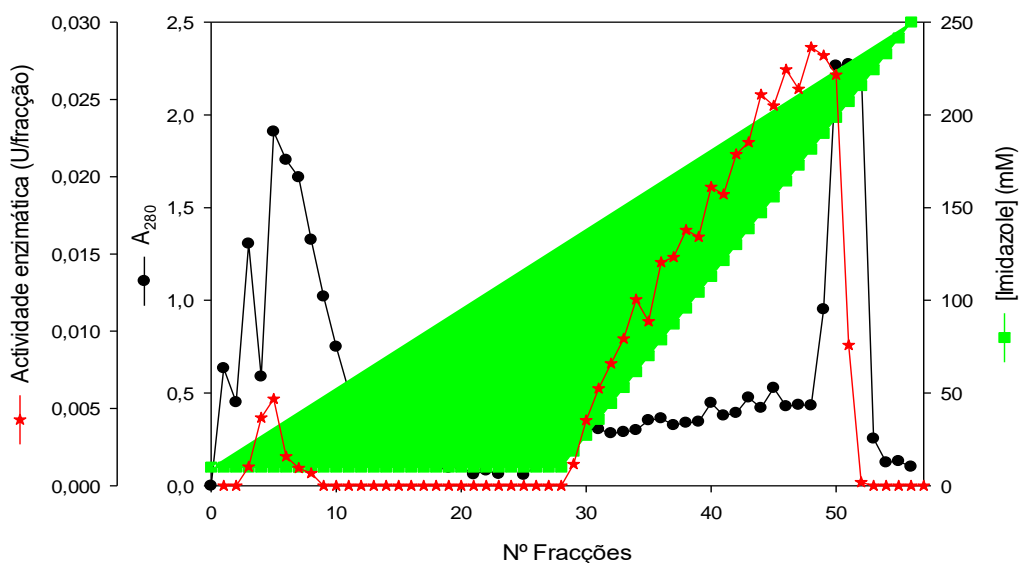


Figura 55 - Comportamento cromatográfico da lipase da estirpe mutante *AI3* de *P. aeruginosa* numa coluna com Sepharose 6B-BDGE-IDA-Cu(II), a pH 8 e com um gradiente de 10 a 250 mM. O tampão de equilíbrio continha imidazole 10 mM (2 mL de cada fracção)

De acordo com a figura 55, verifica-se que os resultados obtidos revelam que a lipase adsorve no metal quelato Cu(II) na presença de 10 mM de imidazole no tampão de equilíbrio, pois a lipase sai na fase de eluição.

3.9. Análise eletroforética por SDS e Page Nativa das lipases das estirpes *AI3* e *Ph3B* de *Pseudomonas aeruginosa*

A pureza das fracções da cromatografia utilizando uma coluna com Sepharose 6B-EPI-IDA-Cu(II) foram analisadas por SDS-PAGE e Page Nativa.

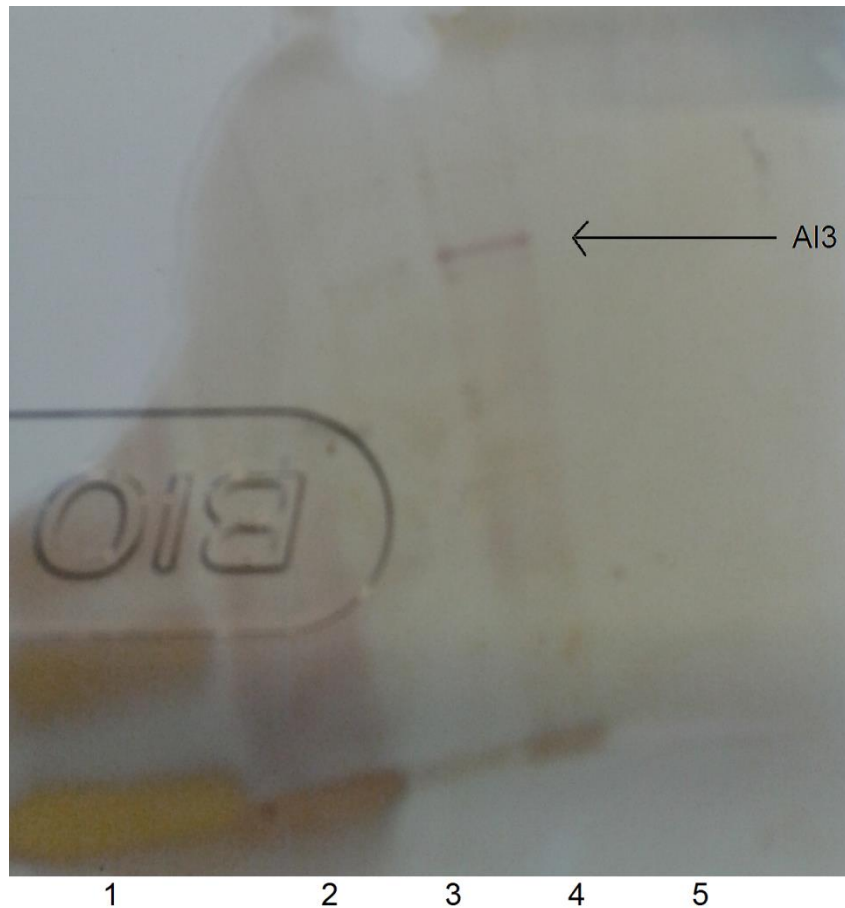


Figura 56 - Gel da PAGE Nativa apresentando uma banda da *A13* (poço 1 – marcador de BSA (66000 Da); poço 2 – marcador de ovalbumina (45000 Da); poço 3 – enzima da estirpe *Ph3B* do caldo de fermentação; poço 4 – enzima da estirpe mutante *A13* do caldo de fermentação; poço 5 – frações purificadas

De acordo com a figura 56, o gel da Page Nativa apresenta uma banda correspondente à lipase da estirpe mutante *A13* de *P.aeruginosa*. Não houve revelação das bandas das frações purificadas devido à reduzida actividade enzimática que a lipase apresentava depois de ser purificada no IMAC e os marcadores não estão revelados no gel como deveriam.

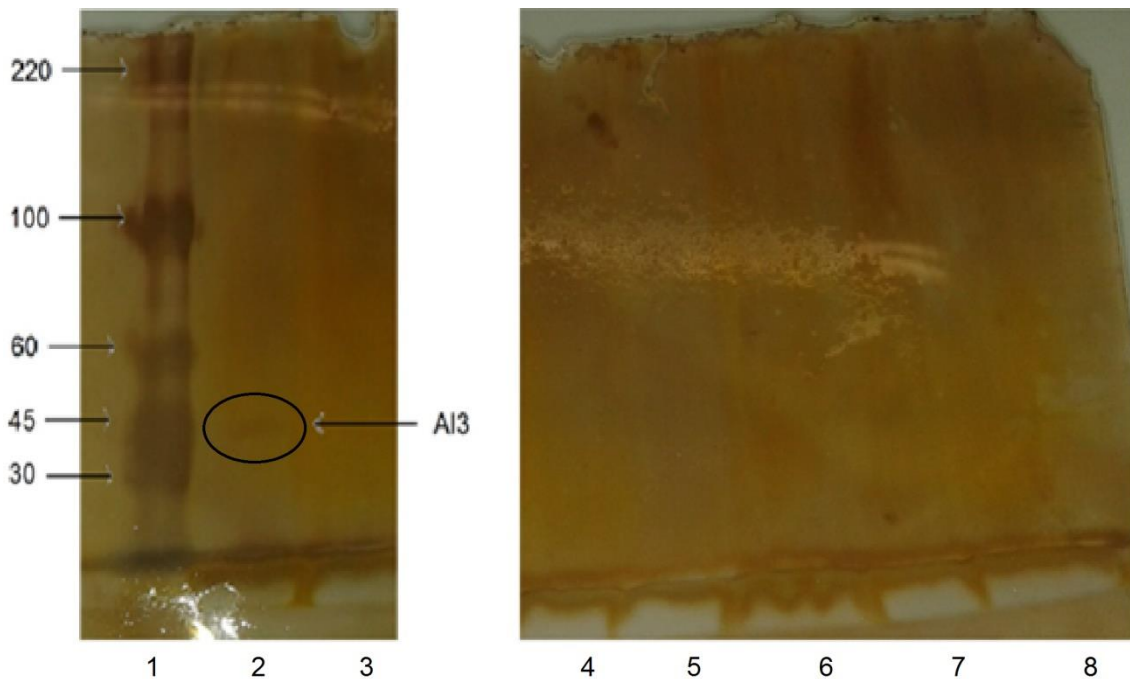


Figura 57 - Gel da SDS-PAGE apresentando uma banda da lipase de *P. aeruginosa* AI3 com uma Mr entre os 45 e os 30 kDa (poço 1 – marcadores: 220 kDa, 100 kDa, 60 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20 kDa, 12 kDa e 8 kDa; poço 2 – enzima da estirpe AI3 do caldo de fermentação; poço 3 – enzima da estirpe Ph3B do caldo de fermentação, poços 4 ao 8 – fracções de purificação)

De acordo com a figura 57, o gel da SDS-PAGE apresenta uma banda correspondente à lipase da estirpe mutante AI3 de *P.aeruginosa* com peso molecular de 30 a 45 kDa. Como este poço é do extracto celular, deveria-se ter verificado várias bandas pois o extracto apresenta várias proteínas e não está puro. Não houve revelação das bandas das fracções purificadas devido à reduzida actividade enzimática que a lipase apresentava depois de ser purificada no IMAC. Calculou-se a massa molecular da banda apresentada no poço 2, obtendo-se uma Mr de 42 kDa.

Não houve revelação de bandas nos geis revelado com o substrato *p*-NPP. Tal motivo é devido à actividade enzimática reduzida da lipase depois de purificada.

3.10. Produção enzimática de biodiesel catalisada pela lipase de *P. aeruginosa Ph3B*

3.10.1. Doseamento do biodiesel

A equação da recta, fornecida pelo gráfico de área das elipses com a % biodiesel, é $y = 1,8833x + 0,2601$ e a curva de calibração apresenta-se na figura 58. A área das elipses é dada pela equação $A = \pi * semi\ eixo\ maior * semi\ eixo\ menor$,

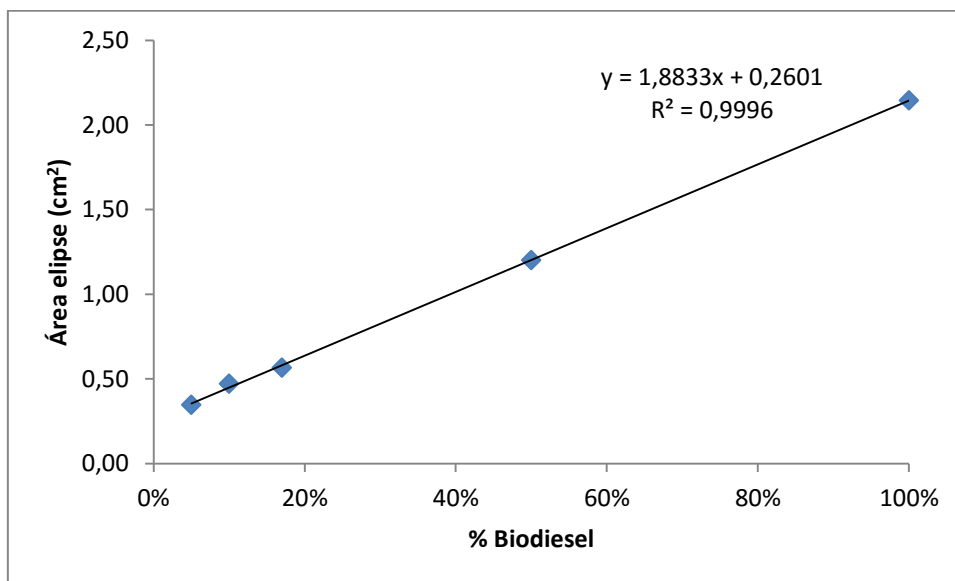


Figura 58 - Curva de calibração da área das elipses vs % biodiesel

Realizou-se o doseamento da actividade enzimática das várias células posteriormente congeladas que apresentavam uma boa actividade enzimática antes de serem congeladas. As células congeladas utilizadas foram da estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* do meio de cultura com azeite e com Tween 20, onde apresentavam uma actividade enzimática de 0.0557 UI/mL e de 0.0604 UI/mL, para o meio de cultura com azeite, e 0.0564 UI/mL e de 0.0476 UI/mL, para o meio de cultura com Tween 20.

Fez-se uma TLC com várias concentrações de biodiesel e mediram-se os eixos maiores e menores das elipses de biodiesel e calculou-se a sua área, como se verifica na figura 59.

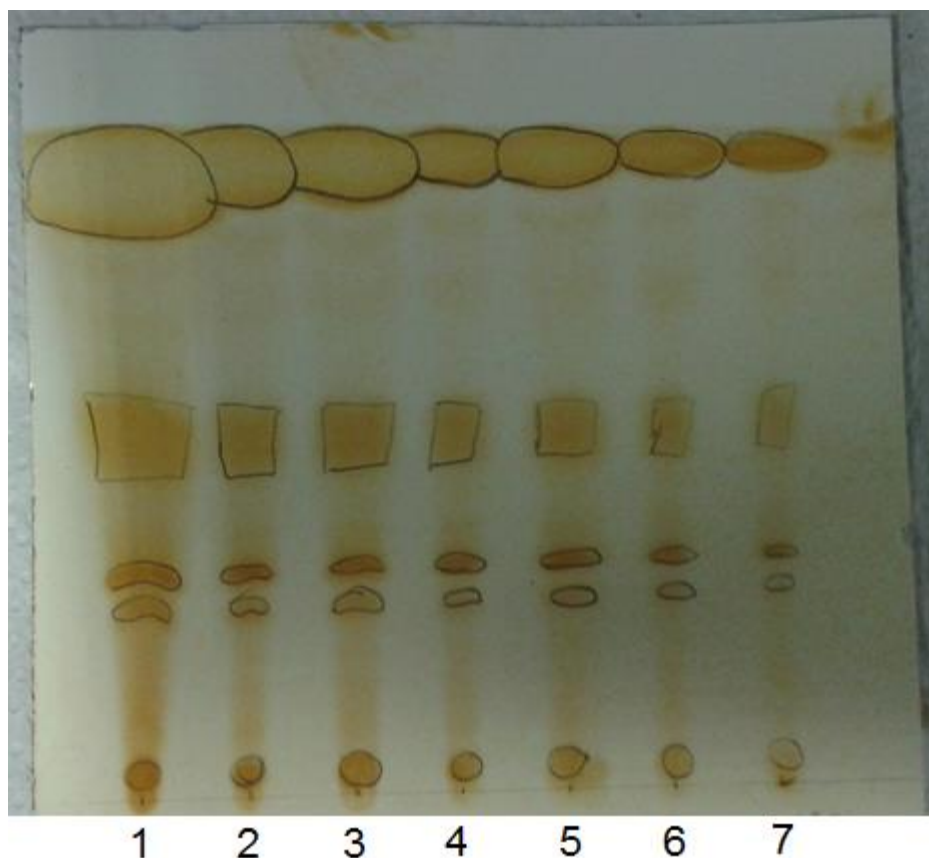


Figura 59 - TLC com diferentes concentrações de biodiesel em óleo vegetal trfinado (1 ao 7 - 100%, 50%, 25%, 17%, 13%, 10% e 5%, respectivamente)

A recta de calibração do doseamento do glicerol é dada pela seguinte equação $y = 1.1589x - 0.0042$ e é apresentada na figura 60.

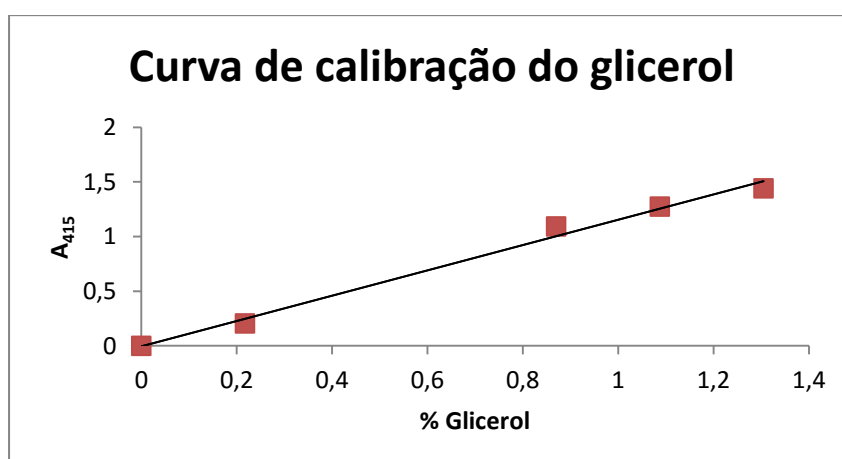


Figura 60 - Curva de calibração do glicerol de 0% a 1.5%, utilizando o método de doseamento do periodato de sódio e da acetilacetona

3.10.2. Doseamento do glicerol utilizando diferentes volumes de suspensão celular de *P. aeruginosa Ph3B*, de lipase livre e de lipase comercial NS-88003

A actividade enzimática da lipase extracelular da estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* (inoculada no meio de cultura com Tween 20) era de 0.0943 UI/mL.

Utilizou-se uma microplaca de 24 poços para fazer a reacção de transesterificação (não se fez triplicados porque as amostras não tinham uma quantidade suficiente para se fazer triplicados no doseamento do glicerol).

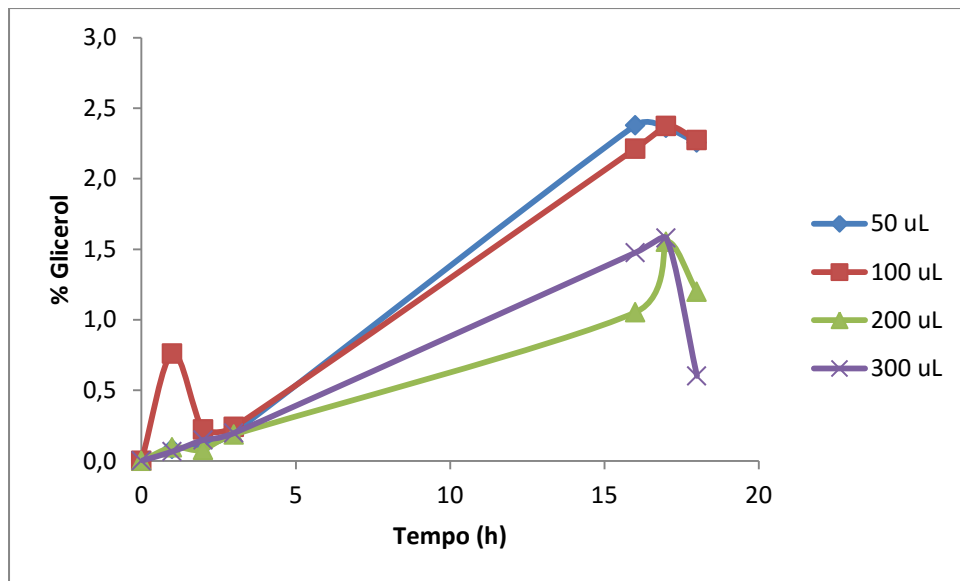


Figura 61 – Curvas de progresso da produção de glicerol a partir da reacção de transesterificação utilizando suspensão celular de *P. aeruginosa Ph3B*

De acordo com a figura 61, verifica-se que com 50 μ L de suspensão celular ao fim de 16 horas obteve-se 2,4% de glicerol. Quanto mais elevada é a quantidade de suspensão celular usada, menor a concentração de glicerol que se obtêm. Este resultado é devido à elevada quantidade de água que a suspensão celular possui. Quanto mais suspensão celular, maior a quantidade de água no meio e menor a produção de biodiesel e de glicerol.

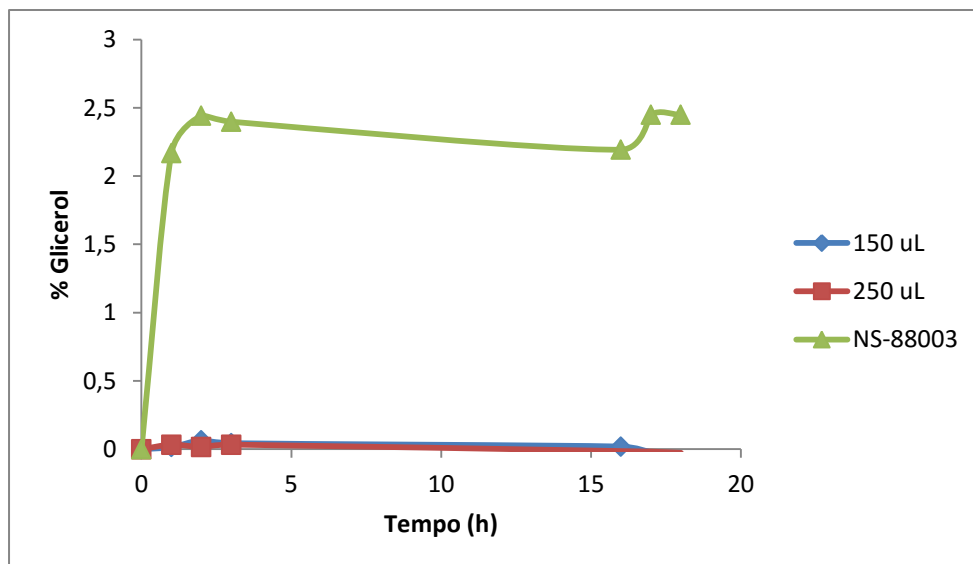


Figura 62 - Curvas de progresso da produção de glicerol a partir da reação de transesterificação utilizando suspensão celular de *P. aeruginosa Ph3B* e lipase comercial imobilizada NS-88003 (lipozyme RM IM)

De acordo com a figura 62, verifica-se que entre utilizar suspensão celular ou a lipase livre, o melhor a utilizar é a suspensão celular pois apresentam uma maior produção de glicerol. A lipase comercial imobilizada, NS-88003, é a que apresenta uma maior produção de glicerol pois esta lipase é própria para a produção de biodiesel.

3.10.3. Doseamento do glicerol e do biodiesel utilizando diferentes volumes de suspensão celular de *P. aeruginosa Ph3B* e de lipase comercial imobilizada NS-88002 e NS-88003

Utilizou-se uma microplaca de 24 poços para fazer a reação de transesterificação e deixou-se a microplaca na incubadora durante 2 dias (fez-se duplicados) e procedeu-se ao doseamento do glicerol. De seguida, centrifugou-se a microplaca de 24 poços que continha a suspensão celular, lavou-se três vezes os poços com tampão de fosfatos a pH 7 0.1 mM e colocou-se a mistura reacional mencionada em cima. No dia seguinte (46 horas no total), realizou-se o doseamento do glicerol para se verificar se se podia reutilizar as células.

Os volumes das misturas reacionais contendo as lipases comerciais imobilizadas não permitiram realizar doseamentos depois das 20 horas.

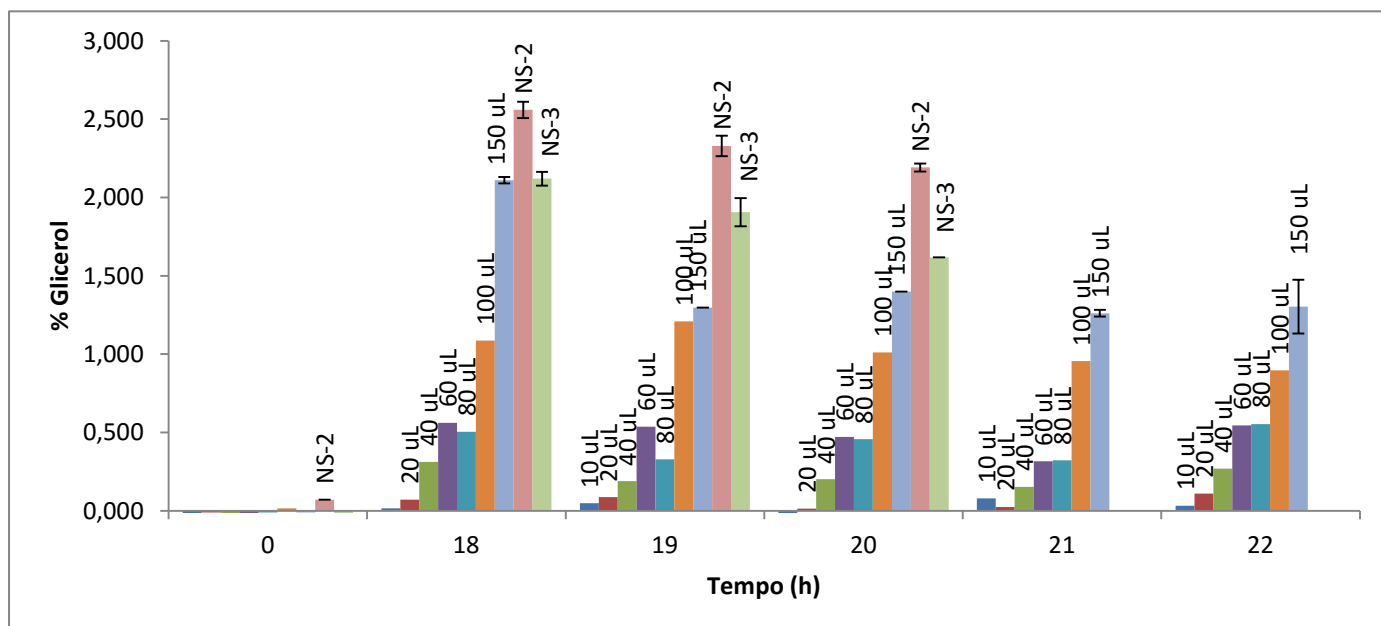


Figura 63 - Progresso da produção de glicerol a partir da reação de transesterificação utilizando suspensão celular de *P. aeruginosa Ph3B* e lipase comercial imobilizada e reutilização das células (ao fim de 46 horas)

De acordo com a figura 63, verifica-se que a partir de uma quantidade de 100 μL de suspensão celular já se produz uma quantidade significativa de glicerol, ao fim de 18 horas (1.2% glicerol). A enzima NS-88002 produz uma maior quantidade de glicerol que a enzima própria para a produção de biodiesel (NS-88003).

A TLC realizado com as amostras deste ensaio apresenta-se na figura 64.

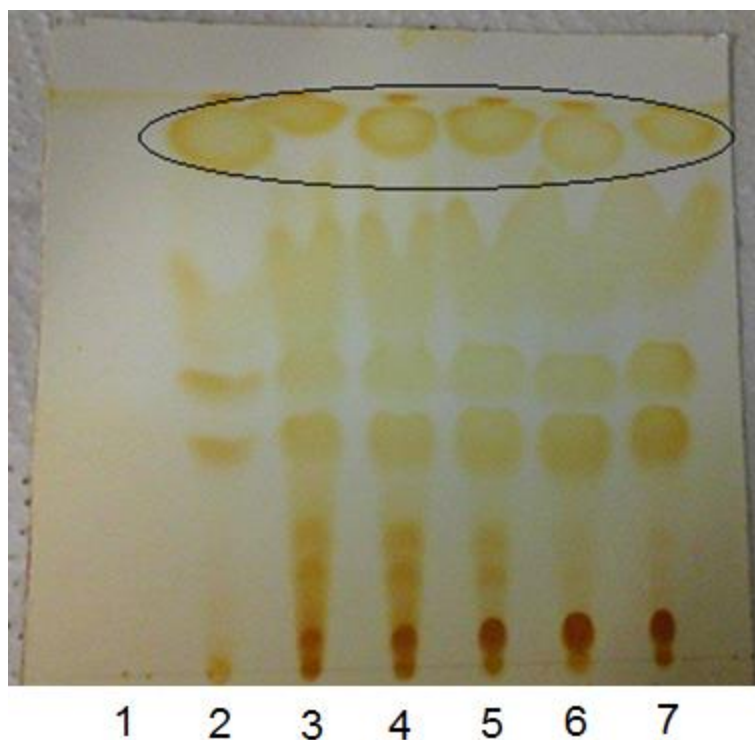


Figura 64 - TLC das misturas reacionais contendo suspensão celular de *P. aeruginosa Ph3B* (1 – glicerol; 2 – controlo negativo; 3 – 80 μL de células ao fim de 22 horas; 4 – 100 μL de células ao fim de 19 horas; 5 – 150 μL de células ao fim de 18 horas; 6 e 7 – NS-88002 e NS-88003 ao fim de 18 horas, respectivamente)

A % FAME, produzida pela reação de transesterificação a partir de azeite virgem, foi calculada e é apresentada na tabela 26.

Tabela 26 - Quantidade de células versus % FAME

| Tempo (h) | Amostras | A elipse (cm^2) | % FAME |
|-----------|----------|----------------------------|--------|
| 22h | 80 | 0,511 | 13,3 |
| 19h | 100 | 0,605 | 18,3 |
| 18h | 150 | 0,770 | 27,1 |
| 18h | NS-2 | 0,660 | 21,2 |
| 18h | NS-3 | 0,471 | 11,2 |

Verifica-se que, ao fim de 18 h, utilizando 150 μL de suspensão celular tem-se uma maior % biodiesel (27.1%) que utilizando 80 μL de suspensão celular ao fim de 22h, pois utilizou-se uma maior quantidade de células. A enzima comercial que é utilizada para a produção de biodiesel (NS-88003) apresentou 11,2% de biodiesel enquanto que a NS-2 teve uma produção de biodiesel de 21.1 %.

3.10.4. Doseamento do glicerol e de biodiesel utilizando a lipase da estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* imobilizada em 6 poços, diferentes volumes de suspensão celular de *P. aeruginosa Ph3B* e de lipase comercial NS-88002 e NS-88003

Fez-se a reacção de transesterificação com a lipase imobilizada da estirpe mutante *Ph3B* numa microplaca de 48 poços em 6 poços (do poço 1 ao poço 3 imobilizou-se 50 μ L de lipase e do poço 4 ao 6 imobilizou-se 100 μ L de lipase), com 100 μ L e 150 μ L de suspensão celular da estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* e NS-2 e NS-3. A actividade enzimática da lipase imobilizada nos 6 poços utilizados está apresentada na figura 65.

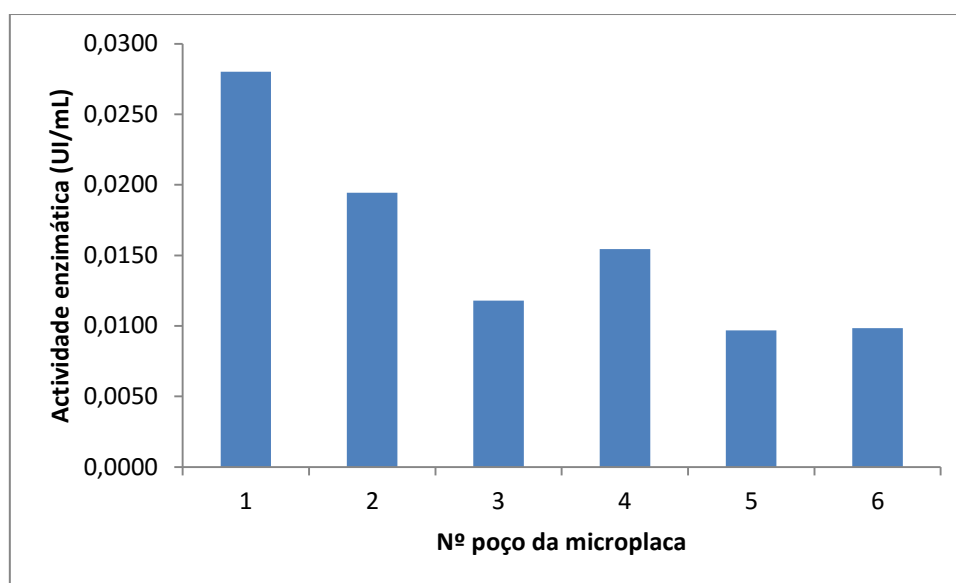


Figura 65 - Actividade enzimática da lipase da estirpe mutante *Ph3B* de *P. aeruginosa* imobilizada em 6 poços de uma microplaca de 48 poços

O resultado do doseamento do glicerol é apresentado na figura 66. Verifica-se que, ao contrário da suspensão celular e das enzimas comerciais, utilizando a lipase imobilizada não se produz glicerol.

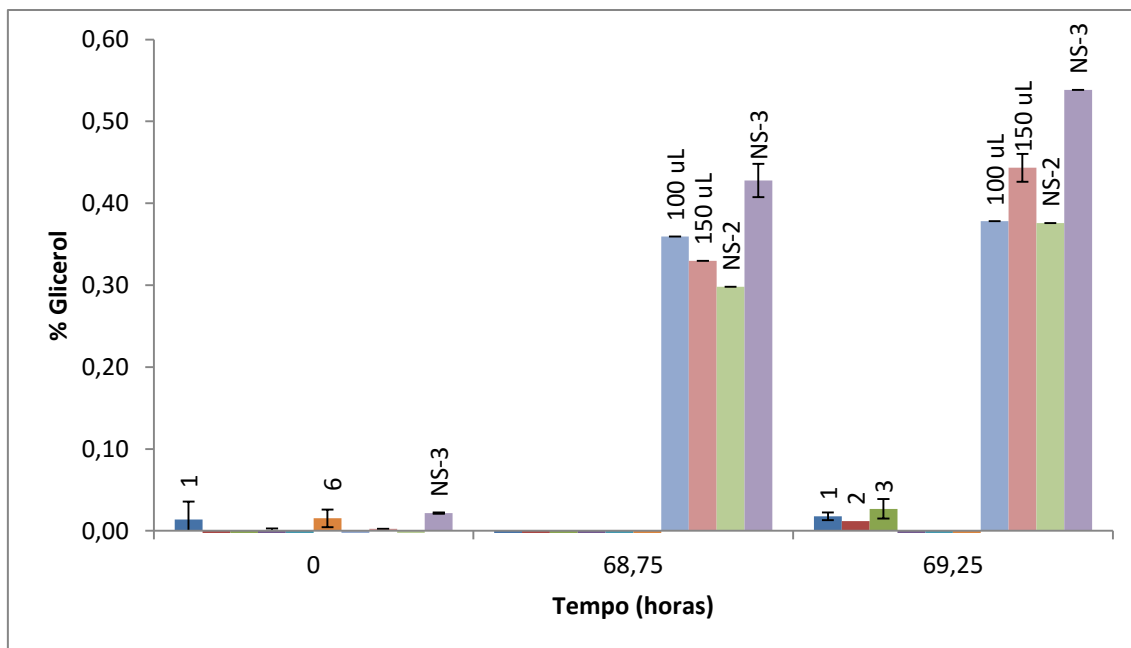


Figura 66 - Quantidade de glicerol produzido utilizando lipase de *P. aeruginosa Ph3B* imobilizada, células de *P. aeruginosa Ph3B* e lipases comerciais

Realizou-se uma TLC com as amostras dos poços 2 e 4 com a enzima imobilizada, com 100 μ L e 150 μ L de suspensão celular e NS-3 ao fim de 69.25 horas. A TLC é apresentado na figura 67.

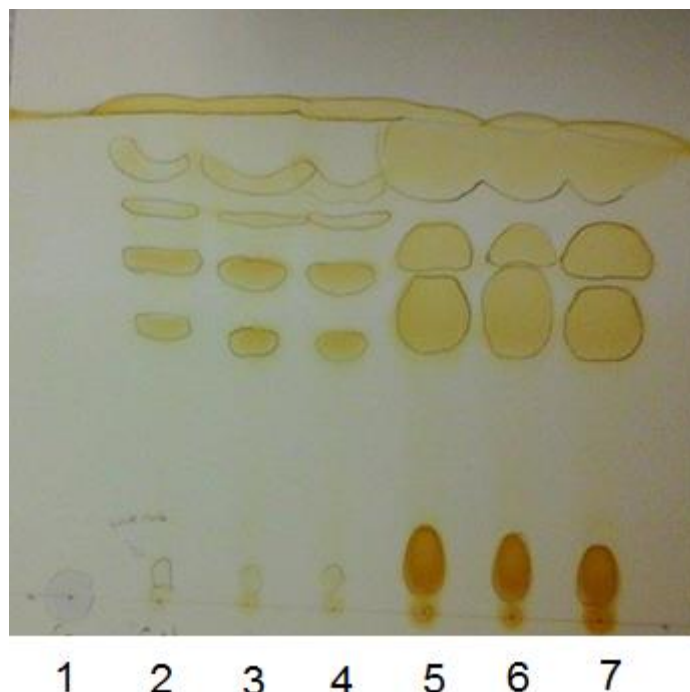


Figura 67 - TLC das amostras das misturas reacionais (1 – glicerol; 2 – controlo negativo; 3 e 4 - enzima imobilizada dos poço 2 e 4, respectivamente; 5 ao 7 - 100 μ L, 150 μ L de células e NS-88003 ao fim de 69.25 horas, respectivamente)

Ao calcular-se a área das elipses e a % de FAME (a partir de azeite virgem), de acordo com a tabela 27, verifica-se que só 100 μ L e 150 μ L de

suspensão celular e lipase comercial NS-3 é que produziram biodiesel. Estes valores estão de acordo com a figura 61, que mostra que a enzima imobilizada ao fim de 69.25 horas não produziram biodiesel.

Tabela 27 - Área das elipses vs % biodiesel

| Tempo (h) | Amostras | A elipse (cm ²) | % FAME |
|-----------|----------|-----------------------------|--------|
| 69,25 | 2 | 0,000 | 0,0 |
| 69,25 | 4 | 0,000 | 0,0 |
| 69,25 | 100 | 1,210 | 50,4 |
| 69,25 | 150 | 1,100 | 44,6 |
| 69,25 | NS-3 | 0,990 | 38,7 |

3.10.5. Doseamento do glicerol e do biodiesel utilizando diferentes volumes de suspensão celular de *P. aeruginosa Ph3B* e de lipase comercial NS-88002 e NS-88003 utilizando óleo usado com e sem aquecimento

Utilizou-se uma microplaca de 24 poços para fazer a reacção de transesterificação com óleo usado e com óleo usado aquecido (não se fez duplicados porque não se tinha as amostras em quantidades suficientes).

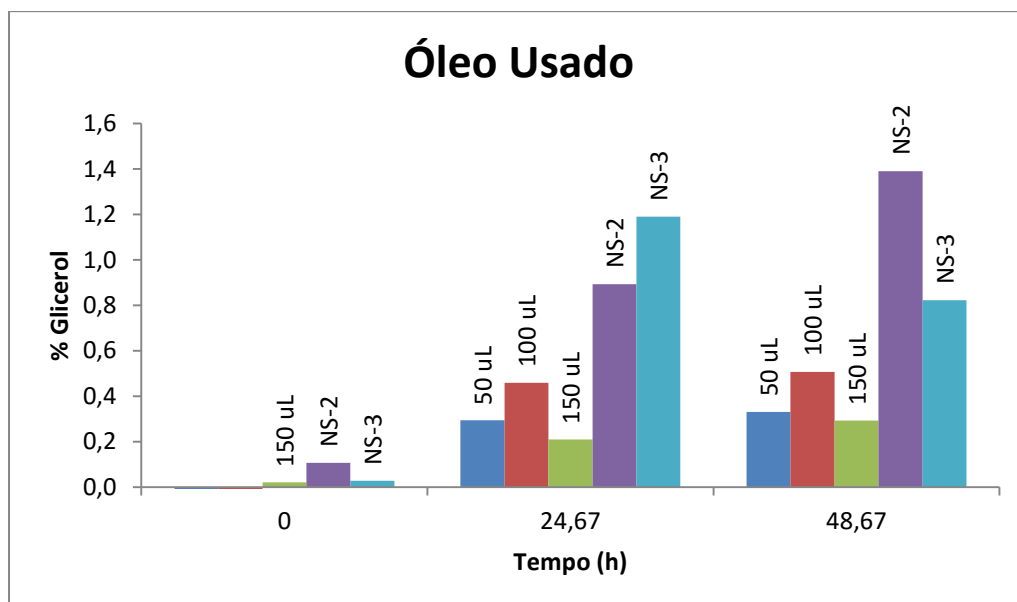


Figura 68 - Quantidade de glicerol obtido pela reacção de transesterificação com óleo usado e diferentes volumes de suspensão celular de *P. aeruginosa Ph3B*

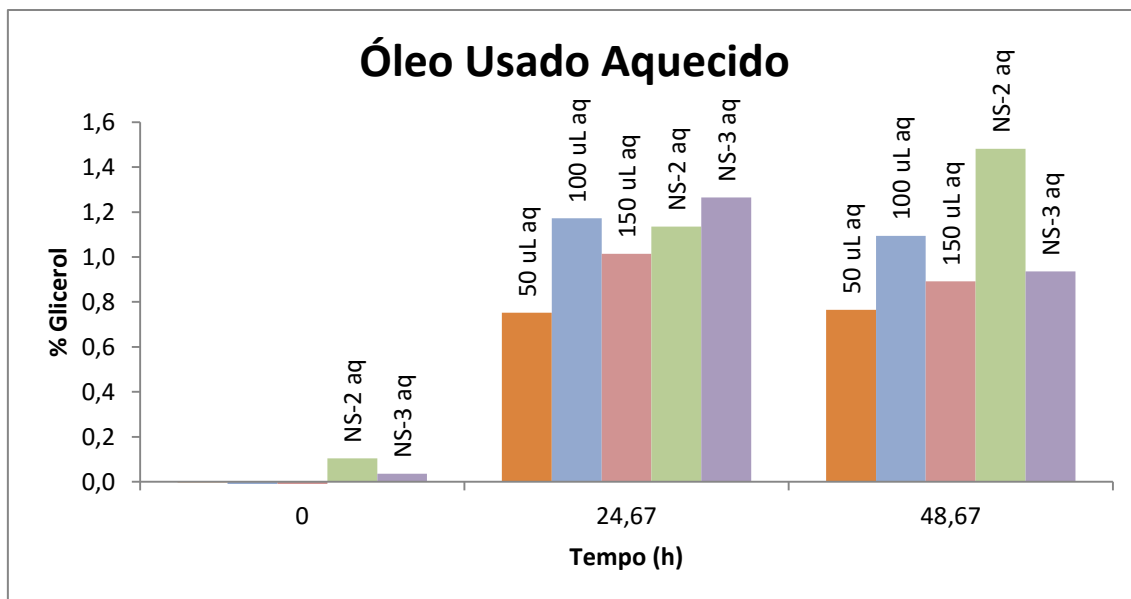


Figura 69 - Quantidade de glicerol obtido pela reacção de transesterificação com óleo usado aquecido e diferentes volumes de suspensão celular de *P. aeruginosa Ph3B*

De acordo com a figura 69, usando óleo usado aquecido as células apresentam uma maior produção de glicerol. Ao fim de 24.67 h e com 100 μ L de suspensão celular produziu-se 1.2% de glicerol.

Ao aquecer o óleo usado, remove-se a água que existe no meio e quanto menor quantidade de água, melhor para a produção de biodiesel.

Fez-se um doseamento do glicerol ao fim de 3 dias (66.25 horas) e ao fim de 7 dias (166.5 horas) para se verificar se as células podiam ser reutilizadas. Não se fez duplicados porque não se tinha amostra suficiente. Os resultados são apresentados nas figuras 70 e 71.

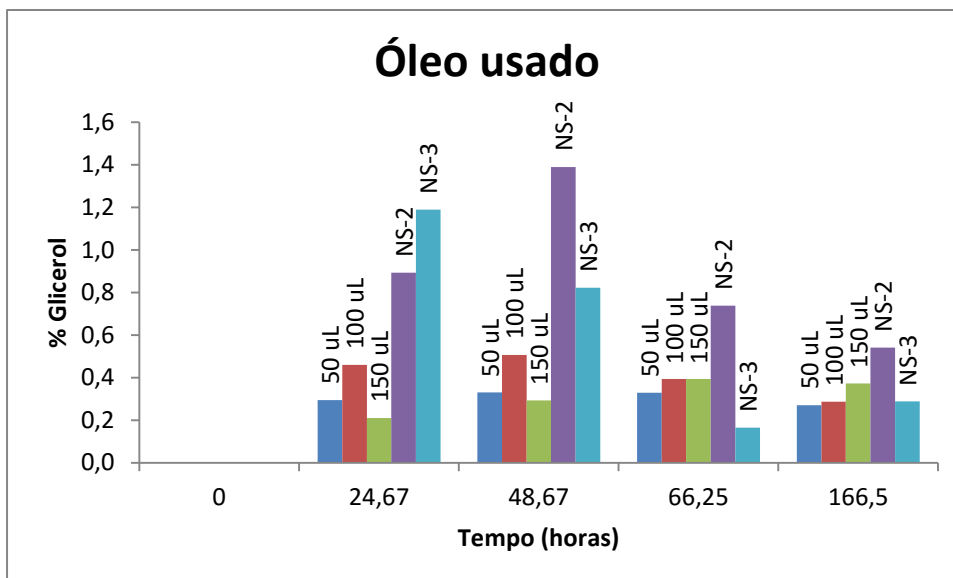


Figura 70 - Produção de glicerol a partir de óleo usado

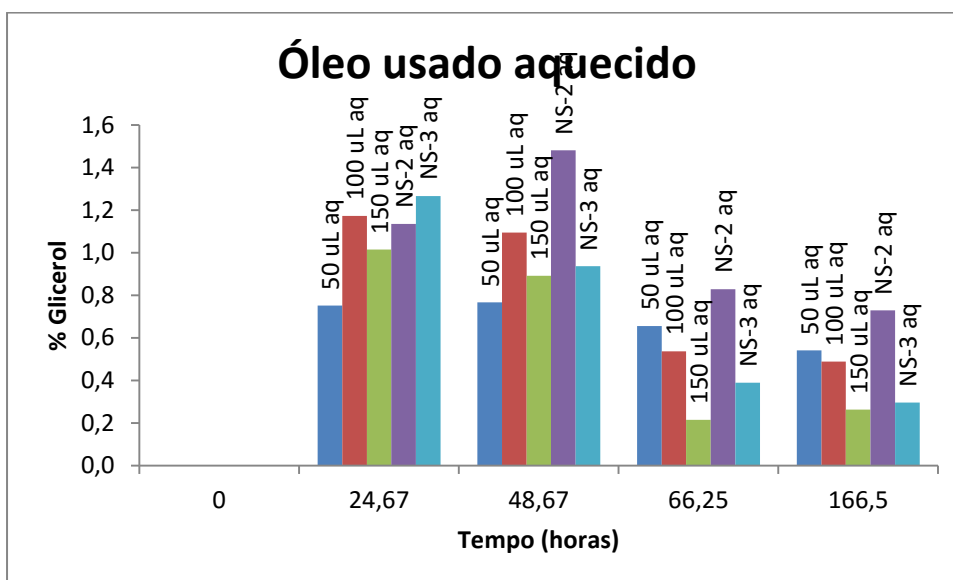


Figura 71 - Produção de glicerol a partir de óleo usado aquecido

Verifica-se que as células não podem ser reutilizadas para a produção de biodiesel pois são inactivadas depois de serem utilizadas, pois ao fim de 66.25 horas já se produziu uma menor quantidade de glicerol.

Com óleo usado e com 150 μ L de suspensão celular há um aumento de glicerol a fim de 66.25 horas, mas este aumento não é significativo.

Realizou-se uma TLC com as amostras de 100 μ L e 150 μ L de suspensão celular e óleo usado, 50 μ L e 100 μ L de suspensão celular e óleo usado aquecido, NS-88002 com óleo aquecido e controlo negativo, ao fim de 24.67 horas. A TLC é apresentada na figura 72.

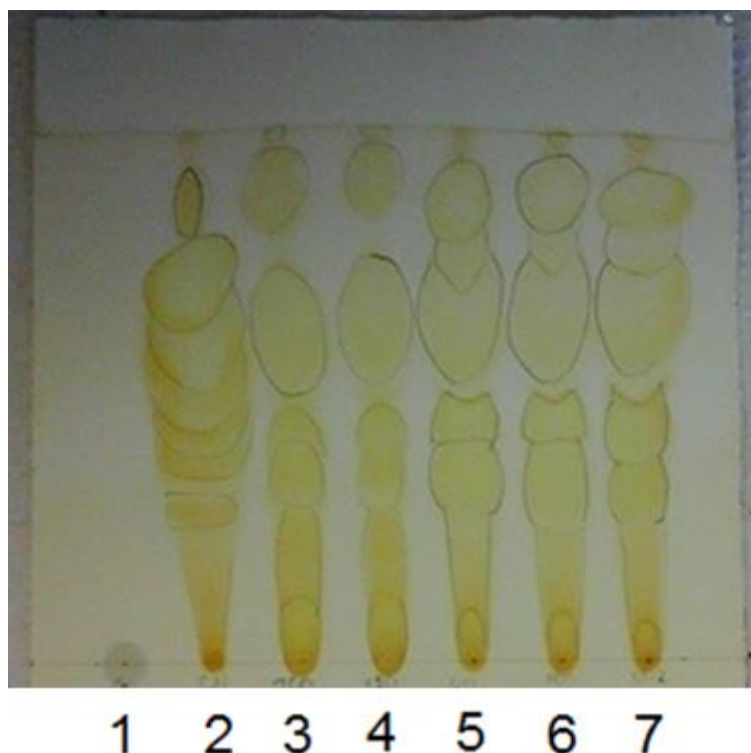


Figura 72 – TLC utilizando óleo usado com e sem aquecimento (1 – glicerol; 2 – controlo negativo; 3 e 4– 100 μL e 150 μL de células, respectivamente, com óleo usado; 5 e 6 – 50 μL e 100 μL de células com óleo usado aquecido; 7 – NS-88002 com óleo usado aquecido)

Calculou-se a % biodiesel das amostras do TLC através da área da elipse. Os resultados apresentam-se na tabela 28.

Tabela 28 - Quantidade de biodiesel nas amostras com óleo usado com e sem aquecimento

| | | Amostras | A elipse (cm^2) | % FAME |
|---------------------|-------|---------------|----------------------------|--------|
| | | Matéria prima | óleo usado | CN |
| 100 | 0,777 | | | 27,5 |
| 150 | 0,691 | | 22,9 | |
| óleo usado aquecido | 50 | | 0,863 | 32,1 |
| | 100 | | 0,785 | 27,9 |
| | NS-2 | | 0,816 | 29,6 |

Verifica-se que utilizando o óleo usado aquecido produz-se uma maior quantidade de biodiesel, pois ao aquecer o óleo evapora-se a água, ou uma parte dela, existente no óleo.

4. Conclusão

O objetivo deste trabalho centrou-se no estudo do meio de cultura que conduziu à produção de elevadas quantidades de lipase da estirpe mutante de *Pseudomonas aeruginosa* com uma elevada actividade enzimática e a sua purificação e caracterização utilizando-a para a produção enzimática de biodiesel a partir de resíduos agro-industriais.

O meio de cultura sólido que conduziu à produção de elevadas quantidades de lipase foi o meio em que se utilizou azeite como indutor, ou seja, o meio de cultura A. A lipase da estirpe bacteriana *Ph3B* de *P. aeruginosa* apresentou uma actividade enzimática de 0.085 UI/mL.

O melhor meio de cultura líquido para crescimento em grande escala da estirpe mutante *Ph3B* de *P. aeruginosa* foi o meio de cultura onde se utilizou Tween 20, ou seja, o meio de cultura B. A estirpe bacteriana *Ph3B* de *P. aeruginosa* apresentou uma actividade enzimática de 0.094 UI/mL.

Em relação às estirpes fúngicas, o melhor meio de cultura líquido foi o meio onde se utilizou azeite e a estirpe que produziu uma maior quantidade de lipase extracelular foi a estirpe *Ganoderma lucidum violeta*, apresentando uma actividade enzimática de 0.0165 UI/mL. O melhor meio de cultura líquido que produziu uma maior quantidade de lipase intracelular foi o meio com azeite e a estirpe que produziu uma maior quantidade de lipase foi a estirpe *Phlebia rufa*, apresentando uma actividade enzimática de 0.013 UI/mL.

Imobilizando a lipase de *P. aeruginosa Ph3B* (actividade enzimática de 0.102 UI/mL) em alginato de cálcio e realizando o seu doseamento com uma esfera, observou-se que existe uma elevada resistência à transferência de massa do substrato pelo suporte. Procedeu-se a um segundo doseamento e obteve-se uma actividade enzimática de 0.0085 UI/mL. Utilizando-se duas esferas, obteve-se uma actividade enzimática mais elevada de 0.0454 UI/mL. Utilizando-se três esferas, obteve-se uma actividade enzimática de 0.0346 UI/mL devido à concentração do substrato ser um factor limitante.

Imobilizou-se a lipase de *P. aeruginosa Ph3B* (actividade enzimática de 0.102 UI/mL) com glutaraldeído e realizou-se o seu doseamento em microplacas de 96 e de 24 poços. Em microplacas de 96 poços e utilizando 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µL de lipase com 2%, 4%, 6% de GA (v/v), obteve-se os seguintes resultados.

- Utilizando 20 µL de lipase imobilizada, a quantidade de GA a utilizar será 2%. A lipase apresentou uma actividade enzimática de 0.0103 UI/mL.
- A partir da utilização de 40 µL de lipase imobilizada para quantidades mais elevadas, a quantidade de GA a utilizar será 4%. A lipase apresentou uma actividade enzimática de 0.0152 UI/mL.
- Verificou-se que se não se utilizar GA, a lipase fica retida na microplaca apresentando actividade enzimática. Quanto mais quantidade de lipase se utilizar, maior será a actividade enzimática nos poços.
- Efectuou-se o estudo de reutilização da microplaca, onde se verificou que a lipase, ao longo do tempo, vai perdendo actividade não podendo se reutilizar a lipase imobilizada na microplaca.

Em microplacas de 24 poços e utilizando 50 µL, 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL e 500 µL de lipase com 2%, 4%, 6% e 8% de GA (v/v), verificou-se que, utilizando 200 µL de lipase imobilizada, a quantidade de GA a utilizar será 4%. A lipase apresentou uma actividade enzimática de 0.0382 UI/mL. Utilizando esta quantidade de lipase e maiores quantidades de GA (6% e 8%), há uma diminuição de actividade enzimática.

Procedeu-se à análise do comportamento cromatográfico das lipases através de IMAC em microplacas de 96 poços e em colunas de 5 mL com diferentes resinas. Através do comportamento cromatográfico da lipase da estirpe *Pseudomonas aeruginosa Ph3B* e *L10*, *Phlebia rufa* e *Ganoderma lucidum violeta* nos metais quelatos imobilizados, verificou-se que o cobre possui uma maior afinidade pelas lipases, retendo-as na fase de lavagem. O pH 7 não é o mais indicado para estas estirpes pois houve eluição da lipase na fase de lavagem.

A purificação das lipases das estirpes *Ph3B* e *A13* de *P. aeruginosa* com o metal Cu(II) foi realizada por diversas cromatografias em colunas com 5 mL de Sepharose 6B-EPI-IDA e Sepharose 6B-BDGE-IDA. A eluição das lipases da coluna foram realizada com tampão de eluição com 500 mM de imidazole, 250 mM de imidazole e com 10 mM de imidazole no tampão de equilíbrio. Verificou-se que a concentração de imidazole no tampão de eluição inactiva ligeiramente a actividade enzimática da lipase apresentando um rendimento superior a 100%.

Procedeu-se a uma análise electroforética SDS-PAGE e Page Nativa das lipases das estirpes *mutantes A13 e Ph3B*, obtendo-se a massa molar da lipase de *P. aeruginosa A13* de 42 kDa. Não foi possível observar qualquer banda no gel após a análise electroforética da lipase de *P. aeruginosa Ph3B*.

Como finalidade deste trabalho, procedeu-se à produção enzimática de biodiesel catalisada pela lipase de *P. aeruginosa Ph3B* realizando o doseamento do glicerol e do biodiesel.

Utilizando diferentes quantidades de suspensão celular de *Ph3B* de *P. aeruginosa* (50 µL, 100 µL, 200 µL e 300 µL), 150 µL e 250 µL de lipase livre e NS-88003, realizou-se o doseamento do glicerol. A actividade enzimática inicial da estirpe mutante *Ph3B* de *P. aeruginosa* era de 0.0943 UI/mL. Verificou-se que, utilizando 50 µL de suspensão celular obteve-se 2.4% de glicerol e que quanto mais elevada é a quantidade de células usadas, menor a concentração de glicerol que se obtêm. Utilizando a lipase livre não se obteve glicerol.

Utilizando diferentes quantidades de suspensão celular de *P. aeruginosa Ph3B* (10 µL, 20 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL, 100 µL e 150 µL) e de lipases comerciais imobilizadas NS-88002 e NS-88003, realizou-se o doseamento do glicerol e do biodiesel. Realizando o doseamento do glicerol, verificou-se que a partir de uma quantidade de 100 µL de suspensão celular já se produz uma quantidade significativa de glicerol, ao fim de 18 horas (1.2% glicerol). Realizando o doseamento do biodiesel, verificou-se que ao fim de 18 h, utilizando 150 µL de células tem-se uma maior % biodiesel (27.1%) que utilizando 80 µL de células ao fim de 22h, pois utilizou-se uma maior quantidade de células. A enzima comercial que é utilizada para a produção de

biodiesel (NS-88003) apresentou 11,2% de biodiesel enquanto que a NS-2 teve uma produção de biodiesel de 21.1 %.

Utilizando diferentes volumes de lipase da estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* imobilizada em 6 poços, 100 µL e 150 µL de suspensão celular de *P. aeruginosa Ph3B* e lipases comerciais NS-88002 e NS-88003, verificou-se que ao dosear o glicerol, ao contrário das células e das enzimas comerciais, utilizando a lipase imobilizada não se produz glicerol. Reativamente ao doseamento do biodiesel, verificou-se que só com 100 µL e 150 µL de suspensão celular e NS-3 é que produz biodiesel.

No doseamento de glicerol e utilizando diferentes volumes de suspensão celular da estirpe *Ph3B* de *P. aeruginosa* (50 µL, 100 µL e 150 µL) e lipases comerciais NS-88002 e NS-88003 e utilizando óleo usado com e sem aquecimento, verificou-se que usando óleo usado aquecido as células apresentam uma maior produção de glicerol. Ao fim de 24.67 h e com 100 µL de células produziu-se 1.2% de glicerol. Verifica-se que utilizando o óleo usado aquecido produz-se uma maior quantidade de biodiesel, pois ao aquecer o óleo evapora-se a água, ou uma parte dela, existente no óleo.

As conversões de FAME obtidas nestes ensaios foram muito baixas. Para o biodiesel ser utilizado nos motores de combustão comercialmente, o teor mínimo de % FAME é de 96.5%.

5. Perspectivas futuras

Actualmente, a produção de biodiesel tem sido um tema muito importante. O biodiesel procede à substituição dos combustíveis fósseis havendo uma diminuição no impacto ambiental e de ser uma fonte de energia renovável.

O uso de oleoginosas vegetais como matéria prima para a produção de biodiesel, provenientes da agricultura, é um problema que tem que ser modificado pois existe uma concorrência na utilização destas mesmas matérias primas quer para a produção de biodiesel, quer para a indústria alimentar. Deste modo, vários processos de produção de biodiesel têm vindo a ser desenvolvidos com a utilização de matérias primas não alimentares.

O processo de transesterificação é um processo muito utilizado para a produção de biodiesel a grande escala. Este processo com catálise alcalina homogénea já está implementado em escala industrial conseguindo-se obter conversões de biodiesel elevadas (maiores que 99%). No entanto, este processo apresenta alguns inconvenientes, tais como, a dificuldade de reutilizar o catalisador e a necessidade de purificar o glicerol no final da reacção. Para se ultrapassar estes inconvenientes, desenvolveu-se um processo de transesterificação enzimático no qual se utiliza enzimas imobilizadas como catalisadores.

O processo de transesterificação enzimático é um processo muito mais simples e, no qual se, consegue reutilizar e/ou recuperar o catalisador no final do processo. Para este processo ser utilizado numa escala industrial necessita de ser desenvolvido devido ao elevado custo do catalisador. O custo do catalisador pode ser optimizado imobilizando a enzima num suporte e reutilizando-a no processo.

Outra forma de optimizar este processo seria utilizar um outro aceitador de grupos acilo em vez do metanol, apesar de o metanol ser um aceitador de acilo mais barato e mais acessível. O metanol não dissolvido, que se encontra no meio, inactiva a enzima imobilizada juntamente com o glicerol produzido. Outra opção de optimização do processo de transesterificação enzimático é a utilização de solventes como o *t*-butanol que elimina o efeito de inibição por parte do metanol. Ao adicionar o metanol em pequenas quantidades

gradualmente, à mistura reaccional, obtém-se elevadas conversões de biodiesel uma vez que o meio apresenta concentrações de metanol reduzidas eliminando a desactivação do catalisador por parte do metanol.

A remoção do glicerol também é um factor a otimizar levando à redução da inibição na actividade enzimática do catalisador.

Ao combinar a utilização de catalisadores de células intactas com a adição de pequenas quantidades, gradualmente, de metanol atinge-se um conversão de biodiesel mais elevada e uma redução de custos maior.

O processo de transesterificação enzimático ainda é um processo que deve ser optimizado antes de ser utilizado em escala industrial., (Ranganathan, S. e Narasimhan, S. 2008)

6. Referências bibliográficas

Aarthy, M., Saravanan, P., Gowthaman, M., Rose, C., Kamini, N., *Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview*, Chemical Engineering Research and Design (2014), 92, 1591-1601.

Abd-Elhakeem, M., Elsayed, A., Alkhulaqi, T., *New Colorimetric Method for Lipases Activity Assay in Microbial Media*, American Journal of Analytical Chemistry (2013), 4, 442-444.

Agência Portuguesa do Ambiente, *Relatório do Estado do Ambiente*, REA 2014 Portugal, 2014.

Aguieiras, E., Cavalcanti-Oliveira, E., Freire, D., *Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases*, Fuel 159 (2015), 52-67.

Armisen, P., Mateo, C., Cortés, E., Barredo, J. L., Salto, F., Diez, B., Rodés, L., García, J. L., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M., *Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailormade metal chelate supports*, Journal of Chromatography A (1999), 848, 61-70.

Bansal, K., McCrady, J., Hansen, A., Bhalerao, K., *Thin layer chromatography and image analysis to detect glycerol in biodiesel*, Fuel 87 (2008), 3369-3372.

Bondioli, P., *From Oilseeds to Industrial Products: Present and Near Future of Oleochemistry*, Italian Journal of Agronomy (2003), 7, 129-135.

Bradford, M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Analytical biochemistry 72 (1976), 248-254.

Carareto, N., Kimura, C., Oliveira, E., Costa, M., Meirelles, A., *Flash points of mixtures containing ethyl esters or ethylic biodiesel and ethanol*, Fuel 96 (2012), 319–326.

Charneca, A., Karmali, A., Vieira, M., *Non-enzymatic assay for glucose by using immobilized whole-cells of E.coli containing glucose binding protein fused to fluorescent proteins*, Sensors and Actuators B: Chemical (2015), 221, 236-241.

Chartrain, M., Katz, L., Marcin, C., Thien, M., Smith, S., Fisher, F., Goklen, K., Salmon, P., Brix, T., Price, K., Greasham, R., *Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from Pseudomonas aeruginosa MB 5001*, Enzyme and Microbial Technology (1993), 15, 575–580.

Christopher, L., Kumar, H., Zambare, V., P. *Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities*, Applied Energy volume 119 (2014): 497-520. (* - Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U., *Production, purification, characterization and applications of lipases*, Biotechnology Advances 19 (2001), 627–662.)

Comissão Europeia, *Europa 2020 - Estratégia para um crescimento inteligente, sustentável e inclusivo*, Comunicado da Comunicação (2010), 39-14.

Crimson, Renewable Energy, LP. *Biodiesel Fuel Specifications and Comparison to Diesel Fuel*, U.S. Department of Energy (2006), 2^o edição.

Delatorre, A., Rodrigues, P., Aguiar, C., Andrade, V., Arêdes, A., Perez, V., *Produção de Biodiesel: Considerações sobre as diferentes matérias-primas e rotas tecnológicas de processos*, Ciências Biológicas e da Saúde (2011), 1, 1-27

Demirbas, A. *Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods*. Progress in Energy and Combustion Science (2005), 31, 466–487.

DGEG, Relatório da Direção Geral de Energia e Geologia, 2014

European Biofuels Technology Platform, *Fatty Acid Methyl Esters (FAME)*, Biofuel fact sheet, 2011.

Feitosa, I., Barbosa, J., Orellana, S., Lima, A., Soares, C., *Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo*, Acta Scientiarum Technology (2010), 21, 27-31.

Ferrarezi, A., Ohe, T., Borges, J., Brito, R., Siqueira, M., Vendramini, P., Quilles, J., Bonilla-Rodriguez, G., Boscolo, M., Da-Silva, R., Gomes, E., *Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic Thermomucor indicae seudaticae N31 for transesterification reaction*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (2014), 107, 106-113.

Freixo, M., Karmali, A., Arteiro, J., *Production of polygalacturonase from Coriolus versicolor grown on tomato pomace and its chromatographic behavior on immobilized metal chelates*, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (2008), 35, 475-484.

Ghaly, A., Dave, D., Brooks, M., Budge, S., *Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review*, American Journal of Biochemistry and Biotechnology (2010), 6, 54-76.

Ghosh, P., Saxena, R., Gupta, R., Yadav, R., Davidson, S., *Microbial lipases: production and applications*, Science Progress (1996), 79, 119-157

Gomes, J., Puna, J., Bordado, J., Correia, M., *New heterogeneous catalysts for trans-esterification of triglycerides*, International Journal of Environmental Studies (2012), 1-19.

Guldhe, A., Singh, B., Mutanda, T., Permaul, K., Bux, F., *Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches*, Renewable and Sustainable Energy Reviews (2015), 41, 1447–1464.

Gupta, V., Tuohy, M., Kubicek, C., Saddler, J., Xu, F., *Bioenergy Research: Advances and applications*, 2014, Elsevier, 1º edição.

Hasan, F., Shah, A., Hammed, A., *Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review*, *Biotechnology Advances* (2009), 27, 782–798.

Ji, Q., Xiao, S., He, B., Liu, X., *Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from Pseudomonas aeruginosa LX1 and its application for biodiesel production*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2010), 66, 264-269.

Jin, G. e Bierma, T., *Whole-cell Biocatalysts for Producing Biodiesel from Waste Greases*, Illinois Sustainable Technology Center (ISTC) Reports (2010), 1-52.

Karmali, A., *Cromatografia de afinidade com metal imobilizado e suas variantes*, *Boletim de Biotecnologia* (2000), 67, 1-5.

Kiss, A., Omota, F., Dimian, A., Rothenberg, G., *The heterogeneous advantage: biodiesel by catalytic reactive distillation*, *Topics in Catalysis*, 40, 141-149, 2006

Knezevic, Z., Siler-Marinkovic, S., Mojovic, L., *Immobilized Lipases as practical catalysts*, *Acta Periodica Technologica* (2004), 35, 1-280.

Kuhn, J., Muller, H., Salzig, D., Czermak, P., *A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation*, *Electronic Journal of Biotechnology* (2015), 18, 252-255.

Lopes, D., Fraga, L., Fleuri, L., Macedo, G., *Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately?*, *Ciência e Tecnologia de Alimentos* (2011), 31, 608-613.

Meneghetti, S., Meneghetti, M., Brito, Y., *A reacção de transesterificação, algumas aplicações e obtenção de biodiesel*, Revista Virtual de Química (2013), 5, 63-73.

Moradi, G., Dehghani, S., Ghanei, R., *Measurements of physical properties during transesterification of soybean oil to biodiesel for prediction of reaction progress*, Energy Conversion and Management (2012), 61, 67–70.

Mota, C., Silva, C., Gonçalves, V., *Gliceroquímica: Novos Produtos e Processos a partir da glicerina de produção de biodiesel*, Química Nova (2009), 32, 639-648.

P. L. Ivon e L. C. F. Sérgio, *Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos*, Química Nova (2009) vol. 32, nº6, 1596-1608

Pashova, S., Slokoska, L., Krumova, E., Angelova, M., *Induction of polymethylgalacturonase biosynthesis by immobilized cells of Aspegillus niger 26*, Enzyme and Microbial Technology (1999), 24, 535-540.

Pick n Post, *Protocol for Silver Staining of gels*, Protein Analysis (www.pick-n-post.com)

Puna, J.F., Gomes, J.F., Correia, M.J., Dias, A.P., Bordado, J.C., *Advances on the development of novel heterogeneous catalysts for transesterification of triglycerides in biodiesel*, Fuel 89 (2010), 3602-3606.

Puna, J.F., Gomes, J.F., Bordado, J.C., Correia, M.J., Dias, A.P., *Screening heterogeneous catalysts for transesterification of triglycerides to biodiesel*, International Journal of Energy for a Clean Environment(2011), 12, 45–54.

Quintas, A., Halpern, M., Freire, A., *Bioquímica - Organização molecular da vida*, 2008, Lidel, Lisboa.

Ranganathan, S., Narasimhan, S., *An overview of enzymatic production of biodiesel* (2008), Bioresource Technology, 99, 3975–3981.

República Portuguesa, *Plano Nacional de acção para as Energias Renováveis ao abrigo da directiva 2009/28/CE*.

Rosa, M. e Oliveira, A., *Carbonates utilization as heterogeneous catalysts of transesterification*, Proceedings of 29th Annual Reunion of Chemical Brazilian Society, Brazil (2006)

Salis, A., Monduzzi, M., Solinas, V., *Use of lipases for the production of biodiesel*, Industrial Enzymes (2007), 317-339.

Salvador, A. A., Ribas, C., Maso, L., Palharez, S., *Biodiesel: Aspectos gerais e produção enzimática*, Centro Tecnológico, Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química (2009), 1-27.

Saxena, R., Sheoran, A., Giri, B., Davidson, W., *Purification strategies for microbial lipases*, Journal of Microbiological Methods (2003), 52, 1 – 18.

Semedo, M., Karmali, A., Fonseca, L., *A high throughput colorimetric assay of β -1,3-D-glucans by Congo red dye*, Journal of Microbiological Methods (2015), 109, 140-148.

Sendzikiene, E., Kazancev, K., Kazanceva, I., *Application of used for frying oil for biodiesel fuel production*, Journal of Internacional Scientific Publications: Ecology and Safety (2014), 8, 62-70.

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U., *Production, purification, characterization and applications of lipases*, Biotechnology Advances (2001), 19, 627–662.

Sharma, S. e Kanwar, S., *Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications*, The Scientific World Journal (2014), 2014, 1-15.

Torres, M., Foresti, M., Ferreira, M., *Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of selected lipases: a procedure for the proper calculation of their recovered activity*, AMB Express (2013), 3, 25.

Umpierre, A. e Machado, F., *Gliceroquímica e Valorização do Glicerol*, Revista Virtual de Química (2013), 5, 106-116.

Uscátegui, Y., Jiménez-Junca, C., Suárez, C., Prieto.Correa, E., *Evaluation of the induction of lipolytic enzymes from a Pseudomona aeruginosa isolated from african palm fruit (Elaeis guineensis)*, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica (2012), 19, 3, 280-286.

Vasudevan, P. e Briggs, M., *Biodiesel production—current state of the art and challenges*, Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology (2008), 35, 421–430.

Yaakob, Z., Mohammad, M., Alherbawi, M., Alam, Z., Sopian, K., *Overview of the production of biodiesel from waste cooking oil*, Renewable and sustainable energy reviews (2013), 18, 184-193.

Yahaya, M., Demshemino, I., Nwadike, I., Sylvester, O., Okoro, L., *A review on the Chromatographic analysis of biodiesel*, International Journal of Education and Research (2013), 1, 1-12.

Zivkovic, L., Zivkovic, L., Babic, B., Kokunesoski, M., Jovic, B., Karadzic, I., *Immobilization of Candida rugosa lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia*, Biochemical Engineering Journal (2015), 93, 73–83.