



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA
LUSOFONIA AFRO-BRASILEIRA
INSTITUTO DE ENGENHARIAS E DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL**

JOSÉ ERICK DA SILVA SOUZA

**SONO-HIDRÓLISE USANDO UM COQUETEL ENZIMÁTICO NA
PREPARAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES**

**Acarape
2020**

JOSÉ ERICK DA SILVA SOUZA

**SONO-HIDRÓLISE USANDO UM COQUETEL ENZIMÁTICO NA
PREPARAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Energias, da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – (UNILAB), como requisito para obtenção do título de Engenheiro de Energias.

Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos
Coorientadora: Prof^a. Dra. Maria Cristiane Martins de Souza

Acarape

2020

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Souza, José Erick da Silva.

S729s

Sono-hidrólise usando um coquetel enzimático na preparação de ácidos graxos livres / José Erick da Silva Souza. - Redenção, 2020. 38f: il.

Monografia - Curso de Engenharia de Energias, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2020.

Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.
Coorientador: Prof^a. Dra. Maria Cristiane Martins de Souza.

1. Enzimas. 2. Ácidos graxos. 3. Hidrólise. 4. Óleo de coco.
I. Título

CE/UF/BSCA

CDD 543.85

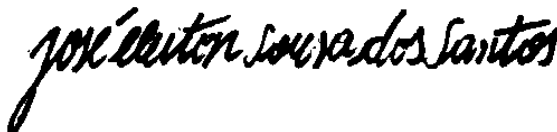
JOSÉ ERICK DA SILVA SOUZA

**SONO-HIDRÓLISE USANDO UM COQUETEL ENZIMÁTICO NA
PREPARAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Energias, da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – (UNILAB), como requisito para obtenção do título de Engenheiro de Energias.

Aprovado em: 30 de outubro de 2020.

Banca Examinadora



Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos – IEDS

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira



Prof^ª. Dra. Maria Cristiane Martins de Sousa – IEDS

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

Ana Kátia de Sousa Braz

Me. Ana Kátia de Sousa Braz – IEDS

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força de vontade e saúde concedidas durante minha vida acadêmica.

À minha mãe, Ediran pelo companheirismo, incentivo, exemplo e amor incondicional.

Ao Júnior Mesquita, meu namorado, por seu amor, companheirismo, carinho, incentivos e paciência que tanto me ajudou.

À UNILAB e aos professores pelos conhecimentos passados, dúvidas sanadas.

Ao meu orientador, professor Dr. José Cleiton Sousa dos Santos, pela oportunidade de ser seu orientando e bolsista neste trabalho, pelo seu empenho em tirar todas as minhas dúvidas, pela excelente orientação e por ser meu exemplo de pesquisadora. À minha coorientador, professora Dr^a. Maria Cristiane Martins de Sousa, pelo suporte e empenho dedicados, pela oportunidade de ser seu orientando, pela excelente orientação e por ser também meu exemplo de pesquisador.

Ao grupo GENEZ – Grupo em Engenharia Enzimática, pelas amizades construídas, ajuda e companheirismo a mim prestado durante todo o andamento das pesquisas.

À FUNCAP – Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, por financiar o desenvolvimento desta pesquisa.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente na minha vida acadêmica, muito obrigado.

"É ótimo celebrar o sucesso, mas mais importante ainda é assimilar as lições trazidas pelos erros que cometemos". - Bill Gates

RESUMO

Neste trabalho, o conceito de coquetel de lipase foi proposto para a reação de hidrólise assistida por ultrassom do óleo de coco. Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) e lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) foram avaliadas como biocatalisadores em diferentes combinações. A melhor conversão (33,66%) foi alcançada utilizando apenas RML, no entanto, o melhor coquetel enzimático (75% RML e 25% CALB) proposto pela superfície de resposta triangular foi utilizado para obter conversões maiores. No melhor coquetel de lipases, os parâmetros reacionais (temperatura, conteúdo de biocatalisador e razão molar (água / óleo)) foram otimizados pelo Central Composite Design (CCD), permitindo obter mais de 98% de conversão na hidrólise do óleo de coco em três horas de incubação a 37kHz, 300W e 45 ° C usando 20% de coquetel de lipase (m / m) e uma razão molar de 7,5: 1 (água / óleo). O coquetel de lipase reteve cerca de 50% de sua atividade inicial após 3 ciclos consecutivos de hidrólise. Até onde se sabe, esta comunicação é o primeiro relatório da literatura científica para a hidrólise do óleo de coco assistida por ultrassom, catalisada por um coquetel de lipases. Sob irradiação por ultrassom, o conceito de coquetel de lipase foi aplicado com sucesso, e essa estratégia pode ser útil para outros tipos de reações utilizando substratos heterogêneos.

Palavras-chave: Coquetel de lipase; Irradiação ultrassônica; Hidrólise; Óleo de coco.

ABSTRACT

In this work, the concept of lipase cocktail has been proposed in the ultrasound-assisted hydrolysis of coconut oil. Lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLL), lipase from *Rhizomucor miehei* (RML) and lipase B from *Candida antarctica* (CALB) were evaluated as biocatalysts in different combinations. The best conversion (33.66%) was achieved using only RML, however, the best lipase cocktail (75% RML and 25% CALB) proposed by the triangular response surface was used to achieve higher conversions. At the best lipase cocktail, reaction parameters (temperature, biocatalyst content and molar ratio (water/oil)) were optimized by a Central Composite Design (CCD), allowing to obtain more than 98% of conversion in the hydrolysis of coconut oil in three hours of incubation at 37kHz, 300W and 45 °C by using 20% of the lipase cocktail (w/w) and a molar ratio of 7.5:1 (water/oil). The lipase cocktail retained about 50% of its initial activity after 3 consecutive cycles of hydrolysis. To the authors' knowledge, up to date, this communication is the first report in the literature for the ultrasound-assisted hydrolysis of coconut oil catalyzed by a cocktail of lipases. Under ultrasound irradiation, the concept of lipase cocktail was successfully applied, and this strategy could be useful for other types of reactions using heterogeneous substrates.

Key-words: Lipase cocktail; Ultrasound irradiation; Hydrolysis; Coconut oil.

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação de estruturas 3D de lipases: (A) lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) (código PDB: 1TCA) com resíduos do sítio ativo SER105 (vermelho), ASP187 (verde), HIS224 (azul); (B) lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) (PDB: 4TGL), com resíduos do sítio ativo SER144 (vermelho), ASP203 (verde), HIS258 (azul); (C) lipase da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (PDB: 1DT3), com resíduos de sítio ativo SER146 (vermelho), ASP201 (verde), HIS258 (azul). Todas as estruturas 3D foram obtidas do Protein Data Bank (PDB) usando pymol vs educacional. 08
- Figura 2 - Superfície de resposta triangular para desenho experimental, indicando o melhor coquetel de lipase. Meio de reação: razão molar 2: 1 (água / óleo), teor de biocatalisador de 10% da massa de óleo de coco. As reações foram conduzidas em banho de ultrassom (37kHz e 300W) por 1 hora e 30 ° C. 15
- Figura 3 - Gráficos de contorno para o delineamento experimental de hidrólise de óleo de coco. (A) temperatura versus conteúdo de biocatalisador; (B) razão molar (água / óleo) versus conteúdo do biocatalisador; (C) Temperatura versus razão molar (água / óleo). Meio de reação: razão molar 5: 1-10: 1 (água / óleo) e teor de biocatalisador de 10-20% da massa de óleo de coco. As reações foram conduzidas em um banho de ultrassom (37kHz e 300W) por 3 horas e 35-55 ° C (consulte a Tabela 4). Em cada figura, a variável que não é representada foi fixada em seu valor central. 18
- Figura 4 - Conversões versus tempo em diferentes reatores (irradiação ultrassônica e agitação mecânica) na hidrólise do óleo de coco catalisada pelo coquetel de lipase (75% RML e 25% CALB). Meio de reação: razão molar 10: 1 (água / óleo) e teor de biocatalisador de 20% da massa de óleo de coco. As reações foram conduzidas em banho de ultrassom (37kHz e 300W) por 3 horas a 50 ° C. 20

Figura 5 - Estabilidade operacional do coquetel de lipase (75% RML e 25% CALB) 22
na hidrólise consecutiva do óleo de coco. Meio de reação: razão molar 10:
1 (água / óleo) e teor de biocatalisador de 20% da massa de óleo de coco.
As reações foram conduzidas em banho de ultrassom (37kHz e 300W)
por 3 horas a 50 ° C.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 -	Variáveis e seus níveis para o Central Composite Design para otimização da hidrólise do óleo de coco.	11
Tabela 2 -	Atividade hidrolítica das lipases em estudo.	13
Tabela 3 -	Projeto experimental para a determinação do melhor coquetel de lipase. Detalhes adicionais são fornecidos na seção Materiais e Metodologia.	14
Tabela 4 -	Projeto experimental para otimização da hidrólise do óleo de coco, utilizando o melhor coquetel de lipase (75% RML e 25% CALB). Detalhes adicionais são fornecidos na seção Materiais e Metodologia.	16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CALB	Lipase de <i>Candida antártica</i> do tipo B
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
RML	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
CCD	Central Composite Design
AGLs	Ácidos Graxos Livres
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	07
2	MATERIAIS E MÉTODOS	09
2.1	Materiais	09
2.2	Equipamento de Ultrassom	10
2.3	Metodologia	10
2.3.1	Atividade enzimática	10
2.3.2	Coquetel de Lipase	11
2.3.3	Hidrólise do óleo de coco	11
2.3.4	Central Composite Design (CCD)	11
2.3.5	Análise estatística	12
2.3.6	Estabilidade operacional	12
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
3.1	Atividade enzimática	13
3.2	Otimização da hidrólise do óleo de coco	13
3.2.1	Coquetel de Lipase	13
3.2.2	Parâmetros reacionais	15
3.3	Efeito dos parâmetros reacionais na hidrólise do óleo de coco	18
3.3.1	Temperatura	18
3.3.2	Razão molar	19
3.3.3	Conteúdo do biocatalizador	19
3.3.4	Comportamento catalítico físico do ultrassom	20
3.3.5	Estabilidade operacional	22
4	CONCLUSÃO	24
	REFERÊNCIAS	25
	APÊNDICE A – Artigo publicado.	26

1 INTRODUÇÃO

Embora os catalisadores químicos sejam amplamente utilizados em processos industriais, o uso de enzimas como biocatalisadores oferece vantagens, como alta seletividade e especificidade em condições de reação moderada (FONSECA *et al.*, 2020; PINHEIRO, B. B. *et al.*, 2019; PINHEIRO, M. P. *et al.*, 2019; SOUZA, De *et al.*, 2016; WOHLGEMUTH, 2010). As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, EC 3.1.1.3 - IUPAC) vêm ganhando crescente atenção em todo o mundo devido à sua gama de aplicações científicas e industriais (LUZIA *et al.*, 2019; MONTEIRO *et al.*, 2019, 2020; OLIVEIRA, de *et al.*, 2019; RIOS *et al.*, 2018, 2019; ROSENTHAL e LÜTZ, 2018; SANTOS, dos *et al.*, 2015; YADAV e BORKAR, 2009). A função fisiológica das lipases é hidrolisar os óleos e, portanto, as lipases têm sido usadas em reações de decomposição, na presença de quantidade suficiente de água, formando monoglicerídeos, diglicerídeos, ácidos graxos livres (AGLs) e glicerol (AL-ZUHAIR, HASAN e RAMACHANDRAN, 2003; BONAZZA *et al.*, 2018; CHOI, HAN e KIM, 2015; HASAN, SHAH e HAMEED, 2009; LIMA *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2017; OLIVEIRA, de *et al.*, 2018; SANTOS, dos *et al.*, 2017; VERDASCO-MARTÍN *et al.*, 2016).

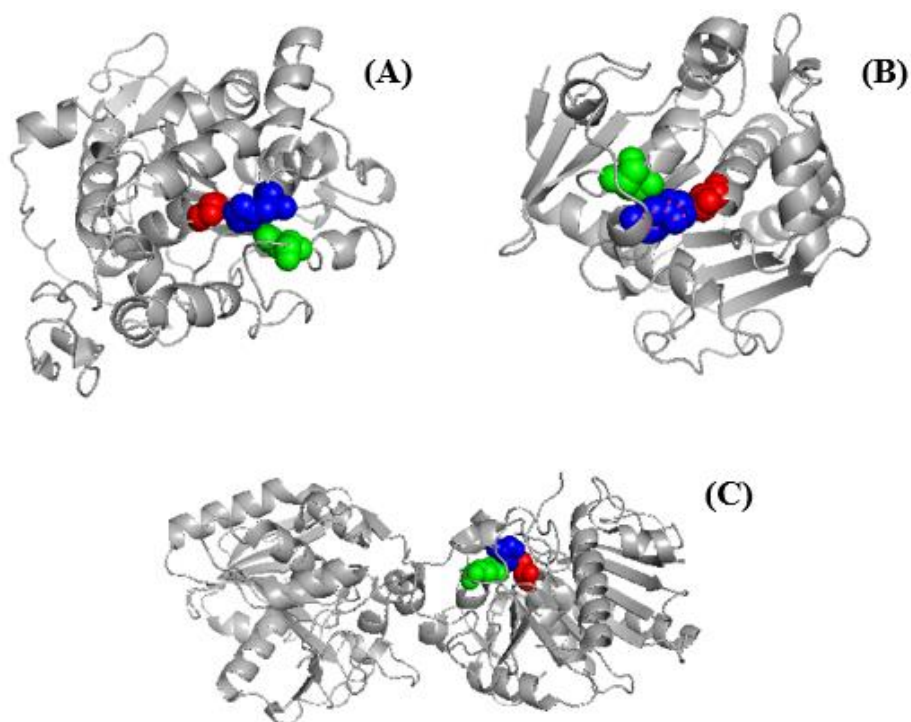
Os ácidos graxos livres (AGLs), que podem ser produzidos, por exemplo, pela hidrólise enzimática de óleos, são usados como matéria-prima em uma ampla gama de aplicações em processos industriais, como na produção de óleos químicos, álcoois, aminas e ésteres (AL-ZUHAIR, HASAN e RAMACHANDRAN, 2003). Entretanto, o principal ácido graxo presente nos óleos representa 70% ou menos da composição dos ácidos graxos, portanto, a hidrólise de óleos catalisados por lipases específicas pode resultar em baixas conversões devido à heterogeneidade dos substratos e à especificidade das lipases (ALVES *et al.*, 2014).

Os óleos e gorduras naturais contêm misturas de triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e AGLs em sua composição e pode ser necessária uma combinação de lipases com diferentes especificidades para a hidrólise completa desses substratos heterogêneos (RODRIGUES e AYUB, 2011). O óleo de coco virgem extra (*Cocos nucifera L.*) tem como principal ácido graxo láurico ácido (49%), que pode ser usado como conservante natural de alimentos devido à sua capacidade de se converter em monolaurina e destruir a membrana lipídica de bactérias (STILLWELL, 2016).

Lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) é uma lipase versátil produzida em organismos geneticamente modificados (ANDERSON, LARSSON e KIRK, 1998). Existe

uma preparação comercial de CALB imobilizada, denominada Novozym® 435 (ORTIZ *et al.*, 2019), e é a lipase mais usada em biotransformação (ANDERSON, LARSSON e KIRK, 1998; PINHEIRO, B. B. *et al.*, 2019; SANTOS, dos *et al.*, 2017; VERDASCO-MARTÍN *et al.*, 2016). Uma vez que a CALB possui uma tampa muito pequena, tornando-a incapaz de isolar completamente o local ativo do meio de reação, ela apresenta um alto grau de estereoespecificidade (ver Fig. 1a) (UPPENBERG *et al.*, 1995). A lipase de *Rhizomucor miehei* (RML), disponível comercialmente como Lipozyme® RM – IM, possui grande aplicabilidade na esterificação de óleos e gorduras (ver Fig. 1b) (FORESTI *et al.* 2005). Da mesma forma, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (ver Fig. 1c) está disponível comercialmente em sua forma imobilizada como Lipozyme® TL – IM (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Figura 1: Representação de estruturas 3D de lipases: (A) lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) (código PDB: 1TCA) com resíduos do sítio ativo SER105 (vermelho), ASP187 (verde), HIS224 (azul); (B) lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) (PDB: 4TGL), com resíduos do sítio ativo SER144 (vermelho), ASP203 (verde), HIS258 (azul); (C) lipase da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (PDB: 1DT3), com resíduos de sítio ativo SER146 (vermelho), ASP201 (verde), HIS258 (azul). Todas as estruturas 3D foram obtidas do Protein Data Bank (PDB) usando pymol vs educacional.



Fonte: Autor.

A tecnologia de ultrassom tem sido utilizada em reações, como as catalisadas pelas lipases, uma vez que é uma tecnologia verde de alta eficiência, possui desempenho econômico

viável e baixa necessidade instrumental (SÁ *et al.*, 2017). Em frequências apropriadas, a tecnologia de ultrassom facilita a transferência de massa e cria radicais livres super ativos (SANCHETI e GOGATE, 2017). Além disso, nos processos assistidos por ultrassom, o fenômeno gerado pela rarefação e compressão das ondas sonoras, conhecido como cavitação, permite a formação e expansão de bolhas de água, gerando efeitos supercríticos localizados de temperatura e pressão (HO, NG e GAN, 2016; SÁ *et al.*, 2017).

A busca pela otimização de processos químicos e / ou bioquímicos vai além da escolha de um catalisador e / ou biocatalisador específico. Os pesquisadores estão cada vez mais interessados em simulações computacionais para reduzir o tempo e os custos para a otimização de experimentos (GARUD, KARIMI e KRAFT, 2017). O Design de Experimentos (DoE) permite a otimização dos principais parâmetros reacionais pelos modelos estatísticos mais adequados para cada tipo de experimento (HIBBERT, 2012). Entre os DoEs mais utilizados, o Central Composite Design (CCD) é o modelo relevante e mais adequado para os fins desta pesquisa, pois é utilizado para estudar os principais efeitos dos parâmetros reacionais nos experimentos e possíveis interações entre eles para encontrar as condições ideais de reação (DJOUDI, AISSANI-BENISSAD e BOUROUINA-BACHA, 2007).

Neste trabalho, as combinações de três lipases imobilizadas comerciais, Novozym®, Lipozyme® TL-IM e Lipozyme® RL-IM foram avaliadas usando um projeto de mistura de três fatores e análise de superfície triangular, a fim de determinar o melhor coquetel de lipase para a produção de AGLs do óleo de coco sob irradiação por ultrassom. Uma vez determinado o melhor coquetel de lipase, os parâmetros de hidrólise (conteúdo enzimático, razão molar e temperatura) foram otimizados pelo CCD. Até onde sabemos, até o presente momento, esta comunicação é o primeiro relatório da literatura para a hidrólise do óleo de coco assistida por ultrassom, catalisada por um coquetel de lipases.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados pelo menos em duplicata e os resultados são apresentados como a média desses valores e com um desvio padrão (geralmente abaixo de 5%).

2.1 Materiais

Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL imobilizado em suporte de silicato, Lipozyme® TL – IM), lipase de *Rhizomucor miehei* (RML imobilizada em resina de troca aniônica, Lipozyme® RM – IM) e lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB imobilizada em resina macroporosa, Novozym® 435) foram gentilmente doados pela Novozymes (Madri, Espanha). O substrato heterogêneo utilizado foi o óleo de coco refinado comercial, com acidez máxima de 0,3%, e foi adquirido no mercado local e é composto por ácido caprótico (0,38%), ácido caprílico (5,56%), ácido capríco (4,99%), ácido láurico (45,78%), ácido mirístico (18,56%), ácido palmítico (8,85%), ácido esteárico (3,39%), ácido oleico (5,65%) e ácido linoléico (0,94%), conforme relatado pelo fabricante. Ácido oleico, etanol anidro 99,9% e hexano foram adquiridos da Vetec (São Paulo, Brasil). Todos os outros produtos químicos eram de grau analítico e foram utilizados sem qualquer purificação adicional.

2.2 Equipamento de ultrassom

O equipamento utilizado em todos os experimentos foi um banho ultrassônico (Unique Inc., modelo USC 2800A, Brasil). O equipamento apresenta o volume de capacidade de 9,5 L com as seguintes dimensões: 300 × 240 × 150 mm (comprimento × largura × altura). Dois transdutores de disco foram colocados no fundo do reator. A frequência ultrassônica é de 37 kHz e a potência ultrassônica total de 300 W. Além disso, o equipamento possui controle de temperatura.

2.3 Metodologia

2.3.1 Atividade enzimática

A atividade das lipases (TLL, RML e CALB) foi quantificada pela hidrólise do azeite de oliva, conforme proposto por Soares et al. (1999). O substrato (emulsão de goma arábica e óleo) foi composto por uma mistura de 50 g de azeite e 150 g de solução de goma arábica (7%, m / v em água). O meio de reação, composto por 5 mL da emulsão, 5 mL de tampão fosfato 0,1 mol / L (pH 7,0) e o biocatalisador, foi incubado sob agitação mecânica por 5 minutos a 37 ° C e 200 r / min. Os produtos da reação foram titulados com solução de KOH 0,025 mol / L, usando 3 gotas de fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade

enzimática foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de ácido graxo por minuto em condições de teste (SOARES *et al.*, 1999).

2.3.2 Coquetel de Lipase

Para determinar a melhor combinação de lipases (TLL, RML e CALB) para a hidrólise do óleo de coco, foi realizado um projeto de mistura de três fatores e análise de superfície triangular usando Statistica® (Statsoft, EUA). Para a hidrólise do óleo de coco, considerou-se uma razão molar de 2: 1 (água / óleo) e um teor de biocatalisador de 10% da massa de óleo de coco. As reações foram realizadas no equipamento de ultrassom por 1 hora a 30 ° C (ALVES *et al.*, 2014), com algumas modificações.

2.3.3 Hidrólise do óleo de coco

Uma vez determinado o coquetel de lipases ideal, a hidrólise do óleo de coco foi realizada para diferentes proporções molares de água (5: 1 - 10: 1) adicionadas a 1,4 mmol de óleo de coco em frascos de Erlenmeyer de 10 mL. O teor de biocatalisador (o melhor coquetel de lipase) variou de 10% a 20% da massa de óleo de coco. A mistura resultante de água, óleo de coco e biocatalisador foi incubada em banho de ultrassom por 3 horas e temperatura variando de 35 a 55 ° C (Tabela 1), conforme metodologia descrita na literatura (ALVES *et al.*, 2014), com modificações. Para monitorar o progresso da hidrólise, foram titulados 0,3 g de amostra usando NaOH (10 mM), 5 mL de etanol e 3 gotas de fenolftaleína (ALVES *et al.*, 2014). O rendimento de conversão para hidrólise foi determinado pelo método relatado na literatura (RAMOS *et al.*, 2015; ROONEY e WEATHERLEY, 2001).

Tabela 1: Variáveis e seus níveis para o Central Composite Design para otimização da hidrólise do óleo de coco.

Variável	Nome	Código de nível		
		-1	0	+1
X ₁	Temperatura (°C)	35	45	55
X ₂	Conteúdo de enzima (%)	10	15	20
X ₃	Razão molar (água/óleo)	5:1	7.5:1	10:1

Fonte: Autor.

2.3.4 Central Composite Design (CCD)

Para determinar as condições ideais para a hidrólise do óleo de coco, foram realizadas três variáveis CCD. A Tabela 4 mostra 18 tratamentos das 3 variáveis, cada uma em 3 níveis. A equação polinomial de segunda ordem para as variáveis é a seguinte:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (\text{Equação 1})$$

Na qual Y é a variável de resposta, β_0 é a constante, β_i , β_{ii} , β_{ij} são os coeficientes dos efeitos linear, quadrático e de interação, respectivamente, e X_i e X_j são os níveis codificados das variáveis X_i e X_j . A equação quadrática acima foi usada para plotar superfícies para todas as variáveis.

2.3.5 Análise estatística

Os softwares Statistica® 10 (Statsoft, EUA) e OriginPro 2017 (OriginLab, EUA) foram utilizados para o delineamento experimental e análise estatística da hidrólise do óleo de coco. A análise estatística do modelo foi realizada por análise de variância (ANOVA). A significância dos coeficientes de regressão e as probabilidades associadas, $p(t)$, foram determinadas usando o teste Student's t-test. A variância explicada pelo modelo foi dada pelo coeficiente de determinação múltipla, R^2 . Para cada variável, os modelos quadráticos foram representados como gráficos de contorno (2D).

2.3.6 Estabilidade operacional

Utilizando o melhor coquetel de lipase e sob condições reacionais otimizadas, após a hidrólise do óleo de coco, o coquetel de lipase foi separado do meio de reação por filtração a vácuo usando um funil de vidro sinterizado. O coquetel de lipase foi lavado 3 vezes com hexano para dissolver e remover qualquer substrato e produto residual da reação e deixado no sistema de vácuo por 30 minutos para garantir sua secagem (SANTOS, dos *et al.*, 2017). Após a secagem, foram realizados consecutivos ciclos experimentais sob condições otimizadas para avaliar a constrância catalítica do coquetel de lipases.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Atividade enzimática

As lipases comerciais (TLL, RML e CALB) utilizadas neste estudo foram avaliadas como biocatalisadores na hidrólise do azeite em meio isento de solventes. O substrato usado, segundo a metodologia de Soares et al. (1999), foi uma emulsão de goma arábica e azeite de oliva. O sistema foi incubado por 5 min a 37 ° C e 200 r / min. Nessas condições, são listadas as atividades de hidrólise das lipases utilizadas neste estudo (Tabela 2).

Tabela 2: Atividade hidrolítica das lipases em estudo.

Lipase	Atividade (Ug⁻¹)
CALB	766.5 ± 38.33
RML	4154 ± 68.36
TLL	1078 ± 53.9

Fonte: Autor.

O ácido oleico é o principal constituinte dos AGLs do azeite, portanto, os resultados obtidos na análise da atividade das lipases sugerem que o maior rendimento será alcançado pelas amostras com RML como biocatalisador. Apesar de ter a segunda maior atividade catalítica entre as lipases estudadas, a TLL não apresenta desempenho satisfatório nas reações de hidrólise, sendo mais indicado seu uso nas reações de transesterificação e esterificação (RODRIGUES e AYUB, 2011).

3.2 Otimização da hidrólise do óleo de coco

3.2.1 Coquetel de lipase

Com o objetivo de encontrar a melhor combinação de TLL, RML e CALB para a hidrólise do óleo de coco, foi realizado um projeto de mistura de três fatores. As conversões obtidas para o design da mistura são mostradas na Tabela 3 e representadas graficamente na Fig. 2.

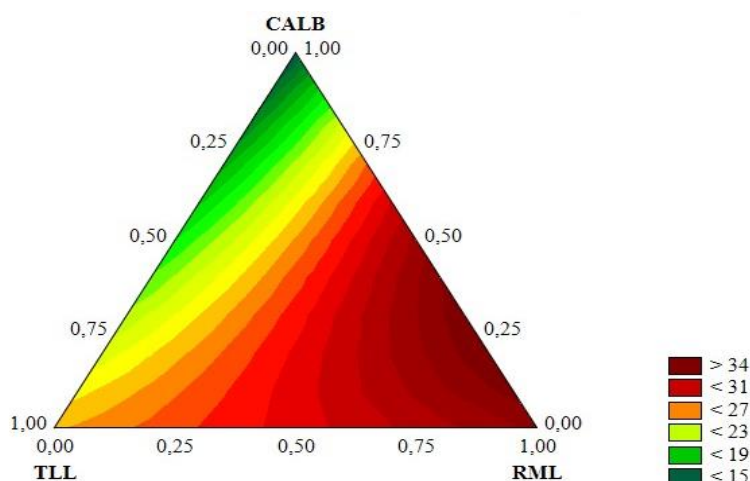
Tabela 3: Projeto experimental para a determinação do melhor coquetel de lipase. Detalhes adicionais são fornecidos na seção Materiais e Métodos.

Run	TLL	RML	CALB	Conversion (%)
1	1.000	0.000	0.000	27.06 ± 0.94
2	0.000	1.000	0.000	33.66 ± 1.46
3	0.000	0.000	1.000	14.17 ± 1.19
4	0.500	0.500	0.000	30.86 ± 0.65
5	0.500	0.000	0.500	16.90 ± 0.12
6	0.000	0.500	0.500	32.00 ± 0.43
7	0.333	0.333	0.333	28.05 ± 2.12
8	0.667	0.167	0.167	25.21 ± 1.00
9	0.167	0.667	0.167	30.68 ± 1.95
10	0.167	0.167	0.667	26.24 ± 0.98

Fonte: Autor.

Como pode ser visto, as conversões mais baixas foram obtidas usando CALB sozinha, enquanto as conversões mais altas foram obtidas usando quantidades maiores de RML, isoladamente ou em combinação. As misturas de RML e CALB melhoraram as conversões, mas esse comportamento não foi observado para misturas de TLL e CALB ou para TLL e RML. Portanto, é possível propor que a melhor combinação de lipases, dentre as estudadas, para a hidrólise do óleo de coco seja a combinação de 75% de RML e 25% de CALB (ver Fig. 2).

Figura 2: Superfície de resposta triangular para desenho experimental, indicando o melhor coquetel de lipase. Meio de reação: razão molar 2: 1 (água / óleo), teor de biocatalisador de 10% da massa de óleo de coco. As reações foram conduzidas em banho de ultrassom (37kHz e 300W) por 1 hora e 30 ° C.



Quando usada como uma lipase única, a TLL e a RML levaram às conversões mais altas, mas sua combinação não melhorou as conversões, provavelmente por causa de suas especificidades de substrato semelhantes, o que pode ter levado a uma inibição da atividade catalítica entre a RML e a TLL. No entanto, quando a CALB foi combinada com a RML, a conversão foi mais do que duplicada, quando comparada ao uso do CALB sozinha. Em um trabalho anterior, Rodrigues e Ayub (2011) constataram que 65% da TLL e 35% da RML eram a mistura mais eficaz de lipases para a hidrólise de óleos vegetais (RODRIGUES e AYUB, 2011). A diferença entre os resultados obtidos neste estudo e os do estudo citado anteriormente pode ser explicada pelas diversas preparações de TLL. Rodrigues e Ayub (2011) utilizaram uma preparação de TLL imobilizada no suporte Lewatit ativado com grupos aldeídos (RODRIGUES e AYUB, 2011), enquanto que, neste estudo, foi utilizada uma preparação de TLL imobilizada por adsorção em um suporte de troca aniônica. Portanto, sabe-se que as diferenças relativas à natureza das estratégias de imobilização e diferentes suporte afetam de maneira significativa a atividade catalítica das enzimas (MATEO *et al.*, 2007).

3.2.2 Parâmetros reacionais

Em certos níveis, a temperatura, o conteúdo do biocatalisador e a proporção molar do substrato podem influenciar na hidrólise do óleo de coco. Entre esses três parâmetros, a temperatura teve o efeito mais alto, enquanto o conteúdo do biocatalisador teve o menor. Na Tabela 4, comparando os experimentos em que o único parâmetro que muda é a temperatura (2-6, 3-7, 4-8 e 9-10), as conversões aumentaram quase 1,24 vezes junto com a temperatura. Como será discutido em mais detalhes posteriormente, o aumento da temperatura aumenta a atividade catalítica, uma vez que permite maior solubilidade do substrato no local ativo dos biocatalisadores (WAGHMARE e RATHOD, 2016).

Tabela 4: Projeto experimental para otimização da hidrólise do óleo de coco, utilizando o melhor coquetel de lipase (75% RML e 25% CALB). Detalhes adicionais são fornecidos na seção Materiais e Métodos.

Run	Temperatura (°C)	Conteúdo de enzima (%)	Razão molar (água/óleo)	Conversão (%)
1	35 (-1)	10 (-1)	5:1 (-1)	58.92 ± 1.10
2	35 (-1)	10 (-1)	10:1 (+1)	61.49 ± 0.92
3	35 (-1)	20 (+1)	5:1 (-1)	21.42 ± 0.83
4	35 (-1)	20 (+1)	10:1 (+1)	60.87 ± 1.06
5	55 (+1)	10 (-1)	5:1 (-1)	55.59 ± 0.69
6	55 (+1)	10 (-1)	10:1 (+1)	62.54 ± 0.24
7	55 (+1)	20 (+1)	5:1 (-1)	87.67 ± 0.93
8	55 (+1)	20 (+1)	10:1 (+1)	96.16 ± 1.12
9	35 (-1)	15 (0)	7.5:1 (0)	71.96 ± 0.77
10	55 (+1)	15 (0)	7.5:1 (0)	81.40 ± 0.57
11	45 (0)	10 (-1)	7.5:1 (0)	79.28 ± 0.66
12	45 (0)	20 (+1)	7.5:1 (0)	98.68 ± 0.19
13	45 (0)	15 (0)	5:1 (-1)	96.94 ± 0.85

14	45 (0)	15 (0)	10:1 (+1)	87.15 ± 1.31
15	45 (0)	15 (0)	7.5:1 (0)	78.53 ± 2.23
16(C)	45 (0)	15 (0)	7.5:1 (0)	78.70 ± 2.78
17(C)	45 (0)	15 (0)	7.5:1 (0)	79.28 ± 2.35
18(C)	45 (0)	15 (0)	7.5:1 (0)	79.66 ± 2.14

Fonte: Autor.

Em um intervalo de confiança de 90%, a análise estatística do modelo foi realizada pelo teste estatístico de Fisher para Análise de Variância (ANOVA). O valor F calculado (2,38) foi significativo ($p < 0,0001$). O ajuste do modelo foi verificado pelo coeficiente de determinação (R^2). O coeficiente de determinação ($R^2 = 0,82$) implica que uma variação amostral de até 80% é atribuída às variáveis independentes e pode ser explicada pelo modelo. A equação polinomial do modelo é dada abaixo.

$$Y (\%) = -191.49 + 12.84X_1 - 0.16X_1^2 - 8.84X_2 - 0.16X_2^2 + 4.33X_3 - 0.15X_3^2 - 0.26X_1X_2 - 0.13X_1X_3 + 0.38X_2X_3$$

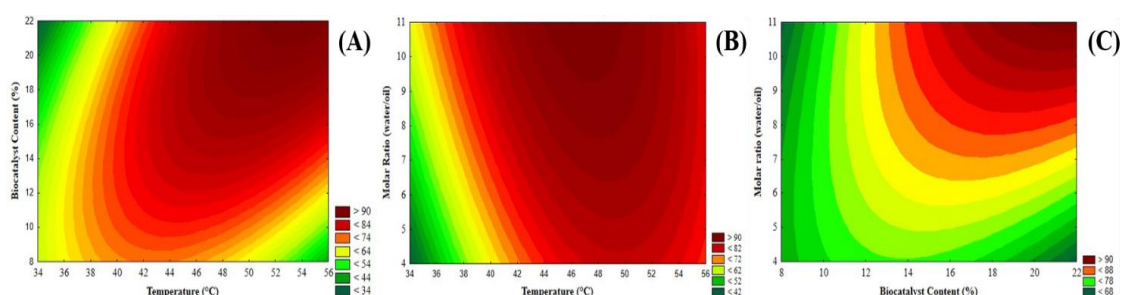
Em que, Y , a conversão (%) da hidrólise e X_1 , X_2 e X_3 são os valores codificados de temperatura, conteúdo de biocatalisador e razão molar, respectivamente.

Para a hidrólise do óleo de coco catalisada pelo melhor coquetel de lipase (75% RML e 25% CALB), as condições ideais foram 20% de conteúdo de biocatalisador (relacionado à massa de óleo), 10: 1 (água / óleo) após 3 horas de incubação a 50 ° C e 37 kHz / 300 W, obtendo-se um valor teórico de 100% para a conversão prevista pelo modelo após 3 horas de incubação a 50 ° C e 37 kHz / 300 W. No entanto, o experimento o valor monitorado em condições ideais foi de 98,68% ± 0,42.

As interações entre temperatura, conteúdo do biocatalisador e razão molar do substrato e seus efeitos nas conversões são mostradas na Fig. 3. A Fig. 3a mostra o possível efeito da temperatura nas conversões, sendo a temperatura ideal de 50 ° C, considerando o melhor o conteúdo de biocatalisador (20%) estava próximo do ponto central. As interações entre a razão molar do substrato e a temperatura sugerem fortemente que aumentar até certo nível (10: 1; água / óleo) a quantidade de água no meio reacional afeta positivamente a

conversão (ver Fig. 3b e c). A água, como um dos substratos, é um fator importante na manutenção da atividade e estabilidade da enzima. No entanto, as lipases apresentam melhor desempenho em ambiente microaquoso, portanto, conteúdos de água elevados no meio reacional podem prejudicar desempenho das enzimas por inibição competitiva (SHARMA, CHAURASIA e DALAI, 2013).

Figura 3: Gráficos de contorno para o delineamento experimental de hidrólise de óleo de coco. (A) temperatura versus conteúdo de biocatalisador; (B) razão molar (água / óleo) versus conteúdo do biocatalisador; (C) Temperatura versus razão molar (água / óleo). Meio de reação: razão molar 5: 1-10: 1 (água / óleo) e teor de biocatalisador de 10-20% da massa de óleo de coco. As reações foram conduzidas em um banho de ultrassom (37kHz e 300W) por 3 horas e 35-55 ° C (consulte a Tabela 4). Em cada figura, a variável que não é representada foi fixada em seu valor central.



Fonte: Autor.

3.3 Efeitos dos parâmetros reacionais

3.3.1 Temperatura

A temperatura é um parâmetro chave nos processos catalisados por enzimas. Embora o aumento da temperatura possa aumentar as taxas de reação até certo ponto, um nível mais alto de temperatura pode levar à desnaturação das enzimas (WAGHMARE e RATHOD, 2016). Neste trabalho, para obter a temperatura ideal do processo, variou de 35 ° C a 55 ° C. Na Tabela 4, é possível observar que as conversões mais altas estão associadas a um aumento de temperatura. De fato, o melhor valor de conversão experimental (98,68%) foi encontrado a 45 ° C. O aumento das conversões com o aumento da temperatura está associado a uma diminuição da viscosidade do óleo de coco que, combinada com as ondas de cavitação por ultrassom, melhoram a transferência de massa, para que os substratos possam interagir com o

sítio ativo das lipases com mais facilidade e eficiência, sem sofrer perdas significativas de energia devido à resistência à viscosidade na transferência de massa (WAGHMARE e RATHOD, 2016).

3.3. Razão molar

A hidrólise do óleo de coco foi realizada sob um meio livre de solvente. O meio reacional foi composto de duas fases, óleo e água. A água desempenha dois papéis principais na reação, pois ajuda na hidratação das lipases e atua como um dos substratos. Para determinar a influência na conversão, estudou-se a razão molar variando de 5: 1 a 10: 1 (água / óleo), como é mostrado na Tabela 4. Sob essa faixa, observou-se que a conversão aumenta com o razão molar, o que significa que a quantidade de água oferecida foi suficiente para garantir a hidratação das lipases, favorecendo sua estabilidade e atividade, além de atuar como substrato.

Por outro lado, concentrações mais altas de óleo podem aumentar a viscosidade do meio de reação, limitando a transferência de massa dos substratos para o local ativo da lipase. Portanto, a concentração do óleo permaneceu a mesma para todas as execuções deste trabalho. Da mesma forma, o aumento da viscosidade reduz o efeito da cavitação, responsável pelo efeito catalítico da irradiação por ultrassom. Portanto, apenas a quantidade de água no meio foi avaliada para analisar como a taxa de conversão da hidrólise é afetada. A irradiação por ultrassom aumenta a emulsificação entre substratos e também aumenta a produção de elétrons livre (LIU et al. 2008), diminuindo as limitações da transferência de massa entre substratos e, portanto, catalisando fisicamente a reação (WAGHMARE e RATHOD, 2016).

3.3.3 Conteúdo de biocatalizador

O conteúdo do biocatalisador é um dos parâmetros a serem considerados para avaliar a viabilidade de qualquer processo, uma vez que apresenta considerável impacto na viabilidade econômica do processo como um todo. Para determinar o conteúdo de biocatalisador mais adequado do coquetel de lipase já estabelecido (75% RML e 25% CALB), o conteúdo de biocatalisador variou de 10 a 20% da massa de óleo. Como pode ser visto na Tabela 4, o aumento do conteúdo do biocatalisador aumenta as conversões. De fato, a melhor conversão experimental (98,68%) foi encontrada com o maior conteúdo de biocatalisador (20%). O aumento do conteúdo do biocatalisador aumenta a concentração da área ativa da superfície do biocatalisador, ou seja, haverá uma maior concentração de biocatalisador no meio

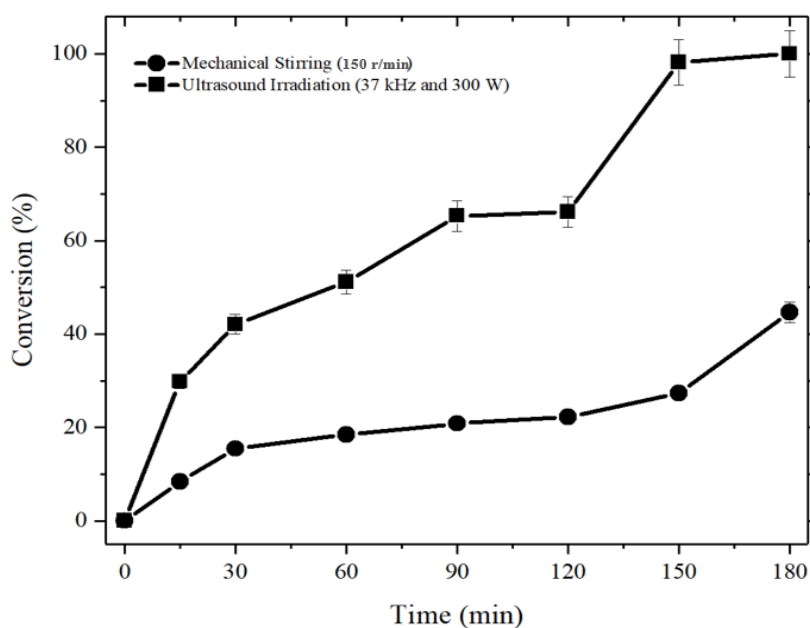
de reação que pode catalisar uma maior concentração de substratos (WAGHMARE e RATHOD, 2016).

Geralmente, as reações enzimáticas assistidas por ultrassom são realizadas em baixas frequências (20-50 kHz) porque altas frequências de irradiação podem desnaturar enzimas (BANSODE e RATHOD, 2017). Consequentemente, o efeito da irradiação por ultrassom na hidrólise do óleo de coco foi avaliado usando uma frequência de 37 kHz com o teor de biocatalisador variando de 10 a 20% da massa de óleo. Nos 4 últimos experimentos, observou-se que a conversão permaneceu estável durante todo o período do estudo e em todas as execuções experimentais (ver Tabela 4), tendo um comportamento quase linear. Da mesma forma, em alta potência, como o valor utilizado neste estudo (300W), ocorre o surgimento de um grande número de bolhas de cavitação no meio de reação, favorecendo a conversão e sugerindo que a potência do equipamento utilizado neste estudo tem um efeito positivo para melhorar as conversões (CSOKA, KATEKHAYE e GOGATE, 2011).

3.3.4 Comportamento catalítico físico do ultrassom

No melhor coquetel de lipase (75% RML e 25% CALB) e sob condições reacionais otimizadas (20% do conteúdo do biocatalisador, 10: 1 (água / óleo), 3 horas de incubação a 50 ° C e 37 kHz / 300 W), a influência da agitação mecânica e da irradiação por ultrassom foram avaliadas na hidrólise do óleo de coco, como na figura 4.

Figura 4: Conversões versus tempo em diferentes reatores (irradiação ultrassônica e agitação mecânica) na hidrólise do óleo de coco catalisada pelo coquetel de lipase (75% RML e 25% CALB). Meio de reação: razão molar 10: 1 (água / óleo) e teor de biocatalisador de 20% da massa de óleo de coco. As reações foram conduzidas em banho de ultrassom (37kHz e 300W) por 3 horas a 50 ° C.



Fonte: Autor.

Como pode ser visto na Fig. 4, os experimentos realizados sob irradiação ultrassônica foram significativamente mais rápidos do que aqueles realizadas sob agitação mecânica. De fato, após 15 minutos de reação, a conversão da amostra incubada no banho de ultrassom foi 70,36% maior que a incubada no equipamento de agitação mecânica e, com o tempo, as amostras incubadas no banho de ultrassom apresentaram conversões mais altas do que as observadas para equipamento de agitação mecânica.

A irradiação ultrassônica pelos fenômenos de cavitação, melhora a transferência de massa em sistemas de reação heterogêneos (SANCHETI e GOGATE, 2017), como a hidrólise enzimática deste trabalho. Além disso, o ultrassom melhora a mistura e a interação entre as fases, devido ao colapso de bolhas em soluções aquosas, e pode aumentar as taxas de reação, diminuir o tempo reacional e reduzir as limitações da transferência de massa entre enzima e substrato (GALGALI, GAWAS e RATHOD, 2018).

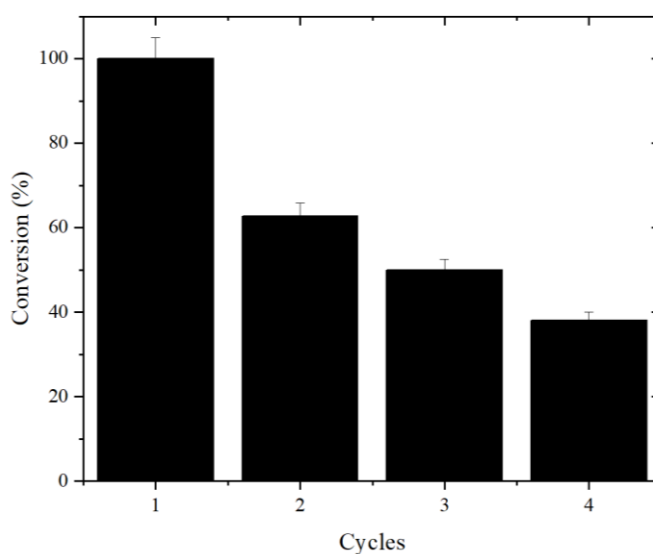
Usando um coquetel de lipase semelhante ao deste estudo (80% RML e 20% CALB), Alves et al. (2014) alcançaram uma conversão de aproximadamente 80% após 20 horas de reação (ALVES *et al.*, 2014). Neste trabalho, uma conversão máxima de 98,68% foi alcançada após 3 horas de reação sob irradiação ultrassônica. Kulkarni e Pandit (2005), utilizando apenas lipase de *Aspergillus oryzae*, alcançaram uma conversão máxima de 93,18% após 24 horas de reação para a hidrólise do óleo de mamona sob irradiação ultrassônica (KULKARNI e PANDIT 2005). Portanto, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, a

combinação de lipases e irradiação ultrassônica é melhor que o uso de uma única lipase e a agitação mecânica para a hidrólise do óleo de coco.

3.3.5 Estabilidade operacional

A aplicabilidade industrial das lipases requer estabilidade e manutenção da atividade catalítica, permitindo o uso repetido desses biocatalisadores. Para avaliar a estabilidade operacional do melhor coquetel de lipase (75% RML e 25% CALB) em condições reacionais otimizadas (20% do coquetel de lipase, 10: 1 (água / óleo), 3 horas de incubação a 50 ° C e 37 kHz / 300 W), foram realizados ciclos consecutivos de hidrólise do óleo de coco. Antes de cada ciclo, o coquetel de lipase foi lavado com hexano para dissolver e remover qualquer produto residual da reação (Santos, dos *et al.*, 2017). A estabilidade operacional do coquetel de lipase é mostrada na Fig. 5, que mostra que a reutilização do coquetel de lipase é possível por 3 ciclos consecutivos, mantendo 50% de sua atividade inicial, sugerindo que uma das enzimas do coquetel de lipase perde sua atividade / estabilidade ao longo dos ciclos consecutivos de hidrólise.

Figura 5: Estabilidade operacional do coquetel de lipase (75% RML e 25% CALB) na hidrólise consecutiva do óleo de coco. Meio de reação: razão molar 10: 1 (água / óleo) e teor de biocatalisador de 20% da massa de óleo de coco. As reações foram conduzidas em banho de ultrassom (37kHz e 300W) por 3 horas a 50 ° C.



Fonte: Autor.

É importante observar que a RML apresenta baixa estabilidade operacional; por outro lado, a CALB apresenta uma estabilidade operacional alta. Portanto, isso pode explicar a diminuição da conversão após ciclos consecutivos de hidrólise do óleo de coco. A baixa estabilidade da RML pode ser devido a fraturas na resina acrílica na qual está imobilizada. Quando o suporte apresenta defeitos estruturais, a imobilização da enzima fica comprometida e, como consequência, a enzima é mais propensa a desnaturação e alterações conformacionais. Portanto, os defeitos na estrutura do suporte fornecem locais indesejáveis de ligação ao suporte enzimático, o que torna os biocatalisadores instáveis (Xie e Ma, 2009). Essas ligações suportadas por enzimas embriogênicas adicionadas a ciclos consecutivos com lavagens consecutivas com solventes podem ter causado a instabilidade da RML durante a reutilização. No caso da CALB, outros estudos concluíram que a Novozym® 435 mantém sua estabilidade operacional por até cinco ciclos consecutivos (Foresti e Ferreira, 2005; Xie e Ma, 2010). No entanto, neste trabalho, como CALB representa apenas 25% da quantidade de lipase no coquetel, essa estabilidade operacional não é tão significativa quanto a da RML, que representa 75% do coquetel.

4 CONCLUSÃO

O conceito recente de combinar diferentes lipases para catalisar reações com substrato heterogêneo foi aplicado com sucesso neste trabalho. O coquetel de lipases melhorou a hidrólise do óleo de coco assistida por ultrassom e, por superfície triangular, o melhor coquetel de lipases foi de 75% RML e 25% CALB. Os parâmetros de reação (temperatura, conteúdo do biocatalisador e razão molar (água / óleo)) também foram otimizados pela metodologia da superfície de resposta, alcançando quase a conversão completa (até 98%) do substrato em ácidos graxos livres. O coquetel de lipase reteve aproximadamente metade de sua atividade inicial após 3 ciclos consecutivos de hidrólise do óleo de coco, principalmente devido à baixa estabilidade da RML, a principal componente do coquetel de lipase. A estabilidade operacional da RML em ciclos reacionais consecutivos foi o fator limitante neste estudo. Ao conhecimento dos autores, até o momento, esta comunicação é o primeiro relatório da literatura para a hidrólise do óleo de coco assistida por ultrassom, catalisada por um coquetel de lipases. Especialmente sob irradiação ultrassônica, a combinação de lipases pode ser útil para a hidrólise de outros óleos vegetais e trazer melhores desempenhos na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

AL-ZUHAIR, S.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1155–1163, 2003.

ALVES, J. S. *et al.* Combi-lipase for heterogeneous substrates: A new approach for hydrolysis of soybean oil using mixtures of biocatalysts. **RSC Advances**, v. 4, n. 14, p. 6863–6868, 2014.

ANDERSON, E. M.; LARSSON, K. M.; KIRK, O. One biocatalyst - many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 16, n. 3, p. 181–204, 1998.

BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. An investigation of lipase catalysed sonochemical synthesis: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, n. February, p. 503–529, 2017.

BONAZZA, H. L. *et al.* Operational and Thermal Stability Analysis of *Thermomyces lanuginosus* Lipase Covalently Immobilized onto Modified Chitosan Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 1, p. 182–196, 2018.

CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, 2015.

CSOKA, L.; KATEKHAYE, S. N.; GOGATE, P. R. Comparison of cavitation activity in different configurations of sonochemical reactors using model reaction supported with theoretical simulations. **Chemical Engineering Journal**, v. 178, p. 384–390, 2011.

DJOUDI, W.; AISSANI-BENISSAD, F.; BOUROUINA-BACHA, S. Optimization of copper cementation process by iron using central composite design experiments. **Chemical Engineering Journal**, v. 133, n. 1–3, p. 1–6, 2007.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3–4, p. 197–212, 2010.

FONSECA, A. M. DA *et al.* The use of new hydrogel microcapsules in coconut juice as biocatalyst system for the reaction of quinine. **Industrial Crops and Products**, v. 145, n. March 2018, p. 111890, 2020.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. 107–108, p. 23–30, 2005.

GALGALI, A.; GAWAS, S. D.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted synthesis of citronellol laurate by using Novozym 435. **Catalysis Today**, v. 309, p. 133–139, 2018.

GARUD, S. S.; KARIMI, I. A.; KRAFT, M. Design of computer experiments: A review. **Computers and Chemical Engineering**, v. 106, p. 71–95, 2017.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 782–798, 2009.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 910, p. 2–13, 2012.

HO, W. W. S.; NG, H. K.; GAN, S. Advances in ultrasound-assisted transesterification for biodiesel production. **Applied Thermal Engineering**, v. 100, p. 553–563, 2016.

KULKARNI, Samir R; PANDIT, Aniruddha B. Enzymatic hydrolysis of castor oil: an approach for rate enhancement and enzyme economy. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 2, p.

241-245, 2005.

LIMA, G. V. *et al.* Chemoenzymatic synthesis of (S)-Pindolol using lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 546, p. 7–14, 2017.

LUZIA, C. *et al.* Design of immobilized enzyme biocatalyst: Drawbacks and opportunities. v. 42, n. 7, p. 768–783, 2019.

MATEO, C. *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

MELO, A. D. Q. *et al.* Synthesis of benzyl acetate catalyzed by lipase immobilized in nontoxic chitosan-polyphosphate beads. **Molecules**, v. 22, n. 12, 2017.

MONTEIRO, R. R. C. *et al.* Immobilization of lipase a from *Candida antarctica* onto Chitosan-coated magnetic nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, 2019.

_____. Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. **Catalysis Today**, n. November 2019, p. 1–14, 2020.

OLIVEIRA, U. M. F. DE *et al.* Effect of the Presence of Surfactants and Immobilization Conditions on Catalysts' Properties of *Rhizomucor miehei* Lipase onto Chitosan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 4, p. 1263–1285, 2018.

_____. Efficient biotechnological synthesis of flavor esters using a low-cost biocatalyst with immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 1, p. 597–608, 2019.

ORTIZ, C. *et al.* Novozym 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst? **Catalysis**

Science and Technology, v. 9, n. 10, p. 2380–2420, 2019.

PINHEIRO, B. B. *et al.* Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 798–809, 2019.

PINHEIRO, M. P. *et al.* Modulation of Lecitase properties via immobilization on differently activated Immobead-350: Stabilization and inversion of enantiospecificity. **Process Biochemistry**, v. 87, n. August, p. 128–137, 2019.

RAMOS, E. Z. *et al.* Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 43–51, 2015.

RIOS, N. S. *et al.* Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 99–120, 2018.

_____. Further stabilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* immobilized on octyl coated nanoparticles via chemical modification with bifunctional agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 313–324, 2019.

RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 682–688, 2011.

ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 947–953, 2001.

ROSENTHAL, K.; LÜTZ, S. Recent developments and challenges of biocatalytic processes in the pharmaceutical industry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 11, p. 58–64, 2018.

SÁ, A. G. A. *et al.* A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science and Technology**, v. 69, p. 95–105, 2017.

SANCHETI, S. V.; GOGATE, P. R. A review of engineering aspects of intensification of chemical synthesis using ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 527–543, 2017.

SANTOS, J. C. S. DOS *et al.* Tuning the catalytic properties of lipases immobilized on divinylsulfone activated agarose by altering its nanoenvironment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 77, p. 1–7, 2015.

SANTOS, J. C. S. DOS *et al.* Immobilization of CALB on activated chitosan: Application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide. **Biotechnology Reports**, v. 14, p. 16–26, 2017.

SHARMA, A.; CHAURASIA, S. P.; DALAI, A. K. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. **Catalysis Today**, v. 207, p. 93–100, 2013.

SOARES, C. M. F. *et al.* Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 77–79, p. 745–757, 1999.

SOUZA, T. C. DE *et al.* Cashew apple bagasse as a support for the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*: Application to the chemoenzymatic production of (R)-Indanol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 130, p. 58–69, 2016.

STILLWELL, W. Introduction to Biological Membranes. **An Introduction to Biological Membranes**, p. 3–15, 2016.

UPPENBERG, J. *et al.* Crystallographic and Molecular-Modeling Studies of Lipase B from *Candida antarctica* Reveal a Stereospecificity Pocket for Secondary Alcohols. **Biochemistry**, v. 34, n. 51, p. 16838–16851, 1995.

VERDASCO-MARTÍN, C. M. *et al.* Effect of chemical modification of Novozym 435 on its performance in the alcoholysis of camelina oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 75–86, 2016.

WAGHMARE, G. V.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted enzyme catalyzed hydrolysis of waste cooking oil under solvent free condition. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 32, p. 60–67, 2016.

WOHLGEMUTH, R. Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 713–724, 2010.

XIE, W.; MA, N. Immobilized Lipase on Fe₃O₄ Nanoparticles as Biocatalyst for Biodiesel Production. **Energy Fuels**, v. 23, n. 3, p. 1347–1353, 2009.

____. Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 6, p. 890–896, 2010.

YADAV, G. D.; BORKAR, I. V. Synthesis of n-butyl acetamide over immobilized lipase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 420–426, 2009.