



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



**Adaptação do biorreator do tipo *airlift* para reação
enzimática empregando lipase imobilizada[®] na síntese de lipídeos
estruturados do tipo MLM**

Daniele Gonçalves de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Marcel Otávio Cerri

Coorientador: Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula

Araraquara – SP

2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



**Adaptação do biorreator do tipo *airlift* para reação
enzimática empregando lipase imobilizada® na síntese de lipídeos
estruturados do tipo MLM**

Daniele Gonçalves de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Otávio Cerri

Coorientadora: Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula

Araraquara- SP

2021

O49a

Oliveira, Daniele Gonçalves de.

Adaptação do biorreator do tipo *Airlift* para reação enzimática empregando lipase imobilizada® na síntese de lipídeos estruturados do tipo MLM / Daniele Gonçalves de Oliveira. – Araraquara: [S.n.], 2021. 73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Marcel Otávio Cerri. Coorientadora: Ariela Veloso de Paula.

1. Reator airlift. 2. Triglicerídeos dietéticos. 3. Acidólise. 4. Lipase®. 5. Óleo de semente de uva. I. Cerri, Marcel Otávio, orient. II. Paula, Ariela Veloso de, coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Adaptação do biorreator do tipo airlift para reação enzimática empregando lipase imobilizada® na síntese de lipídeos estruturados do tipo MLM

AUTORA: DANIELE GONÇALVES DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: MARCEL OTÁVIO CERRI

COORDINADORA: ARIELA VELOSO DE PAULA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCEL OTÁVIO CERRI (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Profa. Dra. JULIANA CRISTINA BASSAN (Participação Virtual)

Universidade Paulista - UNIP - Araraquara

Prof. Dr. MATEUS NORDI ESPERANÇA (Participação Virtual)

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo

Araraquara, 10 de junho de 2021

Dedico este trabalho aos meus pais, Neide e João (*in memoriam*), por sempre terem acreditado no meu potencial, me encorajando a correr atrás dos meus sonhos, por me apoiar dando oportunidade e suporte para eu chegar onde estou.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcel, por todos esses anos de ensinamentos, amizade, oportunidade e a confiança para desenvolver esta pesquisa.

A minha coorientadora Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula, pelos ensinamentos, pela atenção, suporte e incentivo.

A minha mãe pelo amor incondicional e sem limites, pelo apoio e incentivo de correr sempre atrás dos meus objetivos.

Ao meu pai que mesmo não estando presente aqui, foi e é uma das minhas maiores inspirações de força, persistência, humildade e que tenho certeza que seria um dos maiores incentivadores.

Aos meus irmãos que sempre estiveram presentes incentivando a correr atrás dos meus objetivos.

A toda minha família que sempre esteve torcendo pelo meu sucesso.

Aos amigos Bruno, Bruna, Camila, Renata, Agnes, Isa, Cassamo e Rodrigo pela amizade sincera, pelos conselhos e pelos ótimos momentos de convivência durante estes anos de companheirismo.

Aos técnicos Adriana, Ana, Flavio e Matheus pelo profissionalismo e pela disposição em ajudar.

Ao Bruno e a Renata pelo companheirismo e suporte durante toda a pesquisa.

Aos integrantes do grupo de pesquisa EnziTAG que sempre estiveram por perto durante este período, por toda a ajuda, ensinamentos e companhia, em especial ao Vitor, Jeine e Daniella.

À todos os amigos do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da UNESP.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara por todas as oportunidades, infraestrutura e suporte concedidos.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa. 001

À FAPESP pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa (Processo Fapesp 2017/11482-7).

RESUMO

As indústrias de alimentos e fármacos incorporam cada vez mais tecnologia em seus produtos, como a modificação de óleos e gorduras para a obtenção de triglicerídeos estruturados. Desta forma, cresce o interesse por biorreatores para sistemas trifásicos como os que utilizam enzimas imobilizadas. Os biorreatores *airlift* se mostram atraentes para este tipo de processo, pois fornecem uma mistura controlada, baixa taxa de cisalhamento e uma eficiente suspensão de sólidos. Logo, o objetivo do trabalho foi a adaptação de um biorreator *airlift* de tubos concêntricos usualmente empregado em fermentação microbiana para a síntese enzimática de lipídeos estruturados, especificamente os triglicerídeos dietéticos do tipo MLM, isto é, aqueles que possuem ácidos graxos de cadeia média (M), nas posições *sn-1* e *sn-3*, e de cadeia longa (L), na posição *sn-2* da molécula de triacilglicerol. Foi selecionado o óleo de semente de uva, com base em sua composição rica em ácidos graxos insaturados. Este óleo foi submetido a reações de acidólise com o ácido graxo de cadeia média ácido cáprico (C10:0), tal reação foi catalisada pela lipase imobilizada, Lipozyme RM IM[®] (*Rhizomucor miehei*). Primeiramente, com o auxílio de uma impressora 3D confeccionou-se um tubo interno com estrutura de um tronco de um cone e um fundo abaulado, objetivando a otimização da mistura no biorreator. Após, caracterizou-se sua hidrodinâmica, obtendo melhor tempo de mistura na vazão de ar de 2 vvm para as três cargas de sólidos (suporte de imobilização da enzima) estudadas. Posteriormente, realizou-se reações de acidólise em batelada variando a vazão de ar em 1 e 2 vvm utilizando 1% (v/v) de carga de enzimas, obtendo graus de incorporação (GI) de C10 igual $24,02 \pm 0,13\%$ para 1 vvm e $28,76 \pm 0,05\%$ para reação à 2 vvm. Realizaram-se reações com 2 e 3 % (v/v) de enzimas imobilizadas e observou-se que com o aumento de carga enzimática ocorre aceleração da velocidade de incorporação de ácidos graxos de cadeia média. O maior grau de incorporação obtido foi na reação com maior massa enzimática, 3% (v/v) em relação ao meio reacional no tempo 24h, $32,32 \pm 1,1\%$. Outro ponto observado foi que o aumento do índice de peróxido durante esse período foi desprezível, pois houve um aumento de $0,72 \pm 0,10$ para $2,82 \pm 0,28$ mEq/Kg estando abaixo do estipulado pela ANVISA que é 10mEq/Kg. Tais resultados, mostram que o biorreator do tipo *airlift* é apto a realizar misturas multifásicas, mostrando-se um excelente reator para reações enzimáticas, especialmente para a síntese de triglicerídeos dietéticos do tipo MLM.

Palavras-chaves: Reator *airlift*; Triglicerídeos dietéticos; Acidólise; Lipase[®]; Óleo de semente de uva.

ABSTRACT

The food and pharmaceutical industries are increasingly incorporating technology into their products, such as modifying oils and fats to obtain structured triglycerides. Thus, interest in bioreactors for three-phase systems such as those using immobilized enzymes grows. Airlift bioreactors are attractive for this type of process, as they provide a controlled mixing, low shear rate, and efficient suspension of solids. Therefore, the objective of the work was the adaptation of a concentric tube airlift bioreactor usually used in microbial fermentation for the enzymatic synthesis of structured lipids, specifically MLM-type dietary triglycerides, that is, those with medium-chain fatty acids (M), at the sn-1 and sn-3 positions, and long-chain (L), at the sn-2 position of the triacylglycerol molecule. Grape seed oil was selected, based on its rich composition in unsaturated fatty acids. This oil was subjected to acidolysis reactions with the medium-chain fatty acid capric acid (C10:0), this reaction was catalyzed by the immobilized lipase, Lipozyme RM IM® (*Rhizomucor miehei*). First, with the aid of a 3D printer, an inner tube was made with a trunk of a cone structure and a convex bottom, aiming at optimizing the mixture in the bioreactor. Afterward, its hydrodynamics were characterized, obtaining the best mixing time at an airflow of 2 vvm for the three solid loads (enzyme immobilization support) studied. Subsequently, batch acidolysis reactions were carried out, varying the airflow in 1 and 2 vvm using 1% (v/v) enzyme load, obtaining degrees of incorporation (GI) of C10 equal to 24.02 ± 0.13 % for 1 vvm and 28.76 ± 0.05 % for reaction to 2 vvm. Reactions were carried out with 2 and 3% (v/v) of immobilized enzymes and it was observed that with the increase in the enzymatic load, there was an acceleration of the incorporation rate of medium-chain fatty acids. The highest degree of incorporation obtained was in the reaction with greater enzymatic mass, 3% (v/v) in relation to the reaction medium in time 24h, 32.32 ± 1.1 %. Another point observed was that the increase in the peroxide index during this period was negligible, as there was an increase from 0.72 ± 0.10 to 2.82 ± 0.28 mEq/Kg, being below the stipulated by ANVISA, which is 10mEq/ Kg. These results show that the airlift-type bioreactor is able to carry out multiphase mixtures, proving to be an excellent reactor for enzymatic reactions, especially for the synthesis of MLM-type dietary triglycerides.

Key words: Airlift reactor; Dietary triglycerides; Acidolysis; Lipase®; Grape seed oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Esquema dos diferentes tipos de reator <i>airlift</i> ; (A) recirculação externa e (B) recirculação interna	18
Figura 2 - Processos de Interesterificação- (A)Processo de Acidólise; (B) Processo de Alcoólise; (C) Processo de Transesterificação	24
Figura 3 - Tipos de biorreatores: (A) Tanque Agitado; (B) Leito Fixo e (C) Leito Fluidizado.....	26
Figura 4 - Desenho esquemático de um biorreator airlift com as regiões de subida (<i>riser</i>) e descida (<i>downcomer</i>)	29
Figura 5 . Diferentes tipos de reator airlift, onde a seta vermelha apresenta a região de subida e a seta azul a região de descida. (A) airlift de tubos concêntricos (B) airlift split-cylinder e (C) airlift de circulação externa.	30
Figura 6 - Regimes de fluxo de gás em uma mistura com suspensão de sólidos: I: Regime com baixa velocidade do gás: sem transporte de gás. II Regime de transição: arrastamento de gás para o downcomer, mas sem recirculação de gás. III. Regime de circulação de gás complet.....	35
Figura 7 - Lipozyme RM IM	37
Figura 8 - Airlift de tubos concêntricos. a) reator sem o tubo interno b) dimensões do airlift	38
Figura 9 - Impressora 3D (MakerBot Replicator+, modelo:PABH65) utilizada no presente estudo.....	39
Figura 10 - Peças que foram modificadas no projeto- (A)Tubo interno padrão e (B) Corte transversal do fundo do reator do tipo airlift padrão.....	40
Figura 11 . Desenho esquemático de um biorreator airlift para reações enzimáticas	40
Figura 12 - Reômetro Brookfield ® DV-III ULTRA.	43
Figura 13 - Desenho esquemático ampliado do biorreator airlift- (a) Padrão e (b) Nova configuração proposta.....	48
Figura 14 - Perfil de velocidade da microalga.....	49
Figura 15 - Configuração geométrica da porção inferior interna (fundo) proposto para o airlift- (a) Fundo abaulado; (b) corte transversal do fundo.....	49
Figura 16 – (a) Tubo interno padrão; (b) Nova configuração do tubo interno proposta.....	50

Figura 17 - Biorreator airlift – (a) configuração convencional ; (b) e (c) nova configuração A- tubo interno; B- fundo abaulado; (B) Diâmetro interno (Di) e altura do líquido (HL) no biorreator.....	47
Figura 18 -Desenho esquemático da nova configuração do biorreator airlift modificado reações enzimáticas.....	
Figura 19 -Gráfico do tempo de mistura em função da vazão de ar	55
Figura 20 -Linearização de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos da lipozyme RM IM.....	57
Figura 21 - Grau de incorporação do ácido cáprico (C10) ao decorrer de 48 horas das reações com 1 e 2 vvm de vazão de ar.....	58
Figura 22 – Índice de Peróxido no decorrer de 48 horas das reações em 1 e 2vvm.....	59
Figura 23 - Grau de incorporação do ácido cáprico (C10) ao decorrer de 48 horas das reações com 2 vvm de vazão de ar.....	61
Figura 25 -Ajuste do modelo proposto aos pontos experimentais.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-Produção de lipídeos estruturados através da reação de acidólise.....	27
Tabela 2	Especificações técnicas da Lipozyme RM IM ^(R)	37
Tabela 3	Parâmetros físico-químicos do óleo de semente de uva e do ácido cáprico utilizado.....	38
Tabela 4	Dimensões da nova configuração do biorreator <i>airlift</i>	52
Tabela 5	Tempos de mistura obtidos para o reator <i>airlift</i> variando as vazões de ar e a carga de sólidos (v/v) em meio oleoso.....	54
Tabela 6	Atividade hidrolítica média da Lipozyme RM IM. obtida variando-se a concentração de azeite.....	57
Tabela 7	Viscosidade do óleo de semente de uva e das reações com diferentes cargas de enzimas.....	60
Tabela 8	Grau de incorporação, índice de peróxido e velocidade máxima de incorporação em diferentes tempos das reações de 1%, 2% e 3% de carga enzimática na vazão de 2 vvm.....	61
Tabela 9	Graus de incorporação de C10 obidos e comparados com diferentes estudos da literatura para a produção de triglicerídeos dietéticos do tipo MLM.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

A:	Atividade hidrolítica
Ad:	Área da secção transversal da região de descida (m ²)
As:	Área da secção transversal da região de subida (m ²)
C10:	Ácido cáprico
CFD:	Fluidodinâmica computacional
De1:	Diâmetro interno do tubo externo (mm)
Di:	Diâmetro interno da coluna
D_{RB}:	Diâmetro da base do Riser
D_{RT}:	Diâmetro do Topo do riser
D_{Tm}:	Diâmetro médio do tubo interno
g:	Aceleração gravitacional (m.s ⁻²)
GI:	Grau de incorporação de ácidos graxos
H_L:	Altura do líquido
H_r:	Altura do riser (mm)
IP:	Índice de Peróxido
m:	Massa de enzima adicionada (g)
M:	Molaridade da solução (mol/L)
MFA:	Número de mols de ácidos graxos de cadeia média (C10:0) no triglicerídeo
MLM:	Triglicerídeos que possuem ácidos graxos de cadeia média (M), em posições <i>sn-1</i> e <i>sn-3</i> , e de cadeia longa (L), na posição <i>sn-2</i> da molécula de triacilglicerol
MMM:	Triacilglicerol com ácidos de cadeia média em todas as posições
MT:	Número de mols totais de ácidos graxos no triglicerídeo
PLA:	Ácido poliláctico
Q_G:	Vazão volumétrica de alimentação do gás (m ³ /s)
P_a:	Pressão atmosférica (Pa)
ρ_d:	Densidade da mistura dos líquidos e sólidos (kg.m ³)
SLS:	Triglicerídeo com ácidos graxos de cadeia curta (S) nas posições <i>sn-1</i> e <i>sn-3</i> e de cadeia longa (L) na posição interna
t:	Tempo de reação (min)
TAG:	Molécula de triacilglicerol

TMG:	Taxa mínima de fornecimento de gás
t_m:	Tempo de mistura
U/g:	μmol de produto formado/ minuto de reação
U_{GS}:	A velocidade do gás na região de subida (m/s);
V_a:	Volume de solução utilizado na amostra (mL)
V_b:	Volume de solução utilizado no branco da reação (mL)
V_L:	Volume do líquido no reator (L)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1.	Óleos e gorduras.....	20
2.2.	Triglicerídeos de baixa caloria.....	21
2.3.	Óleo de semente de uva.....	22
2.4.	Lipases.....	23
2.5.	Biorreatores enzimáticos.....	25
2.5.1.	Biorreatores pneumáticos do tipo <i>airlift</i>	27
2.5.2.	Avaliação hidrodinâmica de biorreatores <i>airlift</i>	31
2.5.2.1.	Velocidade superficial do gás.....	31
2.5.2.2.	Tempo de mistura.....	32
2.6.	Sistemas trifásicos em biorreatores <i>airlift</i>	32
3.	OBJETIVOS	36
3.1.	Objetivo Geral	36
3.2.	Objetivos Específicos.....	36
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1.	MATERIAIS.....	37
4.1.1.	Biocatalisadores.....	37
4.1.2.	Reagentes.....	37
4.1.3.	Biorreator.....	38
4.2.	MÉTODOS	39
4.2.1.	Nova configuração do biorreator do tipo <i>airlift</i>	39
4.2.1.1.	Desenvolvimento das novas peças	39

4.2.1.2.	Operação	do	biorreator	
<i>airlift</i>				40
4.2.1.3.	Hidrodinâmica.....			41
4.2.1.3.1.	Determinação do tempo de mistura na nova configuração do biorreator			
<i>airlift</i>				41
4.2.1.3.2.	Determinação da velocidade superficial do gás			
(U _{Gs}).....				41
4.2.2.	Cálculo		de	
Potência.....				42
4.2.3.	Viscosidade.....			42
4.2.4.	Propriedade catalítica da enzima imobilizada Lipozyme RM IM.....			43
4.2.5.	Síntese de triglicerídeos dieté			
(MLM).....				43
4.2.6.	Determinação de		atividaaue	
hidrolítica.....				43
4.2.7.	Caracterização das matérias-primas.....			44
4.2.8.	Análise		do	
produto.....				44
4.2.8.1.	Separação dos triglicerídeos por neutralização dos ácidos graxos residuais			44
4.2.8.2.	Metilação dos TAG após a separação.....			45
4.2.8.3.	Composição em ácidos graxos.....			45
4.2.8.4.	Determinação do grau de incorporação dos ácidos graxos (GI).....			45
4.2.8.5.	Determinação do índice de peróxido (IP)			46
4.2.9.	Cinética de reação- Modelo do Grau de incorporação.....			46
5.	RESULTADO E DISCUSSÕES.....			48
5.1.	Nova configuração do biorreator do tipo <i>airlift</i>			48
5.1.1.	Desenvolvimento das novas peças			48
5.2.	Hidrodinâmica.....			54
5.2.1.	Determinação do tempo de mistura da nova configuração do biorreator			
<i>airlift</i>				54
5.3.	Determinação dos parâmetros cinéticos – Km e Vmax.....			56
5.4.	Síntese de triglicerídeos dietéticos do tipo MLM			57
6.	CONCLUSÕES.....			67
REFERÊNCIAS.....				69

1. INTRODUÇÃO

Os avanços da engenharia de bioprocessos e a busca dos consumidores por uma alimentação mais saudável, contribuem diretamente na elaboração de novos processos para produção de alimentos e fármacos com características específicas. Entre eles, os óleos e gorduras modificados, também conhecidos como Lipídeos Estruturados, têm recebido especial atenção, pois são importantes na dieta, sendo essenciais na promoção e prevenção da saúde (HEIDOR et al., 2016; LIU et al., 2015).

Os triglicerídeos podem ser modificados enzimaticamente ou quimicamente objetivando o aumento da absorção de ácidos graxos, prevenindo a obesidade e doenças metabólicas. Os triglicerídeos dietéticos do tipo MLM, os quais possuem ácidos graxos de cadeia média (M), nas posições sn-1 e sn-3, e cadeia longa (L), na posição sn-2 da molécula de triacilglicerol mostram interessantes características como o menor valor calórico (21 a 29 KJ/g) quando comparado com um triglicerídeo comum (38 KJ/g) (COZENTINO et al., 2020; FERREIRA-DIAS et al., 2013; HEIDOR et al., 2016) e também a melhor absorção destes pela via linfática, sendo indicados para pessoas com deficiências metabólicas, associadas a doenças como AIDS e fibrose cística (ABED et al., 2018; CABALLERO et al., 2014; LEE; TANG; LAI, 2012) .

A síntese enzimática dos triglicerídeos dietéticos é normalmente catalisada por lipases (glicerol éster hidrolases – EC 3.1.1.3), biocatalisadores que catalisam reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico. Existem muitas vantagens no uso de lipases para produção de triglicerídeos do tipo MLM, sendo as principais delas a quimio-regio e enantiosseletividade. Estas enzimas têm sido utilizadas em diversos segmentos industriais, como nos setores alimentício, farmacológico, oleoquímico, formulação de detergentes, entre outros (DE MIRANDA; MIRANDA; DE SOUZA, 2015; NALDER et al., 2018; PFLUCK et al., 2018).

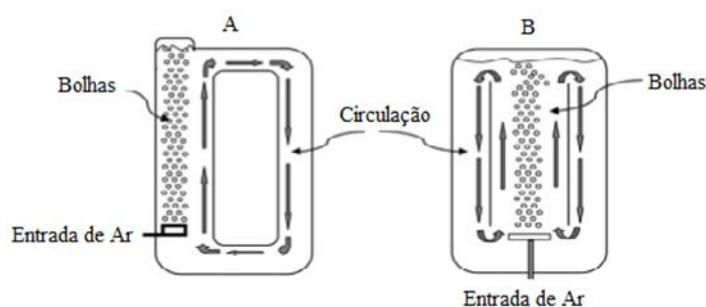
O emprego de lipases imobilizadas facilita a reutilização do biocatalizador no processo, possibilitando a redução do custo, maior controle da formação de produto, maior eficiência do processo, além de permitir que a enzima se torne mais estável e resistente a condições severas, com aplicação em uma ampla gama de pH e temperatura (CIPOLATTI et al., 2014).

A utilização de lipases imobilizadas em escala laboratorial tem sido realizado em diferentes configurações de reatores, sendo os mais utilizados para a produção dos lipídeos estruturados, os reatores de tanque agitado (batelada) (ABED et al., 2018; ARAÚJO et al., 2016; BASSAN et al., 2019; WANG et al., 2017). Porém, existem outras configurações de

reatores que podem ser exploradas para a síntese destes lipídeos, pois apresentam vantagens como baixo consumo de energia, baixa taxa de cilhamento e ótima mistura como os reatores do tipo *airlift* que são pouco explorados para sintetize dos triglicerídeos.

Os reatores do tipo *airlift* apesar de pouco explorados neste tipo de bioprocessos, são muito utilizados em reações biológicas para produção de biogás, em digestão anaeróbica e aeróbica e em fermentações tanto para produção de fármacos e antibióticos quanto para o tratamento e purificação de água (LECHOWSKA et al., 2019). Estes biorreatores pneumáticos destacam-se, pois não apresentam partes móveis, e a dispersão gás-líquido é realizada pelo próprio ar de entrada do aspensor (YANG et al., 2018). A fase líquida é movida de baixo para cima impulsionada pelas bolhas de ar ascendentes alimentadas no fundo do reator, retornando de cima para baixo por uma região distinta da região de subida, promovendo assim a recirculação do líquido (HEIJNEN et al., 1997). A Figura 1 apresenta os dois tipos de biorreator do tipo *airlift*.

Figura 1-Esquema dos diferentes tipos de reator *airlift*; (A) recirculação externa e (B) recirculação interna



Fonte: Al-Mashhadana; Wilkinson; Zimmerman (2015).

A escolha de um biorreator que apresente uma fluidodinâmica apropriada para a reação de interesse é essencial para a homogeneização do meio e consequentemente para sua eficiência na biotransformação, de forma a proporcionar um melhor rendimento (FU et al., 2003). A viscosidade do fluido, assim como, o tipo de agitação, temperatura, vazão de ar ou fluido, entre outros fatores, influenciam na qualidade da mistura, e é essencial que todos os pontos internos do biorreator apresentem o mesmo grau de mistura, de forma a evitar zonas de estagnação e promover uma boa homogeneização (YAKUBU-GUMERY, 2010). Para garantir que isto ocorra, é possível monitorar alguns parâmetros como o tempo de mistura, tempo de circulação e a retenção gasosa.

Alguns estudos da literatura investigam parâmetros hidrodinâmicos do biorreator *airlift* como o tempo de mistura. Gavrilescu et al., (2008) estudaram a hidrodinâmica de um *airlift*

de circulação externa com sistema trifásico e perceberam que variáveis operacionais como vazão de ar e carga de sólidos, afetam as características fluidodinâmicas do reator. Freitas et al., (1998) estudaram o comportamento hidrodinâmico de um biorreator *airlift* de tubos concêntricos trifásico de 60 L e perceberam que o tempo de mistura diminui com o aumento da vazão de ar e que em cargas acima de 20% (v/v) de sólidos essa diminuição também é observada.

Há poucos estudos na literatura sobre a utilização do *airlift* em reações enzimáticas, porém estes trabalhos comprovam a eficiência deste reator em bioprocessos com biocatalizadores. Teerapatsakul et al., (2017), mostrou o potencial do biorreator *airlift* ao utilizar lacase imobilizada para degradação de corantes. Chang et al., (1994) comprovou a eficiência deste reator ao comparar com biorreator convencional para realização da reação de penicilina V para ácido 6-aminopenicilânico e ácido fenoxiacético com penicilina acilase imobilizadas. Mojović et al., (1994) também evidenciou sua viabilidade ao mostrar como o seu escoamento é suave com enzimas imobilizadas ao estudar a interesterificação do óleo de palma.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi propor uma adaptação da configuração de um reator do tipo *airlift* para aplicação em reações enzimáticas, especialmente para a produção de triglicerídeos do tipo MLM a partir do óleo de semente de uva e ácido cáprico catalisada pela enzima lipase imobilizada Lipozyme RM IM[®].

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Óleos e gorduras

Óleos e gorduras são macromoléculas importantes presentes em diversos alimentos, elas são essenciais a dieta humana, uma vez que fornecem energia e auxiliam no transporte de agentes químicos orgânicos, tais como ácido graxos essenciais, vitaminas e hormônios. Porém, a ingestão excessiva de lipídeos pode causar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e obesidade (COZENTINO et al., 2020; RIOS et al., 2014).

Estas macromoléculas podem ser de origem vegetal ou animal e são basicamente compostas por triacilgliceróis (TAGs), que por sua vez são compostos por moléculas de glicerol (trialcool) ligadas a três cadeias de ácidos graxos formando um éster (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). Os ácidos graxos que compõem o TAG diferenciam-se pelo tamanho da cadeia, ausência, presença e posição das ligações duplas e por sua distribuição no triacilglicerol. Devido a essa variação de características confere propriedades físico-químicas, funcionais e nutricionais aos lipídeos (RIBEIRO, 2016; RIOS et al., 2014).

Os ácidos graxos são divididos em: ácidos graxos de cadeia curta que possuem até seis carbonos, de cadeia média que são aqueles que possuem entre seis a doze carbonos e os de cadeia longa que possuem mais de doze carbonos (HANSEN et al., 2011).

Há alguns ácidos graxos que não são sintetizados pelo organismo humano, e devem ser obtidos a partir da alimentação, são os denominados ácidos graxos essenciais (RODRÍGUEZ et al., 2016). Eles pertencem a série ômega-6 (n-6) que é representada pelo ácido linoleico (18:2 n-6), o qual é obtido a partir de óleos vegetais convencionais, e pela série ômega-3 (n-3) representada pelo ácido alfa linolênico (18:3n-3) que é encontrado principalmente em peixes (LOTTENBERG, 2009). A deficiência destes compostos pode gerar diversas doenças como fibrose cística, insuficiência pancreática e inflamações intestinais (PARRISH, 2017).

Atualmente, estudos demonstraram que alguns óleos possuem efeitos benéficos a saúde, uma vez que, contêm ácidos graxos essenciais e ácidos graxos insaturados, que auxiliam na prevenção do excesso de peso, redução do colesterol plasmático (VAFEIADOU et al., 2015), aumento da saciedade (MALJAARS et al., 2009). Tais conhecimentos estimulam o interesse no uso de óleos e gorduras modificados para o tratamento e prevenção de doenças (XIE; HUANG, 2006).

O desenvolvimento de lipídeos estruturados, óleos e gorduras modificados química ou enzimaticamente, com propriedades funcionais e nutricionais aperfeiçoadas vem chamando grande atenção de cientistas e tecnólogos. As propriedades e possíveis aplicações dos lipídeos

não dependem somente da sua composição, mas também da estrutura dos seus triacilgliceróis (TAGs) (SIVAKANTHAN; MADHUJITH, 2020).

2.2. Triglicerídeos de baixa caloria

A busca por processos para obtenção de óleos e gorduras com baixa caloria e com tecnologias desejáveis para o setor alimentício vem crescendo cada dia mais. Desta forma, destacam-se os lipídeos estruturados de baixo valor energético, também conhecidos como triglicerídeos dietéticos, tais moléculas sofrem modificações em sua estrutura afim de obter propriedades físicas e químicas diferentes da macromolécula original (BAI et al., 2013; CAO et al., 2013).

Os triglicerídeos dietéticos possuem valor calórico cerca de 2 a 4 kcal/g menor que os óleos e gorduras convencionais, pois apresentam menores quantidades de ácidos graxos de cadeia longa nas posições sn-1 e sn-3, o que promove o aumento da sua solubilidade. Estes lipídeos não são armazenados como gordura, pois os ácidos graxos de cadeia média são liberados dos TAGs durante a digestão, sendo absorvidos diretamente via circulação, desta forma são metabolizados tão rápidos quanto a glicose (BASSAN et al., 2019; FERREIRA-DIAS et al., 2013).

Os lipídeos são macromoléculas importantes para a dieta diária, uma vez que fornecem energia, ácidos graxos essenciais, vitaminas lipossolúveis e antioxidantes. A composição e posição de ácidos graxos determinam o valor nutricional dos triacilgliceróis. A composição destes triglicerídeos pode ser modificada para obtenção de lipídeos estruturados com propriedades nutricionais ou funcionais melhoradas (MOTA et al., 2020).

A macromolécula de triacilglicerol contém três moléculas de ácido-graxos, e a posição destes ácidos (sn-1, sn-2 e sn-3) permitem obter diferentes respostas do metabolismo humano (KANDA; NAMIKI; HARA, 2010; NUNES et al., 2012). Desta forma, os triglicerídeos dietéticos podem se organizar de diferentes formas: (i) SLS, um TAG com ácidos graxos de cadeia curta (S) nas posições sn-1 e sn-3 e de cadeia longa (L) na sn-2; (ii) MLM, um TAG com ácidos graxos de cadeia média (M) nas posições sn-1 e sn-3, e de cadeia longa L, na sn-2; e (iii) MMM, um TAG com ácidos de cadeia média em todas as posições (FERREIRA-DIAS et al., 2013; NUNES et al., 2012).

Dentre os triglicerídeos dietéticos, destacam-se os do tipo MLM que devido aos tamanhos de suas cadeias de ácidos graxos possui propriedades nutracêuticas, baixo valor energético (21-29 KJ/g) comparado aos triglicerídeos convencionais (38 KJ/g), melhor

solubilidade devido aos ácidos de cadeia média, metabolização e absorção mais rápida pelo fígado e pouca tendência de acumular no organismo (NUNES et al., 2011).

Alguns estudos mostraram que o consumo de ácidos graxos de cadeia média pode ser citotóxico as células cancerígenas como de mama, colón e pele (NARAYANA et al., 2017). Além disso, os lipídeos estruturados do tipo MLM podem prevenir doenças relacionadas com o consumo elevado de gordura, como a obesidade, o colesterol alto e as doenças cardiovasculares (ABED et al., 2018; MOREIRA et al., 2017).

Os triglicerídeos dietéticos podem ser sintetizados por via química ou enzimática. Os métodos químicos têm a vantagem de serem mais baratos quando comparado com os métodos enzimáticos, porém não possuem especificidade (MOTA et al., 2020). Os métodos de acidólise, acoólise ou interesterificação podem ser utilizados para esse tipo de modificação dependendo do tipo de substrato disponível (XU, 2003).

A síntese enzimática dos triglicerídeos dietéticos é normalmente catalisada por lipases (glicerol éster hidrolases – EC 3.1.1.3). A reação de acidólise, catalisada por essas enzimas, pode ser empregada para se introduzir ácidos de cadeia média como caprílico e cáprico nas posições sn-1 e sn-3 de diferentes óleos vegetais (XU, 2003), mantendo os ácidos graxos insaturados de cadeia longa na posição sn-2, tornando a sua absorção pelo organismo mais eficiente (WANG et al., 2012).

Uma grande variedade de óleos é utilizada para a produção destes triglicerídeos, sendo os principais, os óleos de soja, oliva e girassol (PALLA; CARRÌN; 2014; XIE; HUANG, 2006; ZHANG et al., 2020). Porém, ainda existem óleos pouco explorados nesta síntese, que possuem características físicas, químicas e nutricionais muito atrativas, sendo um deles o óleo de semente de uva.

2.3. Óleo de semente de uva

Só no ano de 2016 foram produzidos mais de 77 milhões de toneladas de uva (FAO STAT, 2018). Cerca de 80% da uva produzida mundialmente é utilizada na produção de vinhos, essa produção gera uma grande quantidade de resíduos (bagaços e sementes), onde as sementes representam cerca de 8 a 20% do total do resíduo gerado (DURANTE et al., 2017; MAIER et al., 2009).

A semente de uva é composta principalmente por carboidratos, proteínas e óleos que representam cerca de 14 a 17% do total de compostos (PRADO et al., 2012; ROCKENBACH et al., 2012). O óleo de semente de uva possui propriedades terapêuticas e nutricionais excepcionais, pois em sua composição há grandes quantidades de ácidos graxos insaturados,

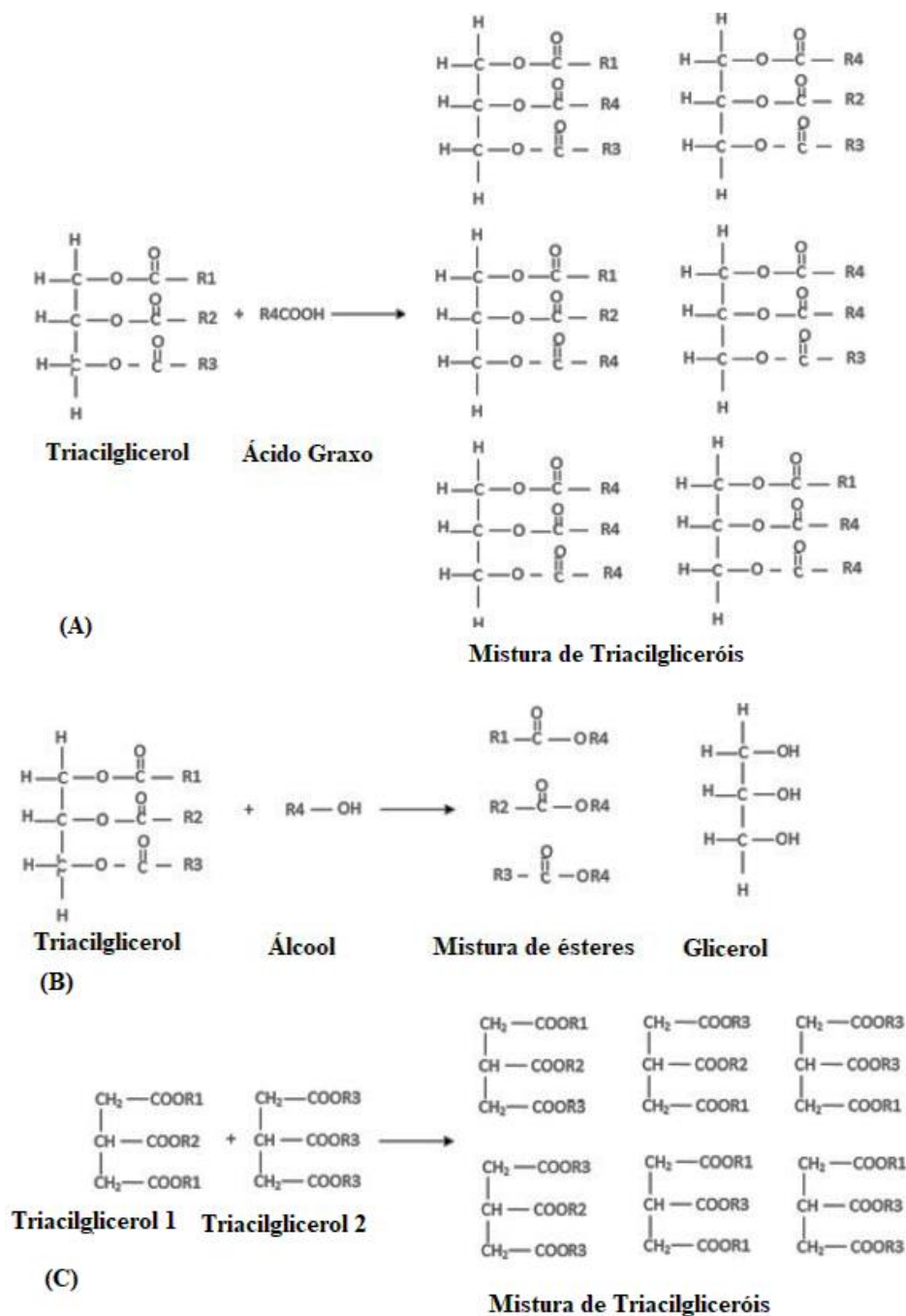
destacando-se o essencial linoleico que pode chegar a 78% como o demonstrado pela FAO (1999), além disso o óleo possui grandes quantidades de compostos antioxidantes, como o tocoferol, tocotrienol e o resveratrol, que estão associados a prevenção de doenças cardíacas e câncer (BASSAN, 2017; RAEISI et al., 2015).

2.4. Lipases

A síntese enzimática dos triglicerídeos dietéticos é normalmente catalisada por lipases (glicerol éster hidrolases – EC 3.1.1.3), biocatalisadores que catalisam reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico. Estas enzimas são amplamente encontradas na natureza, podem ser obtidas de fungos, leveduras, bactérias, animais ou vegetais (SIVAKANTHAN; MADHUJITH, 2020).

Estes biocatalizadores podem tanto realizar hidrólise em meio aquoso, quanto catalisar a reação inversa, sintetizando ésteres na presença de álcool e ácido carboxílico. Estes processos podem ser combinados em uma sequência lógica e dependendo dos reagentes empregados, reações de interesterificação: acidólise, alcoólise e transesterificação (NARWAL; GUPTA, 2013). A acidólise é a reação do ácido graxo com o TAG; neste processo ocorre a troca de radicais acil entre um éster e um ácido. A alcoólise é a reação entre o ácido graxo e o álcool, onde ocorre troca de um éster e um álcool. E por fim, na transesterificação, ocorre troca entre um éster e um outro éster (HEIDOR et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2004; SIVAKANTHAN; MADHUJITH, 2020). A Figura 2 mostra os três processos.

Figura 2- Processos de Interesterificação- (A) Processo de Acidólise; (B) Processo de Alcoólise; (C) Processo de Transesterificação



Fonte: Adaptação de Sivakanthan et al., (2020)

As lipases são quimio-regio e enantiosseletivas, estas características possibilitam a sua aplicação em sínteses com alto grau de especificidade (DE MIRANDA; MIRANDA; DE SOUZA, 2015; HORCHANI et al., 2012) . Estes biocatalisadores são responsáveis pela hidrólise total ou parcial do triacilglicerol (TAG), atuando sobre as ligações éster (DE CASTRO et al., 2004).

Conforme sua especificidade, estas enzimas podem ser divididas em: **Lipases não-específicas**, aquelas que catalisam as reações de hidrólise nas posições sn-1, sn-2 e sn3 do

triacilglicerol de forma aleatória, e **Lipases 1,3 específicas**: que são aquelas que atuam nas posições sn-1 e sn-3 do triacilglicerol, permitindo uma catálise mais controlada e obtenção de produtos diferentes aos obtidos pelas não específicas (CAMPOS, 2010; VAZ; CHOUPINA, 2012).

Estas enzimas têm sido utilizadas em diversos segmentos industriais, como nos setores alimentício, farmacológico, oleoquímico, formulação de detergentes, entre outros (DE MIRANDA; MIRANDA; DE SOUZA, 2015; NALDER et al., 2018; PFLUCK et al., 2018). Porém, a aplicação industrial de enzimas não é tão imediata, devido à instabilidade destes catalisadores frente aos processos industriais, nos quais, grande parte das vezes, utilizam de condições extremas de temperatura e pH para chegar ao produto final, sendo que estes dois (temperatura e pH) estão diretamente ligados a inativação do biocatalizador, impossibilitando seu reuso e consequentemente aumentando o custo do processo (LIESE; HILTERHAUS, 2013;). Desta forma o uso de derivados enzimáticos (enzimas imobilizadas) torna-se muito vantajoso, pois, há o aumento da estabilidade operacional da enzima, assim como sua reutilização, trazendo um melhor custo-benefício para a indústria (BARBOSA et al., 2015).

Existem diversos métodos para imobilização de enzimas, sendo que os mais utilizados são os métodos baseados na imobilização física como a adsorção e na imobilização química como por ligação covalente (BASSO; SERBAN, 2019).

2.5. Biorreatores enzimáticos

Biorreatores, também conhecidos como reatores bioquímicos, são equipamentos que utilizam microrganismos, fungos filamentosos, células animais, células vegetais e enzimas como biocatalisador para conversão de substratos em produtos. Este equipamento deve fornecer condições adequadas como temperatura, pH, transferência de oxigênio, mistura e concentração de substrato (MANDENIUS, 2016; WEUSTER-BOTZ, 1992).

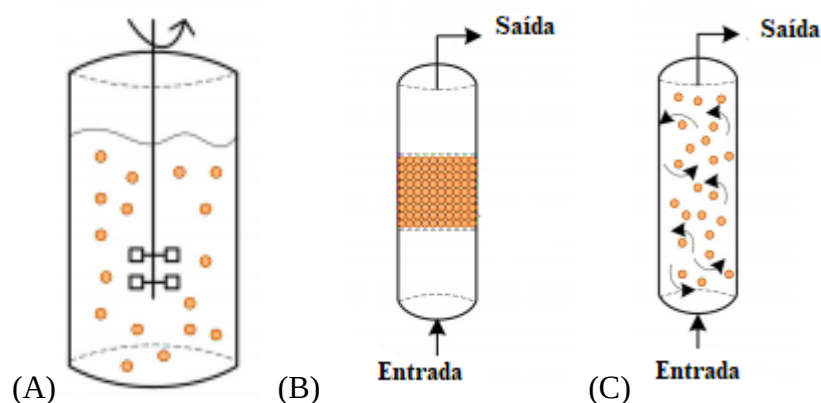
Um biorreator enzimático é definido como equipamento onde as enzimas são colocadas em contato com o substrato em condições de pH e temperatura pré-determinadas. Ao selecionar este tipo de biorreator, fatores como configuração da enzima, natureza do substrato, condições operacionais, cinética da reação, características da transferência de massa, entre outras condições devem ser analisados (CHRISTOPHER; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, 2014; PINO et al., 2018; POPPE et al., 2015). A partir destas características determina-se a forma que serão operados (modo contínuo, semicontínuo (batelada alimentada) ou descontínuo) e as características do fluxo.

As principais configurações de reatores descritos na literatura que empregam enzimas imobilizadas são os tipos tanque agitado batelada ou contínuo, leito fluidizado e leito fixo (POPPE et al., 2015). Reatores de tanque agitado são considerados reatores com configuração mais simples, o contato da enzima e do substrato ocorre a partir da agitação mecânica (Figura 3-A). Eles são vantajosos devido ao alto grau de dispersão do substrato e pela reação ser de fácil controle, porém possuem desvantagens como cisalhamento do suporte e tempo gasto em limpeza. Normalmente necessita-se da inclusão de um dispositivo de retenção do biocatalizador para que a reação ocorra em modo contínuo (CHRISTOPHER; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, 2014; LIESE; HILTERHAUS, 2013; POPPE et al., 2015).

Reatores de leito fixo são os mais utilizados na catálise enzimática, são caracterizados por uma coluna cilíndrica, onde a enzima imobilizada permanece estática no leito, fixadas por anteparos nas partes inferior e superior e o substrato flui de maneira ascendente ou descendente, podendo ser líquido ou gasoso (Figura 3-B)(TRAN; CHEN; CHANG, 2016). Este reator possui as vantagens de simples operação, baixa tensão de cisalhamento e não necessita de separação na saída do reator, porém possui desvantagens como obstrução do leito, formação de caminhos preferenciais e limitações de transferência de massa e calor (CHRISTOPHER; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, 2014; MENDES et al., 2011).

Reatores de leito fluidizado caracterizam-se pela passagem do próprio fluido por um leito de partículas sólidas mantendo-as em suspensão, o fluido deve possuir uma velocidade ascendente adequada para que isto ocorra (MIRANDA, 2014). As vantagens são que esse tipo de biorreator possui ótima mistura reacional, evita danos aos suportes de imobilização, problemas com entupimento (FERNANDES; ROSELL, 2010; KOSSEVA et al., 2009). A Figura 3 apresenta os três tipos de reatores citados.

Figura 3- Tipos de biorreatores: (A) Tanque Agitado; (B) Leito Fixo e (C) Leito Fluidizado



Fonte: Adaptação de (POPPE et al., 2015)

Reações enzimáticas são realizadas geralmente nas quatro configurações de reatores citadas, porém os mais utilizados para a produção dos lipídeos estruturados são os reatores de tanque agitado (batelada), conforme apresentado na Tabela 1.

Apesar do grande uso destes reatores para a produção dos lipídeos estruturados, existem outras configurações que podem ser utilizadas, pois apresentam algumas vantagens. Os biorreatores pneumáticos do tipo *airlift*, mostram-se como opção, uma vez que são pouco explorados para sintetize dos triglicerídeos dietéticos.

Tabela 1 -Produção de lipídeos estruturados através da reação de acidólise

Lipase	Óleo: Ácido Graxo	Tipo de Lipídeo Estruturado	Configuração do Reator	Referência
Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	Óleo de girassol: C16:0 e C18:0	Triglicerídeo rico em ácidos palmítico e esteárico	Tanque agitado (batelada)	(PALLA;CARRIN; 2014,)
Lipozyme RM IM [®] , Lipozyme TL IM, Novozym 435 [®]	Óleo de semente de uva: C8:0 e C10:0	MLM	Tanque agitado (batelada)	(BASSAN et al., 2019)
Lipozyme TL IM [®] e Lipozyme RM IM [®]	Óleo de abacate: C8:0 e C10:0	MLM	Tanque agitado (batelada)	(CABALLERO et al., 2014)
Lipases de <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus japonicus</i> imobilizadas em Amberlite	Azeite de oliva, óleos de soja e sardinha: C14:0, C16:0, C16:1, C18:0 e C18:1	TAGs contendo ácido eicosapentaenoico e ácido docosaheptaenoico	Tanque agitado (batelada)	(ARAÚJO et al., 2016)
Lipozyme RM IM [®] , Lipozyme TL IM [®] e NS40086	Manteiga de cacau: C12:0, C14:0, C16:0, C16:1, C18:1, C18:2 e C18:3	1,3-diestearoil-2-oleoilglicerol	Tanque agitado (batelada)	(WANG et al., 2017)
Lipozyme RM IM [®] , Lipozyme TL IM [®] , Novozym 435 e Lipozyme 435 [®]	Óleo microbiano rico em ácido araquidônico de <i>Mortierella alpina</i> : C8:0	MLM	Tanque agitado (batelada)	(ABED et al., 2018)

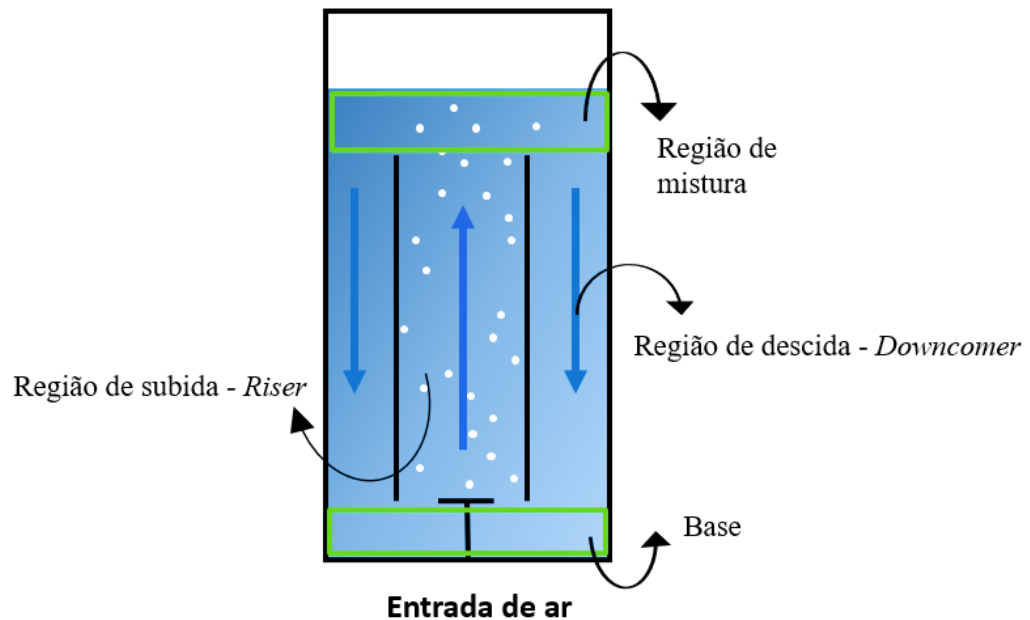
2.5.1. Biorreatores pneumáticos do tipo *airlift*

Biorreatores cuja agitação é realizada por injeção de ar por um aspersor localizado em sua base são denominados biorreatores pneumáticos, eles apresentam diferentes aplicações baseadas na transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida em reações enzimáticas, em cultivos aeróbicos e anaeróbicos, onde a fase gasosa inerte é utilizada para homogeneização do meio reacional (BADINO, 2016; CERRI, 2009; KOUZBOUR et al., 2020). Dentre os reatores pneumático há os tipos *airlift* e o coluna de bolhas.

Os reatores pneumáticos do tipo *airlift* são pouco explorados em reações utilizando enzimas, sendo muito utilizados em reações biológicas, como cultura de células animais, em cultivos tanto para produção de fármacos e antibióticos, quanto para o tratamento e purificação de água (BADINO, 2016; MASHHADANI; WILKINSON; ZIMMERMAN, 2015). Estes biorreatores vêm se destacando na biotecnologia e em processos multifásicos (gás-líquido-sólido), pois não apresentam partes móveis, facilidade no aumento de escala, menor taxa de cisalhamento, menores gastos de energia e a dispersão gás-líquido é realizada pelo próprio ar de entrada do aspersor (MOUDOUD et al., 2018; YANG et al., 2018).

Os biorreatores *airlift* são caracterizados por uma região aspergida por gás denominada de região de subida do meio reacional (*riser*) e uma região de descida (*downcomer*) que estão interligadas pela região da base (*bottom*) e por uma região de mistura (*degassing zone ou gas-liquid separator*) localizada no topo do reator, onde ocorre desprendimento total ou parcial da fase gasosa retida na fase líquida (ESPERANÇA, 2018). As diferenças entre as densidades dessas regiões, devido as diferentes retenções gasosas, resultam na circulação do meio reacional com escoamentos ascendente na região do *riser* e descendente na região do *downcomer* (CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, 1988; YANG et al., 2018; ZIEGENHEIN et al., 2016). Sendo assim, estes reatores apresentam uma movimentação cíclica do fluido, definida através de peças e dispositivos internos construídos para este propósito (SCHMIDELL, FACCIOTTI, M, 2001). Portanto, as regiões de escoamento do *airlift* apresentam diferentes pressões, logo, retenções gasosas distintas, sendo assim, estas diferenças funcionam como força motriz para a circulação do meio reacional. A Figura 4 mostra um desenho esquemático com as regiões de descida e subida do biorreator do tipo *airlift* de tubos concêntricos convencional.

Figura 4- Desenho esquemático de um biorreator *airlift* com as regiões de subida (*riser*) e descida (*downcomer*)

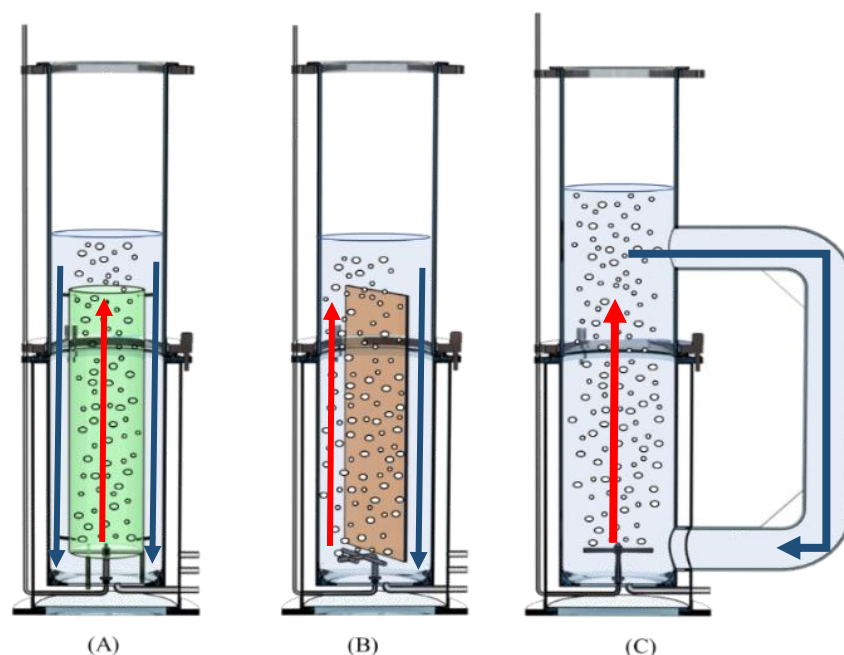


Fonte: Acervo pessoal do autor

Existe uma subdivisão dos modelos de reatores *airlift*, baseada no tipo de circulação, interna ou externa (CHISTI, 1989; SIEGEL; ROBINSON, 1992). Nos de circulação interna as seções *riser* e *downcomer* encontram-se no mesmo compartimento, separadas por um anteparo. Quando o anteparo é um cilindro ou um tubo, o reator é chamado de *airlift* de cilindros concêntricos, já quando uma placa é usada para separar as regiões de escoamento, o biorreator é denominado *airlift split-cylinder* (BADINO et al., 2016; MENDES, 2016).

Os reatores *airlift* de circulação externa possuem as regiões *riser* e *downcomer* em tubos verticais diferentes, conectados por seções horizontais próximos ao topo e à base da coluna do biorreator. A Figura 5 mostra os diferentes tipos de *airlift* (BANNARI; BANNARI; SELMA; PROUXL, 2011).

Figura 5. Diferentes tipos de reator *airlift*, onde a seta vermelha apresenta a região de subida e a seta azul a região de descida. (A) *airlift* de tubos concêntricos (B) *airlift split-cylinder* e (C) *airlift* de circulação externa.



Fonte: Acervo do grupo de pesquisa

De acordo com Esperança (2018) as regiões de escoamento de um biorreator do tipo *airlift* de circulação interna são definidos por alguns parâmetros geométricos existentes nestes equipamentos. Variáveis como razão entre áreas de escoamento (A_S/A_D), altura do líquido estático no biorreator, vão livre da base (h_B) (distância entre as partes inferiores do tubo interno e o fundo do biorreator), vão livre no topo (h_T) (distância entre as partes superiores do tubo interno e o nível do líquido estático no biorreator) e modelo de aspersores de ar afetam os parâmetros hidrodinâmicos de um biorreator *airlift*. Porém, essas relações não foram claramente definidas para serem empregadas no projeto e ampliação de escala.

De acordo com Merchuk et al. (1996) as propriedades físicas dos fluidos como viscosidade e a densidade, e variáveis operacionais como vazão volumétrica de ar ou velocidade superficial do ar no *riser* também afetam o desempenho hidrodinâmico em biorreatores do tipo *airlift*.

Fatores como a capacidade de proporcionar elevada área interfacial, altos coeficientes de transferência de massa associados com baixo consumo de energia, facilidade de aumento de escala, padrões de escoamento bem definidos, menores tensões de cisalhamento, excelente capacidade de mistura e possibilidade de operação asséptica prolongada tornam os

biorreatores *airlift* de circulação interna excelente alternativa aos reatores convencionais de tanque agitado e areado (CHISTI, 1989; ESPERANÇA, 2018).

O biorreator *airlift* vem se mostrando muito eficiente para reações enzimáticas apesar de poucos estudos encontrados na literatura. Teerapatsakul et al. (2017) utilizaram biorreator *airlift* de 4 litros para degradação de corantes com lacasse imobilizada, operado em bateladas repetidas. A melhor condição de aeração do biorreator para a reação foi de 4 L.min⁻¹ sendo que, condições mais baixas ou altas de aeração afetaram negativamente a velocidade de reação e a eficiência da enzima com o tempo. O biorreator apresentou ótimas condições para que a reação ocorresse e mostrou-se muito simples para o aumento de escala.

Chang et al. (1994) compararam biorreator convencional e biorreator *airlift* para reação de penicilina V para ácido 6-aminopenicilânico e ácido fenoxiacético com enzimas imobilizadas (penicilina acilase). O *airlift* mostrou-se vantajoso frente ao convencional, pois manteve a enzima estável por mais tempo, apresentou menor fragmentação do derivado enzimático durante a reação, o que é muito favorável para a etapa de purificação, e utilizou menor potência por unidade volume para realizar a reação.

Mojović et al., (1994) estudaram a interesterificação do óleo de palma em biorreator *airlift*. Os resultados mostraram que a forma de escoamento do *airlift* foi vantajoso para a reação, pois não houve fragmentação da enzima imobilizada, e uma melhor mistura, o que resultou em maior produtividade na reação desejada.

Parâmetros como velocidade e tempo de circulação, tempo de mistura, retenção gasosa, coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) e velocidade de cisalhamento devem ser analisados como critérios de desempenho de biorreatores pneumáticos (CHISTI, 1989), para melhor entendimento da hidrodinâmica do biorreator.

2.5.2. Avaliação hidrodinâmica de biorreatores *airlift*

Alguns parâmetros relevantes para o presente estudo relacionados com o projeto e desempenho do reator *airlift* serão apresentados a seguir.

2.5.2.1. Velocidade superficial do gás

A velocidade superficial do gás na região de subida (U_{Gs}) é a única variável de operação disponível em sistemas *airlift*. Trata-se da razão entre a vazão volumétrica de alimentação do gás (Q_G) em metros cúbicos por segundo e a área da seção transversal da região de subida (A_S) em metros quadrado. Ela é representada pela Equação 1:

$$U_{GS} = \frac{Q_G}{A_S} \quad \text{Equação (1)}$$

2.5.2.2. Tempo de mistura

Para que ocorra uma reação enzimática rápida e homogênea é essencial que o reator tenha uma ótima mistura, portanto este parâmetro é muito importante. O tempo de mistura consiste no tempo necessário (t_m) para que ocorra completa homogeneização do meio dentro do reator (CHANG et al., 1994; CHISTI; MOO-YOUNG, 1988).

De acordo com Tao et al. (2020) o tempo de mistura, t_m , é um parâmetro global para descrever o grau de mistura. Devido à sua alta sensibilidade em relação ao local onde o traçador é injetado este parâmetro é muito difícil de ser correlacionado (CHISTI, 1989). A sua detecção se dá por ensaio tipo pulso, quando o valor da variável estudada se estabiliza, o tempo de mistura é determinado. Este parâmetro é afetado pela mistura axial e radial, e pelos efeitos do escoamento. Há diversas maneiras de obter o tempo de mistura, através de traçadores onde acompanha-se variações de temperatura, condutividade, pH e absorbância (FU et al., 2003).

Para melhora da mistura há alguns trabalhos na literatura que propõe modificações no tubo interno de biorreatores do tipo *airlift*. SÄRKELÄ et al. (2019), estudaram o biorreator *airlift* com adição de tubos helicoidais acoplados ao *riser* ou *downcomer*, ou ambos, que atuavam como promotores de fluxo e aspersores de gás adicionais e verificou que esses helicoides geraram bolhas finas pulverizadas, melhorando o desempenho da transferência de oxigênio. Verificaram também que a introdução de ar através do promotor de fluxo helicoidal na zona de descida diminuiu o tempo de mistura.

Zheng et al. (2018), avaliaram a instalação de placas helicoidais no biorreator *airlift*, foram fixados nove helicoides com diferentes combinações geométricas no *riser*, o intervalo da velocidade superficial do gás (U_{GR}) utilizado foi de 0,009 - 0,09 m/s. Concluíram que esse promotor de escoamento intensificou a retenção gasosa, aumentou a mistura circunferencial do fluido, enquanto o tempo total da mistura diminuiu.

2.6. Sistemas trifásicos em biorreatores *airlift*

Reatores pneumáticos com misturas trifásicas são muito utilizados em indústrias químicas e bioquímicas, mostram-se vantajosos por promoverem contato entre as fases líquida, sólida e gasosa. Os biorreatores *airlift* se apresentam como alternativa para reações

trifásicas com partículas sólidas suspensas. Em comparação ao coluna de bolhas, a velocidade do gás necessária para a suspensão completa é bem menor (HECK; ONKEN, 1988; HUANG et al., 2017; LUO et al., 2011).

Outro ponto que chama a atenção é o fato dos biorreatores do tipo *airlift* possuírem taxas de cisalhamentos menores que os sistemas agitados mecanicamente e até mesmo em relação a outros reatores pneumáticos, o que torna atraente para bioprocessos com partículas sensíveis ao cisalhamento, tais como células e enzimas imobilizadas (HUANG et al., 2012).

Em processos com alta densidade celular, por exemplo, as cargas de sólidos podem chegar de 30 a 40% do volume total do reator para que seja possível uma alta conversão em um bioprocessos contínuo. Essa massa de partículas pode ser suspensa por um *airlift* utilizando menor energia em comparação à coluna de bolhas. Essa vantagem ocorre devido a existência de uma circulação de líquido dentro do reator resultante da diferença de densidades entre as seções *riser* e *downcomer* (HECK; ONKEN, 1988).

Para que ocorra uma boa homogeneização do meio a velocidade de circulação do líquido deve ser maior que a velocidade das partículas. Fatores como geometria do reator (altura, diâmetro, dimensões do *riser*), vazão de ar e carga de sólidos determinam como será a mistura e consequentemente a suspensão dos sólidos. Alguns estudos descobriram que a presença de partículas sólidas pode levar a diminuição do acúmulo de gás e da velocidade do líquido no *airlift* de circulação interna, e que a velocidade crítica do gás necessária para a circulação das partículas aumentaria com o aumento da carga de sólidos (HUANG et al., 2010; YANG et al., 2018). As características dos sólidos como, densidade, forma, tamanho, molhabilidade e concentração influenciam nos efeitos causados na hidrodinâmica do biorreator (TAO et al., 2020).

A velocidade de circulação do líquido é um importante parâmetro no projeto do reator *airlift*, pois influencia na mistura, na recirculação das bolhas, na eficiência da suspensão de sólidos e distribuição dos gases e dos sólidos. Este parâmetro é influenciado pela magnitude da força motriz para circulação do líquido, que é afetado pela intensidade da penetração das bolhas na seção *downcomer* (CHISTI, 1989). A separação da bolha da fase líquida pode ser manipulada pelos parâmetros geométricos: razão da área da seção transversal de *downcomer* para *riser* (A_S / A_D) e geometria da zona do separador gás-líquido.

A presença de sólidos em suspensão diminui a força motriz para circulação do meio em relação a sistemas bifásicos (líquido-gás), o que provoca alteração nas densidades médias no *riser* e *downcomer*. De acordo com Heijnen et al., (1997) para um sistema trifásico em estados estacionários existe uma taxa mínima de vazão de ar para exercer a circulação do

meio. Na prática esta taxa mínima é ainda maior que o valor mínimo teórico, como resultado de flutuações na velocidade de circulação devido à interação entre variações dinâmicas em densidades médias no *riser* e *downcomer* (VAN DER LANS, 1985). Portanto, para colocar os sólidos em suspensão no início do processo, a taxa de fluxo do gás aplicado deve ser maior que este valor crítico. Além disso as partículas sedimentadas formam uma resistência de fluxo extra, necessitando de uma taxa de fluxo muito maior (HECK; ONCKEN, 1987).

Embora a suspensão dependa da geometria do reator e da carga de sólidos, em geral a taxa mínima de fornecimento de gás (TMG) para o arraste das bolhas para o *downcomer* está acima da TMG para o regime de suspensão de sólidos completos. Nesse caso os reatores *airlift* com tubos internos sem restrições ao transporte de bolhas para o *downcomer* pode ser regido por três regimes de fluxo de gás, os quais podem ser distinguidos em comparação com os regimes de fluxo relatados para sistemas de duas fases (CHISTI, 1989). Com base em observações em diferentes escalas, em sistemas trifásicos foram observados os seguintes regimes de circulação:

Regime I: Sem arrastamento de gás

Ocorre em baixas velocidades do gás quando a velocidade de circulação do líquido é insuficiente para arrastar as bolhas para o *downcomer*. A velocidade do líquido na descida não é maior que a velocidade de subida da bolha no *riser*.

Regime II: Entrada de gás, mas sem recirculação de gás

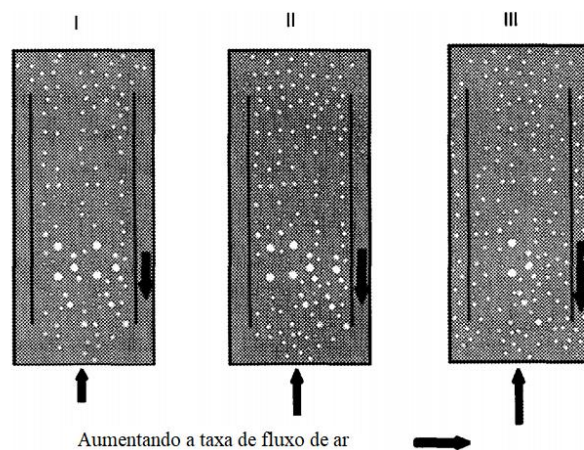
Quando a velocidade real do líquido no *downcomer* torna-se igual a velocidade de descida das bolhas, o ar é arrastado para o fundo. As vezes observa-se uma zona de superior e uma zona inferior de bolhas, estas bolhas parecem permanecer estacionárias ou o fluxo descendente é igual ao fluxo ascendente. Uma taxa menor de recirculação do gás é observada, como resultado do arrastamento de pequenas bolhas para o *riser* (CHISTI, 1989; LIVINGSTON; ZHANG, 1993). A suspensão de sólidos está comumente presente, mas nem sempre.

Regime III: Circulação completa

Todas as bolhas de ar que são arrastadas para o *downcomer* são carregadas até o *riser* novamente. A velocidade do líquido na descida é significativamente maior que a velocidade das bolhas, o que leva a uma grande taxa de fluxo de gás para baixo do *downcomer*. Portanto a taxa de fluxo na subida, combinado com o ar aspergido e o ar recirculado é significativamente maior do que o gás que sai do aspersor. Neste caso a suspensão completa de sólidos é comum, mas a suspensão incompleta não pode ser excluída.

A Figura 6 apresenta os três regimes de fluxo de gás em um sistema completo com suspensão de sólidos.

Figura 6 - Regimes de fluxo de gás em uma mistura com suspensão de sólidos: I: Regime com baixa velocidade do gás: sem transporte de gás. II Regime de transição: arrastamento de gás para o *downcomer*, mas sem recirculação de gás. III. Regime de circulação de gás completa.



Fonte: Heijnen et al., (1997)

Heijnen et al., (1997) estudaram um modelo hidrodinâmico simples que descreve analiticamente e explicitamente a circulação de líquido, a retenção de gás e o efeito dos sólidos na circulação de líquidos para o regime III. O modelo foi comparado com dados de reatores em escala piloto ($0,4 \text{ m}^3$) e escala real (300 m^3), operando apenas no regime III.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente projeto tem como objetivo a adaptação do reator do tipo *airlift* usualmente empregado em cultivo microbiano para utilização em reações enzimáticas, empregando a enzima imobilizada Lipozyme RM IM[®] para catalisar a reação de acidólise do óleo de semente de uva para produção de triglicerídeos dietéticos do tipo MLM.

3.2. Objetivos Específicos

- Adaptação do reator do tipo *airlift* de tubos concêntricos e caracterização hidrodinâmica das diferentes formas e operação;
- Reações de acidólise em reator do tipo *airlift*: determinação da velocidade mínima de suspensão e avaliação da influência da vazão de ar;
- Operação do biorreator e otimização das condições reacionais (carga de enzimas, vazão de ar, tempo de reação).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Biocatalisadores

Os experimentos foram efetuados empregando Lipozyme RM IM[®] (*Rhizomucor miehei* lipase), gentilmente cedida pela empresa Novozyme A/S (Bagsvaerd, Denmark). A Tabela 2 apresenta algumas especificações técnicas e a Figura 7 apresneta a enzima imobilizada[®].

Tabela 2-Especificações técnicas da Lipozyme RM IM[®]

Suporte de imobilização	Resina acrílica de troca iônica (Poliestireno-divinil-benzeno)
Porosidade	Macroporosa
Método de imobilização	Adsorção Hidrofóbica
Densidade cristalina	1,8429 ± 0,1221 g/mL
Tamanho das partículas	300 a 1000µm

Figura 7- Lipozyme RM IM[®]



Fonte: Acervo pessoal do autor

4.1.2. Reagentes

As matérias primas utilizadas foram o óleo de semente de uva (Distriol, São Paulo), ácido cáprico - C10 (Merck, Darmstadt, Alemanha), azeite de oliva comercial, álcool etílico comercial, acetona, hexano). Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

Selecionou-se o óleo de semente de uva para a síntese dos triglicerídeos do tipo MLM no presente projeto, pois trata-se de um óleo rico nutricionalmente que provém do reaproveitamento de resíduos gerados pela indústria do vinho e por ser pouco explorado neste tipo de síntese. A Tabela 3 apresenta algumas especificações do óleo de semente de uva e do ácido cáprico.

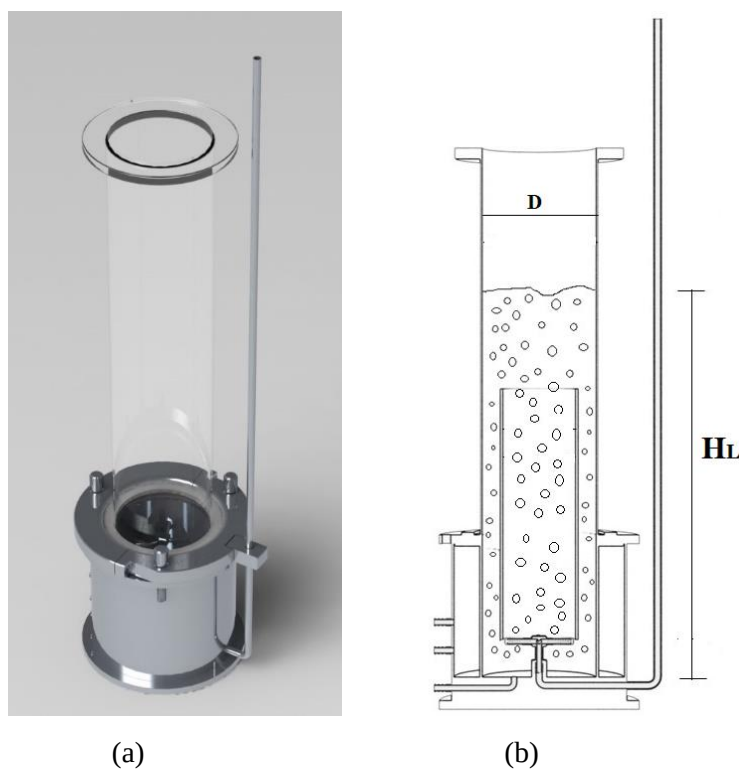
Tabela 3- Parâmetros físico-químicos do óleo de semente de uva e do ácido cáprico utilizado.

	Densidade (kg.m ⁻³)	Viscosidade (cP)	Ponto de fusão (°C)	Acidez (mg. KOH.g ⁻¹)
Óleo de semente de uva	920	1,27	—	0,225 ± 0,021
Ácido cáprico (C10)	893	—	31,6	—

4.1.3. Biorreator

O biorreator utilizado é constituído por um cilindro externo confeccionado de vidro borocilicato transparente, acoplado a uma base de aço inoxidável e um cilindro interno do mesmo material (Figura 8). Possui um volume útil de 2 litros, onde a altura do líquido (HL) é 308,86 mm e o diâmetro interno do reator (D) é 90,80 mm e foi operado com um aspersor tipo cruzeta.

Figura 8- Airlift de tubos concêntricos. a) reator sem o tubo interno b) dimensões do airlift



Fonte: acervo do grupo de pesquisa

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Nova configuração do biorreator do tipo *airlift*

4.2.1.1. Desenvolvimento das novas peças

Com a finalidade de diminuir o volume útil do reator para 1 litro devido a limitação econômica em relação aos reagentes utilizados e objetivando a adaptação do *airlift* usualmente aplicado em cultivos microbianos para realização de reações enzimáticas, especialmente para a acidólise do óleo de semente de uva com enzimas imobilizadas, algumas peças (fundo do reator e tubo interno) foram modificadas, e confeccionadas a partir do *software* de modelagem Autodesk AutoCAD 2020 e impressas em PLA (ácido polilático) com o auxílio de uma impressora 3D (MakerBot Replicator+, modelo:PABH65), apresentada na Figura 9.

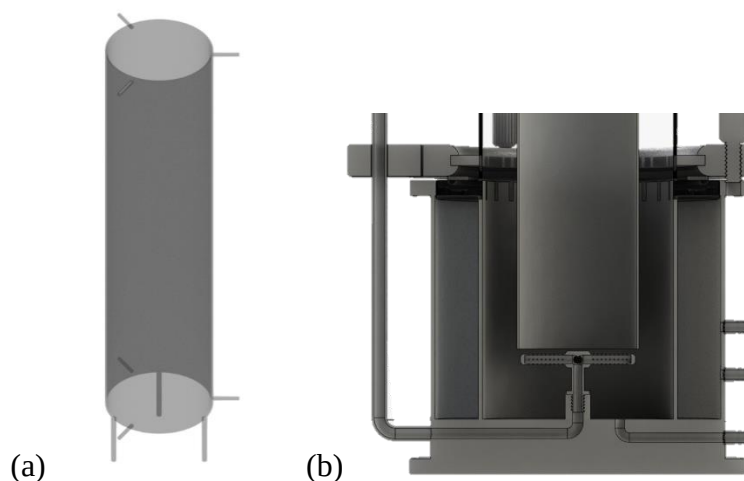
Figura 9- Impressora 3D (MakerBot Replicator+, modelo:PABH65) utilizada.



Fonte: Acervo do grupo de pesquisa

A Figura 10 apresenta o tubo interno padrão e o fundo de um biorreator do tipo *airlift* convencional.

Figura 10- Peças que foram modificadas - (A)Tubo interno padrão e (B) Corte transversal do fundo do reator do tipo *airlift* padrão



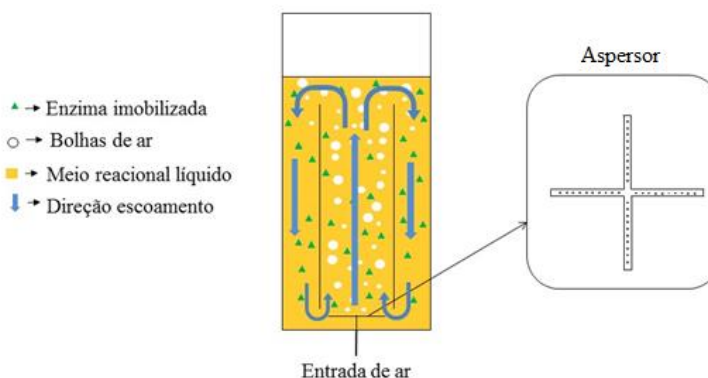
Fonte: Acervo do grupo de pesquisa

O fundo do reator e o tubo interno tiveram que ser modificados para mitigar problemas com a decantação das partículas sólidas (enzimas imobilizadas) e circulação do meio observados em testes preliminares utilizando o biorreator *airlift* padrão.

4.2.1.2. Operação do biorreator *airlift*

O biorreator foi operado com meio trifásico (óleo, ar comprimido e enzimas imobilizadas), a homogeneização foi realizada pela fase gasosa, a vazão de ar operacional foi determinada por testes hidrodinâmicos do sistema. O gás utilizado foi o ar, o qual foi inserido no tubo interno que causou a circulação forçada do óleo e enzima imobilizada. A Figura 11 apresenta o desenho esquemático do biorreator *airlift* para reação enzimática.

Figura 11. Desenho esquemático de um biorreator airlift para reações enzimáticas



Fonte: Acervo do grupo de pesquisa

4.2.1.3. Hidrodinâmica

4.2.1.3.1. Determinação do tempo de mistura na nova configuração do biorreator *airlift*

Realizou-se ensaios tipo pulso de temperatura com auxílio de um termopar (programado para Arduino) contendo 3 sensores de temperatura. Os sensores foram posicionados em alturas e regiões diferentes dentro do biorreator, permitindo a aferição da temperatura ao longo de todo o reator. O tempo foi aferido a partir da injeção do pulso até o momento em que as temperaturas dos 3 sensores se igualaram. Para isso, aqueceram-se 60 ml de óleo para o pulso de forma que a temperatura entre o óleo presente dentro do reator e o óleo do pulso apresentassem uma variação de temperatura de 50°C. Para a manutenção da temperatura do óleo dentro do biorreator, um banho térmico com água a 45°C foi acoplado à jaqueta térmica do reator, permitindo a recirculação da água.

O experimento foi realizado em triplicata variando a vazão de ar em 1, 2 e 3 vvm e a carga de sólidos (suporte de imobilização da enzima) em 1, 2 e 3% (volume de enzima / volume de substrato). As relações utilizadas foram determinadas a partir de estudos anteriores do grupo de pesquisa, que observaram que em vazões menores que 1 vvm não ocorria suspensão eficiente dos sólidos e que acima de 4 vvm ocorria alta coalescência das bolhas e ao utilizar carga de enzimas acima de 5% não fluidizaram eficientemente as partículas sólidas.

Os testes de mistura foram realizados com os mesmos parâmetros utilizados nas reações de acidólise do óleo de semente de uva. Foram usadas uma mistura de óleo de semente de uva e ácido cáprico com razão molar de 1:3 e as partículas sólidas utilizadas foram os suportes de imobilização da Lipozyme RM IM. A temperatura durante o experimento foi mantida a 45°C.

4.2.1.3.2. Determinação da velocidade superficial do gás (U_{GS})

A velocidade do gás na região de subida (U_{GS}) foi obtida a partir da Equação 1.

$$U_{GS} = \frac{Q_G}{A_S} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

Q_G : vazão volumétrica de alimentação do gás ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$);

A_S : área da seção transversal da região de subida (m^2).

4.2.2. Cálculo de Potência

O consumo de potência foi calculado assumindo a expansão isotérmica das bolhas de gás desde os orifícios do aspersor até a superfície do fluido (CHISTI, 1989), usando a Equação 2.

$$P = Q_g \cdot P_a \cdot \ln\left(1 + \frac{\rho_d \cdot g \cdot h_d}{P_a}\right) \text{ Equação (2)}$$

Onde:

Q_g é a vazão volumétrica do gás ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$);

P_a é a pressão atmosférica (Pa);

ρ_d é a densidade da mistura (líquidos (razão 1:3 de óleo de semente de uva e ácido cáprico) e sólidos (enzimas imobilizadas) ($\text{kg} \cdot \text{m}^3$);

g é a aceleração gravitacional ($\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$);

h_d é a altura de dispersão gás-líquido (m).

Sendo $\rho_d = 918,8 \text{ kg} \cdot \text{m}^3$ para dispersão com 1% de sólidos, $\rho_d = 936,6 \text{ kg} \cdot \text{m}^3$ para dispersão com 2% de sólidos e $\rho_d = 954,04 \text{ kg} \cdot \text{m}^3$ para dispersão com 3% de sólidos. Para cada mistura realizou-se a média ponderada da densidade dos líquidos e do sólido, a densidade do ar não foi considerada pois, como o fluido é viscoso a retenção gasosa é pequena, logo não irá interferir no valor da densidade.

4.2.3. Viscosidade

As viscosidades do óleo de semente de uva e dos meios reacionais (óleo de semente de uva, ácido cáprico e triglicerídeos dietéticos) após 48 horas de síntese foram obtidos utilizando um reômetro (Brookfield ® DV-III *ULTRA*) mostrado na Figura 12. Com os resultados obtidos pelo reômetro construiu-se gráficos da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para determinação das viscosidades e a partir do coeficiente angular. Todos os testes foram realizados a 45°C que é a temperatura utilizada na síntese dos triglicerídeos dietéticos.

Figura 12- Reômetro Brookfield ® DV-III ULTRA.



Fonte: Acervo pessoal do autor

4.2.4. Propriedade catalítica da enzima imobilizada Lipozyme RM IM

Para o cálculo da constante de Michaelis-Menten (K_m) foram preparados sistemas reacionais contendo ácidos graxos totais em concentrações variando entre 186-1302 mM, obtidos a partir de emulsões preparadas em diferentes proporções de azeite de oliva (5 – 70%) e solução aquosa de goma arábica (7% m/v). As velocidades iniciais das reações de hidrólise catalisadas pelas lipases imobilizadas foram determinadas de acordo com item 4.2.6. As constantes cinéticas K_m e V_{max} foram determinadas por regressão linear, empregando-se a equação de Lineweaver-Burk.

4.2.5. Síntese de triglicerídeos dietéticos (MLM)

As reações de acidólise do óleo de semente de uva foram realizadas no biorreator *airlift* de tubos concêntricos operando em modo batelada. A razão molar óleo de semente de uva: ácido cáprico foi 1:3, e as reações foram conduzidas na temperatura de 45°C no período de 48h. Estas condições (razão molar e temperatura) para esta síntese, foram selecionadas de acordo com os estudos de Bassan et al., (2019) que mostraram que elas são ideais para esta reação em reatores descontínuos. As amostras periódicas foram coletadas e analisadas com relação ao índice de peróxido e ao grau de incorporação do ácido graxo.

4.2.6. Determinação de atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica foi determinada pelo método de retrotitulação, empregando-se emulsão de azeite de oliva (PAULA, 2012). Tal emulsão foi preparada com 50% (m/m) de

azeite, 50% (m/m) de água destilada e 7% (m/m) de goma arábica em relação à massa de água. A hidrólise ocorreu em banho-maria com agitação suave, a 37°C por 5 minutos. A reação foi paralisada adicionando-se 10 mL de solução de etanol, acetona e água, 1:1:1 (v/v/v). Após, adicionou-se 10 mL de hidróxido de potássio (0,05 M) e realizou-se a retrotitulação com HCl (0,05 M), previamente padronizado. O branco para essa análise consiste na adição de todos os reagentes exceto a enzima. A atividade hidrolítica foi determinada de acordo com a Equação 3:

$$A \left(\frac{U}{g} \right) = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot m} \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

U/g = (μmol de produto formado/ minuto de reação). V_b = volume de HCl utilizado no branco da reação (mL), V_a = volume de HCl utilizado na amostra (mL), M = molaridade da solução de HCl, t = tempo de reação (min), m = massa de enzima adicionada (g).

4.2.7. Caracterização das matérias-primas

Os índices de peróxido do óleo de semente de uva (método Cd 8b–90) foram determinados de acordo com os métodos oficiais da *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 2012).

4.2.8. Análise do produto

4.2.8.1. Separação dos triglicerídeos por neutralização dos ácidos graxos residuais

Com a finalidade de não obter um falso positivo ao analisar as amostras de produtos da reação, neutralizou-se o meio reacional e separou-se os ácidos graxos residuais.

Foram pesados 5 g do óleo obtido na reação de acidólise e diluiu-se em 30 mL de hexano. Em seguida adicionou-se 10 mL de solução 0,8 mol/L de KOH hidroalcoólico (30% etanol). Após a mistura ser agitada intensamente, houve a separação de fases da mistura: uma fase hidroalcoólica contendo os ácidos graxos livres e uma fase de hexano contendo os triglicerídeos (TAG). Recolheu-se a fase orgânica contendo os TAG, e realizou-se mais uma extração com o acréscimo de 10 mL de hexano. As fases recuperadas contendo hexano foram submetidas a rotaevaporador a 40°C até que o solvente evaporasse (WANG et al., 2012).

4.2.8.2. Metilação dos TAG após a separação

Com a finalidade de tornar os ácidos graxos voláteis para que fosse possível determiná-los por cromatografia gasosa realizou-se a metilação das amostras após a neutralização. De acordo com ISO 12966-2 (2011) foram pesados aproximadamente 50 mg do TAG que passou pelo processo de separação em um vial de 20 mL. Adicionaram-se 2 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio (0,2 M) e aqueceu a 80°C por 15 minutos sob agitação vigorosa. Em seguida a amostra foi resfriada e, então, adicionaram-se 2 mL de solução metanólica de ácido sulfúrico (1M). A amostra foi novamente aquecida a 80°C por 15 minutos sob agitação vigorosa e aguardou-se que se resfriasse novamente. Por fim, adicionou-se 1 mL de solução metanólica saturada de cloreto de sódio e 2 mL de hexano. A mistura foi agitada e depois mantida em repouso para separação das fases. A fase superior, que corresponde à fase orgânica, foi transferida para outro vial de 20 mL e repetiu-se a extração com hexano adicionando 2 mL de solvente novamente. O hexano foi evaporado com nitrogênio e o éster metílico obtido foi submetido a análise em cromatografia gasosa.

4.2.8.3. Composição em ácidos graxos

A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa, segundo a ISO 12966 (2014), substituindo-se o gás hélio pelo gás nitrogênio. Para estabelecimento do método de determinação de perfil de ácidos graxos (C4 à C24) e alguns ésteres de ácidos graxos, injetaram-se um mix de padrões de ésteres de ácidos graxos (mix de FAMES, Supelco®). Os testes foram realizados em um cromatógrafo a gás (Shimatzu®) utilizando injetor Split, detector de ionização por chama (DIC) e coluna SH-Stabilwax-DA (L x I.D = 30 m x 0,25 µm, df 0,25 µm). A temperatura do injetor e do detector foi de 250°C, sendo o modo de injeção Split (1:10) e o gás de arraste utilizado, nitrogênio, na vazão de 0,55 mL.min⁻¹, com programação de temperatura de 60°C a 210°C em 20°C.min⁻¹ ficando 210°C por 7 minutos e novo aquecimento a 20°C.min⁻¹ até 250°C, sendo esta temperatura mantida por 14 minutos, resultando em 30 minutos de análise. Posteriormente, as áreas dos picos obtidos foram relacionadas e foi determinado o grau de incorporação dos ácidos graxos (GI).

4.2.8.4. Determinação do grau de incorporação dos ácidos graxos (GI)

Grau de incorporação (GI) é a variável que determina o quanto de ácidos graxos de cadeia média, como o ácido cáprico, foram incorporados nos triglicerídeos do óleo de semente

de uva. Sua determinação é a partir do cálculo da Equação 4 (CASAS-GODOY et al., 2013), na qual MFA é o número de mols de ácidos graxos de cadeia média (C10:0) no triglicerídeo e MT é o número de mols totais de ácidos graxos no triglicerídeo.

$$GI(\%) = \left(\frac{MFA}{MT} \right) * 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Sabe-se que o grau de incorporação máximo que pode ser obtido é de 66,7%, uma vez que a incorporação de ácidos graxos só ocorre nas posições sn-1 e sn-3, pois as reações foram catalisadas por enzimas 1,3 específicas.

4.2.8.5. Determinação do índice de peróxido (IP)

Pesaram-se 2 g de óleo de semente de uva em erlenmeyer e em seguida para sua solubilização, adicionou-se 10 mL de solução de ácido acético: isooctano (3:2 v/v). Após, adicionou-se 1 mL de solução saturada de iodeto de potássio e deixou-se sobre abrigo da luz por 1 minuto. Após este período, adicionou-se 20 mL de água, 1 mL de laurilsulfato de sódio 10% (m/v) e 1 mL de solução indicadora de amido 1% (m/v). Homogeneizou-se o meio e iniciou-se a titulação com tiosulfato de sódio 0,01 N previamente padronizado com dicromato de potássio até o meio tornar-se levemente translúcido. Como branco da análise, adicionaram-se todos os reagentes nas proporções descritas acima, exceto a massa de óleo. O índice de peróxido foi determinado de acordo com a Equação 5.

$$IP = \frac{(V - V_{branco}) \times N \times 1000}{m} \quad \text{Equação (5)}$$

Onde:

IP é o índice de peróxido em mEq/kg; V = Volume de Tiosulfato de sódio gasto na análise da amostra (mL); Vbranco = Volume de Tiosulfato de sódio gasto no branco (mL); N = normalidade do Tiosulfato de sódio; m = massa de óleo analisado (g).

4.2.9. Cinética de reação- Modelo do Grau de incorporação

Um perfil temporal do grau de incorporação foi obtido para cada reação. Um modelo cinético empírico (Equação 6) foi ajustado aos dados experimentais para facilitar a observação e comparação das características de cada reação.

$$\frac{GI_i}{GI_{máx}} = \frac{t}{\beta + t} \quad \text{Equação (6)}$$

Onde GI é o grau de incorporação de ácidos graxos de cadeia média nos triacilgliceróis do óleo de semente de uva (%), $GI_{\text{máx}}$ é o grau de incorporação máximo teórico (66,70%), β é um parâmetro empírico e t é o tempo de reação (h). Embora a Equação (6) seja um modelo empírico, os parâmetros têm significados físicos, onde β representa a taxa ou velocidade com a qual GI aumenta. Portanto, quanto maiores os valores de β menor será o grau de incorporação dos ácidos graxos no óleo de semente de uva.

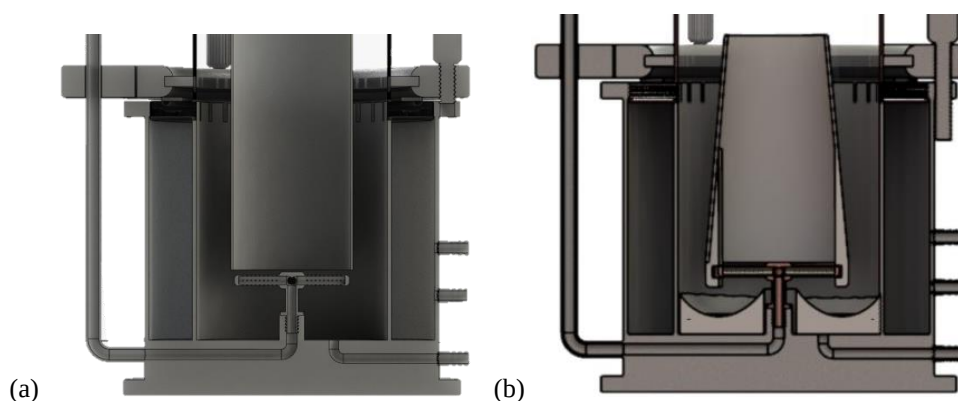
5. RESULTADO E DISCUSSÕES

5.1. Nova configuração do biorreator do tipo *airlift*

5.1.1. Desenvolvimento das novas peças

Visando uma melhor eficiência do reator e uma diminuição do volume útil para a realização da reação de acidólise do óleo de semente de uva devido a fins econômicos em relação aos reagentes e enzima imobilizada, foram feitas algumas modificações na geometria do biorreator do tipo *airlift* de volume útil de 2,0 L. Com o auxílio da impressora 3D (MakerBot Replicator+, modelo:PABH65) confeccionaram-se aparatos (base do reator e tubo interno) para esta modificação. A Figura 13 mostra a base inferior do reator antes e após as modificações geométricas.

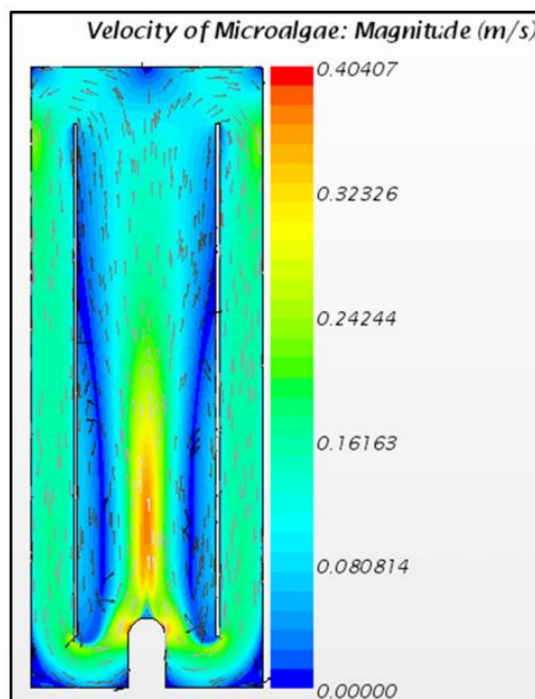
Figura 13- Desenho esquemático ampliado do biorreator *airlift*- (a) Padrão e (b) Nova configuração geométrica proposta



Fonte: Acervo do grupo de pesquisa

Após testes preliminares, percebeu-se que devido ao fundo do reator ser achatado ocorreu decantação da enzima imobilizada ao redor do aspersor e no canto das paredes do tubo externo. Calvo et al., (2017) também reportaram este problema, eles estudaram o comportamento de diversas variáveis hidrodinâmicas que afetam a turbulência em um fluxo multifásico (água-ar-microalgas) em um fotobiorreator *airlift* por meio de simulação CFD (*computational fluid dynamics*). Eles observaram que houve um acúmulo de microalgas na seção inferior do *downcomer*, que pode ser consequência da condição de quase estagnação dessa área. A Figura 14 mostra o perfil de velocidade para a microalga.

Figura 14- Perfil de velocidade da microalga



Fonte: Calvo et al., (2017)

É possível observar pela Figura 14 que na base do reator a velocidade da microalga foi zero, favorecendo assim a sua decantação, da mesma forma ocorreu no presente trabalho com o derivado enzimático, uma vez que sua densidade é maior que a da microalga, sua decantação é ainda maior. Portanto, para mitigar este problema desenvolveu-se um fundo abaulado, tal peça foi baseada no perfil da decantação das partículas e na circulação do meio. A Figura 15 abaixo ilustra a adaptação do fundo proposto.

Figura 15- Fundo proposto- (a) Fundo abaulado; (b) corte transversal do fundo



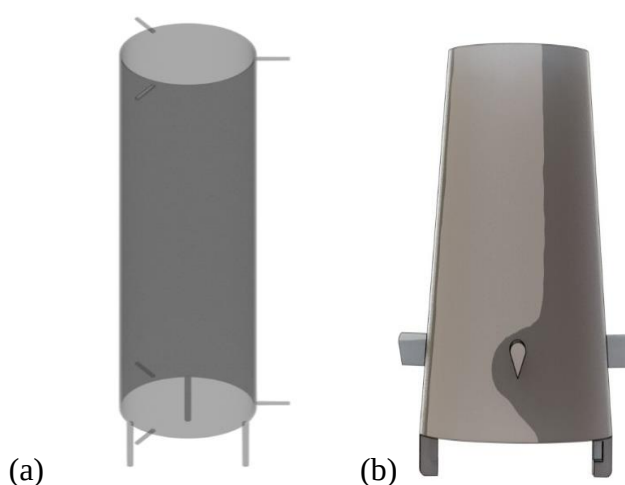
Fonte: Acervo do grupo pesquisa

Ao adicionar o fundo abaulado no reator o vão livre da base (distância entre a parte inferior do tubo interno e o fundo do biorreator) ficou menor em relação ao *airlift* padrão. Apesar de possivelmente aumentar a perda de carga na região, o intuito foi diminuir a

decantação das partículas sólidas na base do reator. Para melhor entendimento dos efeitos causados por essa mudança geométrica, mais estudos devem ser realizados.

Após, adaptação do fundo realizou-se um piloto; porém observou-se que ainda ocorria um pouco de decantação. Para otimizar ainda mais a circulação do meio projetou-se um tubo interno com altura de 105 mm e uma inclinação de 5°, onde a base possui diâmetro de 64,5 mm de diâmetro externo e 61,5 mm de diâmetro interno, já o topo possui 46,5 mm de diâmetro externo e 43,5 mm de diâmetro interno. A Figura 16 apresenta a nova configuração do tubo interno.

Figura 16– (a) Tubo interno padrão; (b) Nova configuração do tubo interno proposta



Fonte: Acervo do grupo e pesquisa

A hipótese é que o tronco de um cone terá maior velocidade de saída do meio reacional no *riser*. Ao ir diminuindo o diâmetro do *riser* até chegar ao seu topo obtendo uma inclinação de 5°, espera-se que haja redução da dispersão das bolhas na zona de desengajamento, e que promova o aumento da velocidade de ascensão do líquido, aumentando, assim, o retorno do líquido pelo topo do *downcomer*. Da mesma forma ocorre no espaço anular, onde o aumento do diâmetro da base do tubo interno, diminui o espaço anular, aumentando assim a velocidade de retorno da mistura trifásica, diminuindo a decantação das partículas sólidas no fundo do reator e aumentando suas suspensões, ou seja, impulsionando a velocidade ascendente no *riser* novamente, ocorrendo recirculação no interior do reator.

Outra mudança sugerida foram as hastes de sustentação do tubo interno. A haste do tubo interno padrão possui um formato cilíndrico, a partir de alguns testes preliminares observou-se uma região de decantação da enzima imobilizada, logo abaixo da mesma. Com o objetivo de mitigar esse problema criou-se uma nova versão, na qual as hastes possuem

formato de gota. Acredita-se que essa nova configuração diminuiu a resistência a circulação do meio reacional nessa região, diminuindo assim a possível decantação.

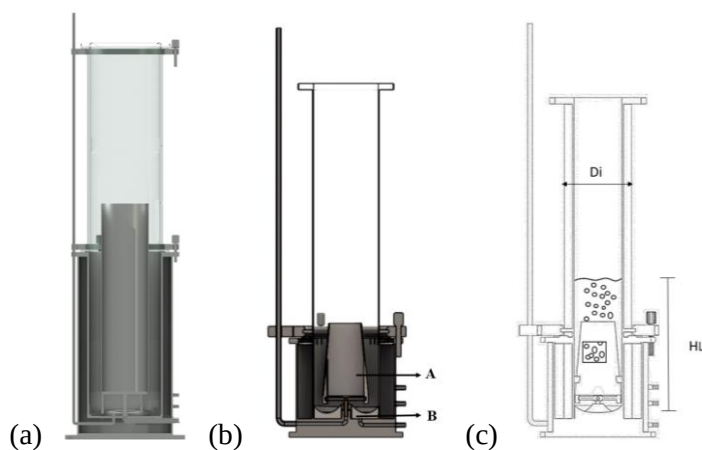
Essa angulação foi determinada a partir de testes com alguns tubos internos com diferentes inclinações. O objetivo não era restringir a passagem do escoamento da mistura. Desta forma chegou-se à inclinação de 5°, alterando o mínimo possível a relação (A_S / A_D).

De acordo Chisti (1989) a velocidade de circulação do líquido é um importante parâmetro no projeto do biorreator *airlift*. Ele é influenciado pela magnitude da força motriz que provoca a circulação do líquido, que é afetado pela intensidade da penetração das bolhas na seção *downcomer* (CHISTI, 1989). Logo, exerce influência na mistura, na recirculação da bolha, na suspensão de sólidos e na distribuição dos gases e dos sólidos. Em líquidos coalescentes, a separação da bolha da fase líquida pode ser basicamente manipulada por dois parâmetros geométricos - razão da área da seção transversal de *riser* para *downcomer* (A_S / A_D) e geometria da zona do separador gás-líquido. Portanto acredita-se que essa relação de área determina não apenas a intensidade da recirculação do gás, mas também a perda de pressão no circuito de circulação (HEIJNEN et al., 1997).

Yazdian et al., (2009) em seus estudo com um biorreator *airlift* de circulação externa para produção de biomassa a partir do gás natural demonstraram que ao diminuir a razão da área transversal do *riser* para o *downcomer* aumentou-se a velocidade do líquido e resultou em uma diminuição significativa do tempo de mistura, melhorando assim sua hidrodinâmica.

Para realização de reações com menor volume de meio reacional, adaptou-se o reator de volume útil de 2 litros para 1 litro. A Figura 17 ilustra a configuração padrão do biorreator do tipo *airlift* e nova configuração proposta no presente trabalho.

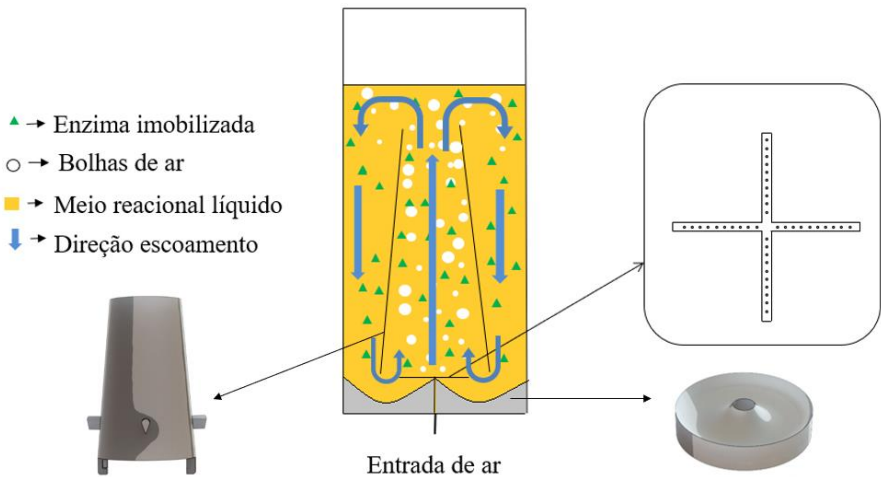
Figura 17- Biorreator *airlift* –(a) configuração convencional ; (b) e (c) nova configuração A- tubo interno; B- fundo abaulado; Diâmetro interno (D_i) e altura do líquido (HL) no biorreator



Fonte: Acervo do grupo de pesquisa

Todos os testes hidrodinâmicos e reações do estudo foram realizados nesta nova configuração. A Figura 18 mostra o desenho esquemático do biorreator *airlift* de tubos concêntricos modificado para sistemas trifásicos e a Tabela 4 apresenta as suas dimensões.

Figura 18-Desenho esquemático da nova configuração do biorreator *airlift* modificado para reações enzimáticas



Fonte: Acervo do grupo de pesquisa

Tabela 4- Dimensões da nova configuração do biorreator *airlift*

	Símbolo	Unidade	Valor
Altura do Riser	H_R	Mm	105,00
Área do Riser	A_s	mm^2	21820,00
Área Downcomer	A_D	mm^2	4021,50
Diâmetro do Topo do Riser	D_{RT}	Mm	43,50
Diâmetro da base do Riser	D_{RB}	Mm	61,50
Volume do Líquido	V_L	L	1,00
Inclinação do tubo interno	-	-	5°
Altura do líquido	H_L	Mm	154,43
Diâmetro interno da coluna	D_i	Mm	90,80
Razão entre diâmetro médio do tubo interno e diâmetro da coluna	D_{Tm}/D_i	-	0,81

Fonte: Próprio autor

Vale ressaltar que a configuração do reator proposto não se distingue somente em relação as mudanças geométricas do tubo interno e do fundo do reator, mas também em relação à altura/diâmetro (diâmetro do reator e altura do líquido). Esta relação utilizada no presente trabalho não é convencional para um biorreator *airlift*, pois este tipo de reator pneumático normalmente é estreito e alto, ou seja, o diâmetro é bem menor que a altura da coluna.

O vão livre da base do reator é considerada uma região com elevada perda de carga, logo, espera-se que ao diminuí-la essa perda de carga aumente, porém uma vez que o líquido utilizado é mais viscoso a sua velocidade de circulação será menor, diminuindo assim esta possível perda. Portanto, tanto o tubo interno em formato de tronco de cone, quanto o fundo abaulado objetivaram direcionar o escoamento para os cantos do reator, promovendo assim um estado de turbulência na região onde o derivado enzimático de forma a jogá-los para a base do difusor, promovendo a recirculação da mistura. Ou seja, mesmo havendo uma perda da eficiência do escoamento, promoveu-se a diminuição da decantação das partículas sólidas, pois direcionou-se o escoamento para as bordas do biorreator, fazendo com que a velocidade de circulação aumentasse próxima as paredes do tubo externo resultando na varredura das enzimas presentes no fundo abaulado e as impulsionando em direção ao aspensor, ocorrendo assim a recirculação do meio reacional.

Salienta-se que todas as modificações geométricas no reator do tipo *airlift* do presente trabalho foram realizadas a fim de mitigar problemas encontrados ao longo do projeto. Para melhor entendimento quanto aos efeitos destas mudanças em relação a velocidade de circulação da mistura, a perda de carga, assim como a eficiência do escoamento, mais estudos hidrodinâmicos devem ser realizados.

Outro ponto a destacar-se no presente estudo é que o *airlift* proposto, utiliza a dispersão de ar somente para agitação e mistura do meio, diferente de outras aplicações do mesmo. A maioria dos estudos com tubos internos modificados objetivam o aumento na transferência de oxigênio, pois muitas vezes visam a aplicação em processos fermentativos. Já o presente trabalho objetivou a melhora da mistura do meio reacional e a suspensão dos sólidos no interior do reator, para que promovesse maior encontro entre enzima imobilizadas e os substratos, otimizando assim o processo.

5.2. Hidrodinâmica

5.2.1. Determinação do tempo de mistura da nova configuração do biorreator *airlift*

A agitação é um parâmetro importante em um dado bioprocessos, principalmente em escala industrial. Para garantir que a transferência de massa e calor seja adequada, ou seja, para que ocorra uma ótima mistura do meio reacional a agitação deve ser eficaz. Porém, uma alta agitação transmite forças mecânicas sobre os grânulos de enzima imobilizada, resultando na ruptura do suporte de imobilização, o que reduz a estabilidade e impossibilita a reutilização da enzima. Portanto, uma alta agitação pode aumentar a taxa de cisalhamento levado a perda da atividade enzimática (PHUAH et al., 2012).

Visando uma ótima mistura sem que ocorra inativação da enzima, degradação do suporte de imobilização e desprendimento da enzima, realizou-se alguns testes de mistura com o suporte de imobilização da lipozyme RM IM®. O procedimento para determinação do tempo de mistura foi realizado a 45 °C que é a temperatura ótima da enzima utilizada. Estudos anteriores do grupo mostraram que vazões menores que 0,5 vvm não fluidizaram eficientemente as partículas sólidas e que vazões acima de 5vvm gerava alta coalescência das bolhas, portanto neste estudo decidiu-se variar as vazões de ar de 1 a 3 vvm e a carga de sólidos de 1 a 3% (v/v) como mostrado na Tabela 5.

A viscosidade da mistura (óleo de semente de uva e ácido cáprico) nesta temperatura foi investigada no início e no final da reação. Observou-se que este parâmetro permanece praticamente constante durante a reação, sendo a viscosidade inicial da síntese do triglicerídeos dietéticos igual a 1,27 cP e a final igual a 1,32 cP. Essa observação está de acordo com trabalhos anteriores do grupo de pesquisa que mostraram que não há variação da viscosidade da mistura durante a reação de acidólise.

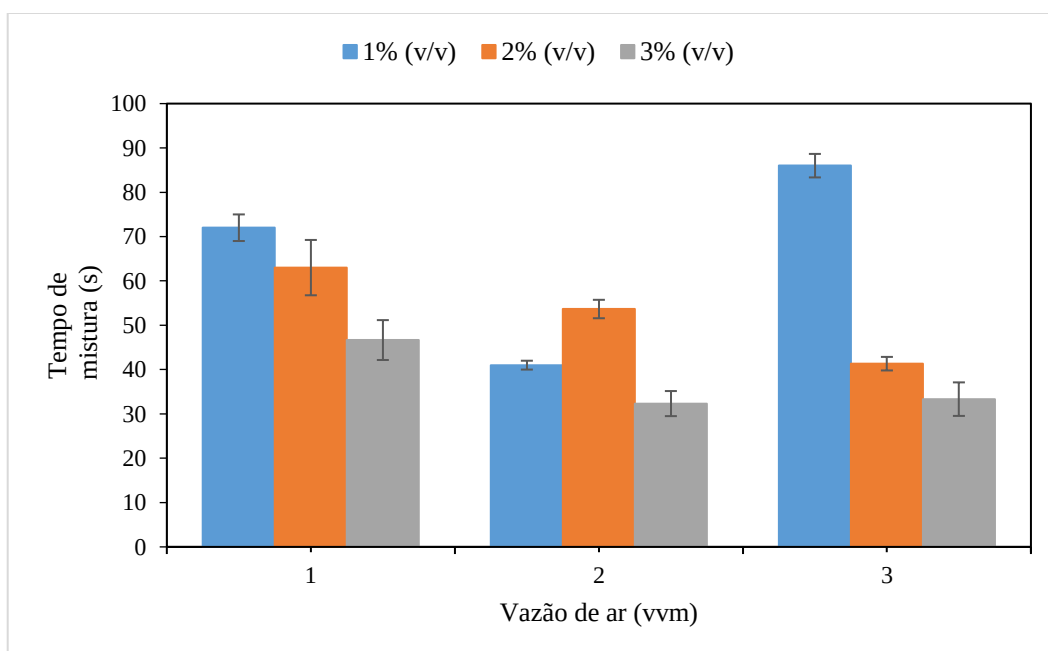
Tabela 5- Tempos de mistura obtidos para o reator *airlift* utilizando óleo e variando as vazões de ar e a carga de sólidos (v/v)

Vazão (vvm)	U _{GS} (m.s ⁻¹)	Tempo de mistura (s)		
		1%(v/v) sólidos	2%(v/v) sólidos	3%(v/v) sólidos
1	0,00076	72,00 ± 3,00	63,00 ± 6,08	46,66 ± 4,50
2	0,001525	41,00 ± 1,00	53,66 ± 2,08	32,33 ± 2,83
3	0,002288	86,00 ± 2,65	41,33 ± 1,53	33,33 ± 3,78

Fonte: Próprio autor

Ao observar a Tabela 5 percebe-se que ao ir aumentando a carga de suporte ocorreu diminuição do tempo de mistura (t_m), exceto com 2%(v/v) de sólidos em relação ao meio na vazão de 2vvm que obteve t_m 11 segundos maior que quando utilizado 1%(v/v) de partículas. Outro ponto a se notar é que ao aumentar a vazão de ar ocorre diminuição no tempo de mistura, exceto em baixas cargas como observado na carga de 1 % com vazão de 3 vvm. A Figura 19 apresenta o gráfico do tempo de mistura em função da vazão de ar.

Figura 19-Gráfico do tempo de mistura em função da vazão de ar



Fonte: Acervo pessoal do autor

O experimento foi realizado em triplicata e as barras mostram o desvio padrão. Ao observar os tempos de mistura quando utilizado uma vazão de 2 vvm percebe-se que não importa o aumento da carga, uma vez que o tempo de mistura não varia muito. Já em 3 vvm é possível observar que a menor carga de sólidos obteve o maior tempo de mistura. Outro ponto observado foi que ao aumentar a massa de suporte enzimático o tempo de mistura diminui, exceto quando utiliza a vazão de ar de 2 vvm, onde é possível observar que com 2% obteve-se um tempo de mistura maior.

Como mencionado anteriormente, notou-se que com o aumento da carga de suporte enzimático ocorreu diminuição do tempo de mistura. Freitas et al (1998) estudaram o comportamento hidrodinâmico de uma mistura trifásica em um biorreator *airlift* de tubos concêntricos de 60 L com zona de degaseificação ampliada. Eles utilizaram como fase sólida

grânulos de alginato, variando a carga de 0% a 40% (v/v) e a vazão de ar de 1,9 a 90,2 L/min. Perceberam que o tempo de mistura diminui com o aumento da vazão de ar, que este parâmetro obteve valor máximo ao atingir uma carga igual a 20% (v/v), e que após este valor, o t_m diminui. Os autores supõem que o aumento da carga de sólidos pode gerar colisões entre as partículas, gerando assim, um aumento de vórtices que irão melhorar a mistura.

De acordo com Al-busafi et al. (2016) geralmente o tempo de mistura diminui com o aumento da vazão de ar, no presente estudo percebemos este perfil somente ao utilizar 2 % de carga de sólidos. Ao utilizar 1% (v/v) de suporte enzimático nota-se que ao adicionar um fluxo de ar com 3 vvm o tempo de mistura foi superior ao encontrado em vazões mais baixas. E ao utilizar 3% de carga percebe-se que com as vazões de 2 e 3 vvm o tempo de mistura obteve valores semelhantes, $32,33 \pm 2,83$ e $33,33 \pm 3,78$.

Foi observado durante os experimentos que ao utilizar a vazão de ar a 3 vvm, a turbulência do meio foi alta o que gerou alta coalescência das bolhas no meio. Optou-se por não seguir os experimentos com esta vazão, pois este fator pode diminuir a transferência de massa e promover problemas difusionais.

5.3. Determinação dos parâmetros cinéticos – K_m e V_{max}

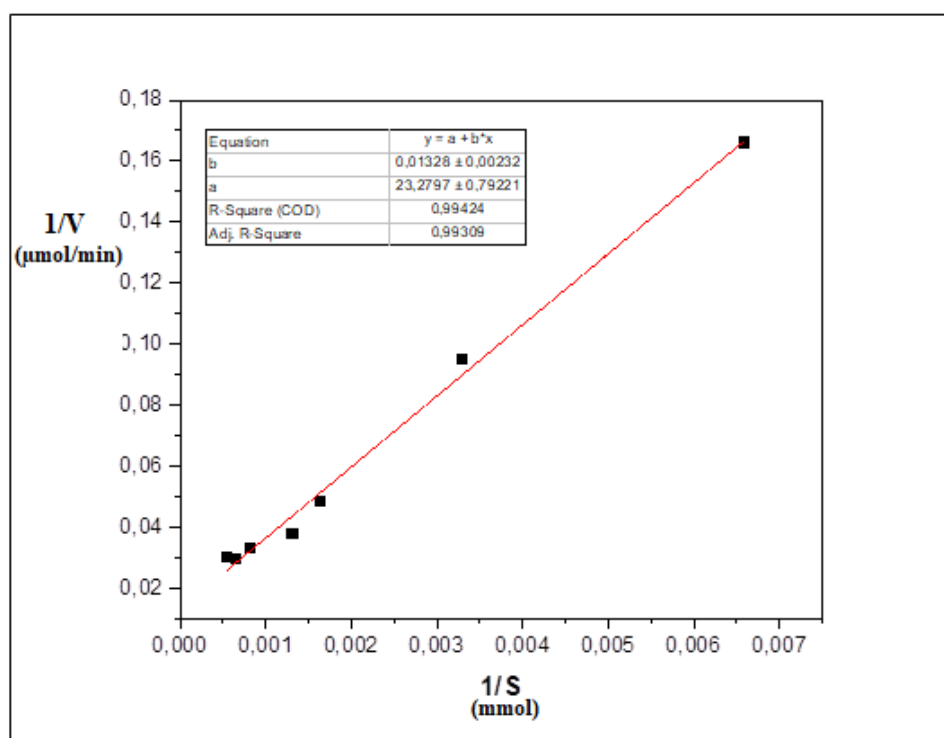
Considerando a importância da determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) das enzimas, optou-se por inicialmente fazer a determinação destes parâmetros para a enzima Lipozyme RM IM antes de aplicá-la na reação de acidólise. Os valores obtidos para a atividade hidrolítica quando a enzima foi submetida à diferentes concentrações de substratos estão apresentadas na Tabela 6.

A partir dos dados obtidos, foram determinados os valores de K_m e V_{max} , a partir da regressão linear de Lineweaver-Burk (Figura 20). Desta forma foram determinados os parâmetros cinéticos da enzima utilizada no presente trabalho: velocidade máxima (V_{max}) de $75,30 \mu\text{mol/min}$ e K_m de $1752,98 \text{ mmol}$.

Tabela 6- Atividade hidrolítica média obtida variando-se a concentração de azeite empregando-se a Lipozyme RM IM

% de azeite	Concentração de azeite (mMol)	Atividade Média ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
5	151,68	6,3
10	303,36	10,55
20	606,72	20,72
25	758,40	26,37
30	910,08	35,78
40	1213,44	30,32
50	1516,81	33,90
60	1820,17	33,15
70	2123,53	27,12

Figura 20- Linearização de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos da lipozyme RM IM®



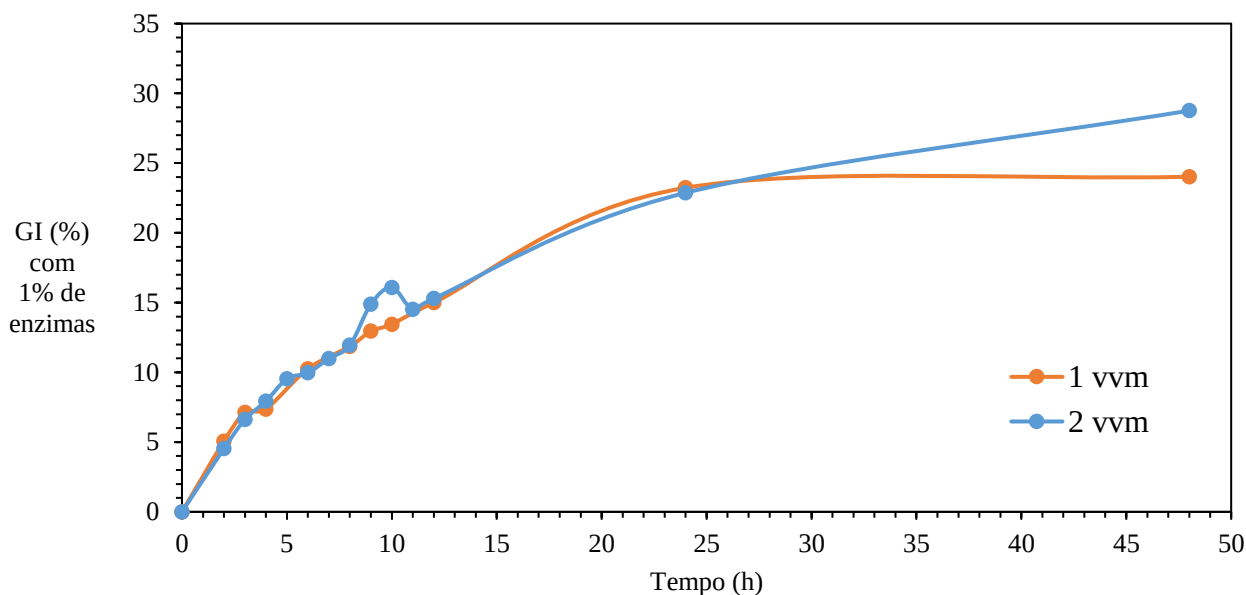
Fonte: Próprio autor

5.4. Síntese de triglicerídeos dietéticos do tipo MLM

A fim de verificar a hidrodinâmica do reator em relação a reação, realizou-se acidólise do óleo de semente de uva com carga de 1% (v/v) de lipozyme RM IM em relação ao meio nas vazões de ar de 1 vvm e 2 vvm. O volume total do meio reacional (óleo de semente de uva

e ácido cáprico) foi igual a 1 litro. A partir da composição de ácidos graxos, foram calculados os valores de grau de incorporação do ácido cáprico no óleo de semente de uva. A Figura 21 apresenta o grau de incorporação do C10 nas duas reações em relação ao tempo.

Figura 21- Grau de incorporação do ácido cáprico (C10) ao decorrer de 48 horas das reações com 1 e 2 vvm de vazão de ar.



Fonte: Acervo pessoal do autor

Observou-se que durante as primeiras 24 horas os graus de incorporação foram semelhantes nas duas reações, porém ao completar 48 horas a reação com maior vazão obteve $28,76 \pm 0,05$ de incorporação de ácidos graxos de cadeia média, enquanto a reação realizada a 1 vvm obteve $24,02 \pm 0,13\%$. Supõem-se que essa diferença pode ser justificada pelo fato da mistura em 2 vvm ser mais turbulenta, causando uma maior possibilidade de encontro da enzima com os substratos. Portanto, esse grau de incorporação maior na reação com maior vazão de ar pode estar relacionado ao menor tempo de mistura obtido quando comparado a com o fluxo de ar a 1 vvm.

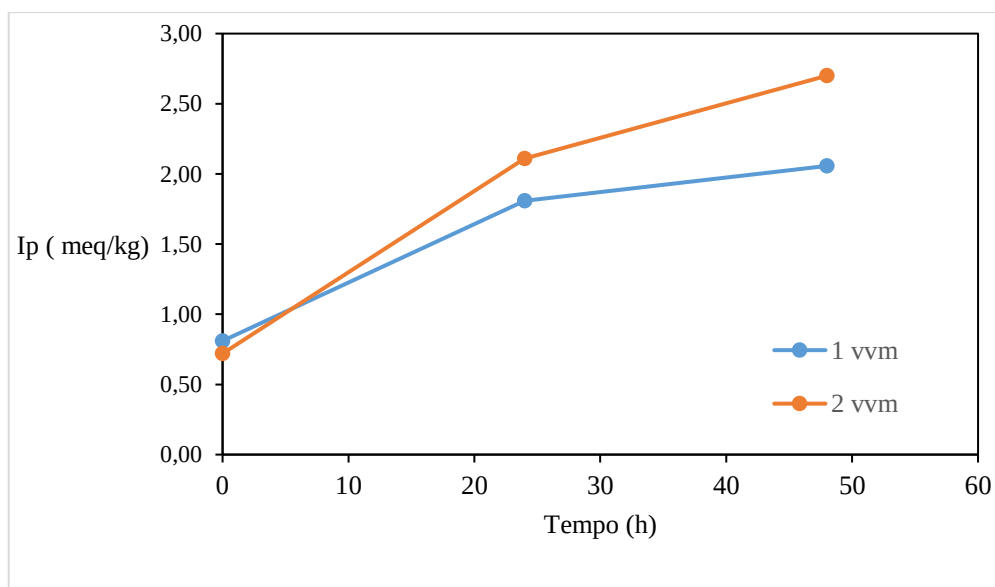
No momento, não é possível avaliar se a diferença de 4% de grau de incorporação dos ácidos graxos entre as reações com vazões de 1 e 2 vvm é intrínseca ao experimento ou se é uma diferença significativa. Para uma afirmação, deve-se realizar uma triplicata de uma das duas reações, assim adquiria-se o desvio padrão, permitindo observar o intervalo da variação.

Se essa diferença for significativa, a hipótese é que independente do aumento da vazão, o grau de incorporação no início da reação será semelhante, porém quando a quantidade de reagentes a serem sintetizados diminui, uma vez que já houve incorporação de ácidos graxos em boa parte do óleo, a reação com maior vazão de ar é mais turbulenta, desta forma promove maior encontro entre enzima e os reagentes para sintetize do triglicerídeos dietéticos.

Outra hipótese é que ao decorrer do tempo de reação ocorreu um pouco da decantação do do derivado enzimático da reação com menor vazão de ar, 1 vvm, como a turbulência do meio é baixa, parte dos sólidos decantaram o que diminui a síntese de triacilgliceróis do tipo MLM.

Após análise do grau de incorporação, o índice de peróxido (IP) foi dosado conforme descrito em 4.2.8.5., e o resultado pode ser observado na Figura 22. Como é possível observar, o IP aumentou de $0,81 \pm 0,09$ para $2,06 \pm 0,11$ meq/kg em 48h de reação a uma vazão de ar de 1 vvm, enquanto a realizada a 2vvm aumentou de $0,72 \pm 0,12$ para $2,70 \pm 0,14$ meq/kg. Percebe-se que o aumento na vazão aumentou a oxidação do óleo, porém esse índice de peróxido é aceitável segundo as normas da ANVISA (2005), que determina que para óleos e gorduras refinados é permitido um IP máximo de 10 meq/kg.

Figura 22 – Índice de Peróxido no decorrer de 48 horas das reações em 1 e 2vvm



Fonte: Acervo pessoal do autor

Outro ponto analisado foi o consumo de energia do biorreator *airlift* ao utilizar as duas vazões com 1% (v/v) do derivado enzimático. O cálculo da potência foi realizado de acordo com Equação 2 apresentada no item 4.2.2. Como esperado o gasto energético ao empregar a

vazão de ar com 2 vvm foi o dobro quando comparado com 1 vvm, sendo 0,0457W e 0,0221W respectivamente. Portanto, mesmo não levando em consideração gasto energético do compressor de ar, pode-se dizer que o consumo energético ao utilizar este reator foi baixo para as duas vazões utilizadas. De acordo com Träger et al., (1989), o reator pneumático do tipo airlift requer apenas cerca de 1/3 da energia gasta em reatores de tanque agitado, pois eles não requerem agitador mecânico, logo a demanda de energia é consideravelmente menor que em um reator com agitação mecânica.

Depois dos testes preliminares, fixando a carga enzimática a 1%(v/v) em relação ao meio reacional e variando as vazões de ar em 1 e 2 vvm, observou-se que o grau de incorporação mesmo em uma taxa pequena foi maior em 2 vvm, que a variação do índice de peróxido foi pequena quando comparado as duas reações, e que o consumo de potência mesmo sendo o dobro do utilizado com 1 vvm continua sendo baixo. Desta forma, fixou-se a vazão de 2 vvm para realização das outras reações.

Após estipular a vazão de ar a ser utilizada em todos os processos, realizou-se reações com 2 % e 3% (v/v) de carga de enzimas em relação ao volume de substratos conforme descrito em 4.2.3. As viscosidades do óleo de semente de uva e dos meios reacionais do final de todas as reações a 45°C foram monitorados. A Tabela 7 apresenta os valores obtido de acordo com o tópico 4.2.3.

Tabela 7-Viscosidade do óleo de semente de uva e das três reações variando carga de enzimas

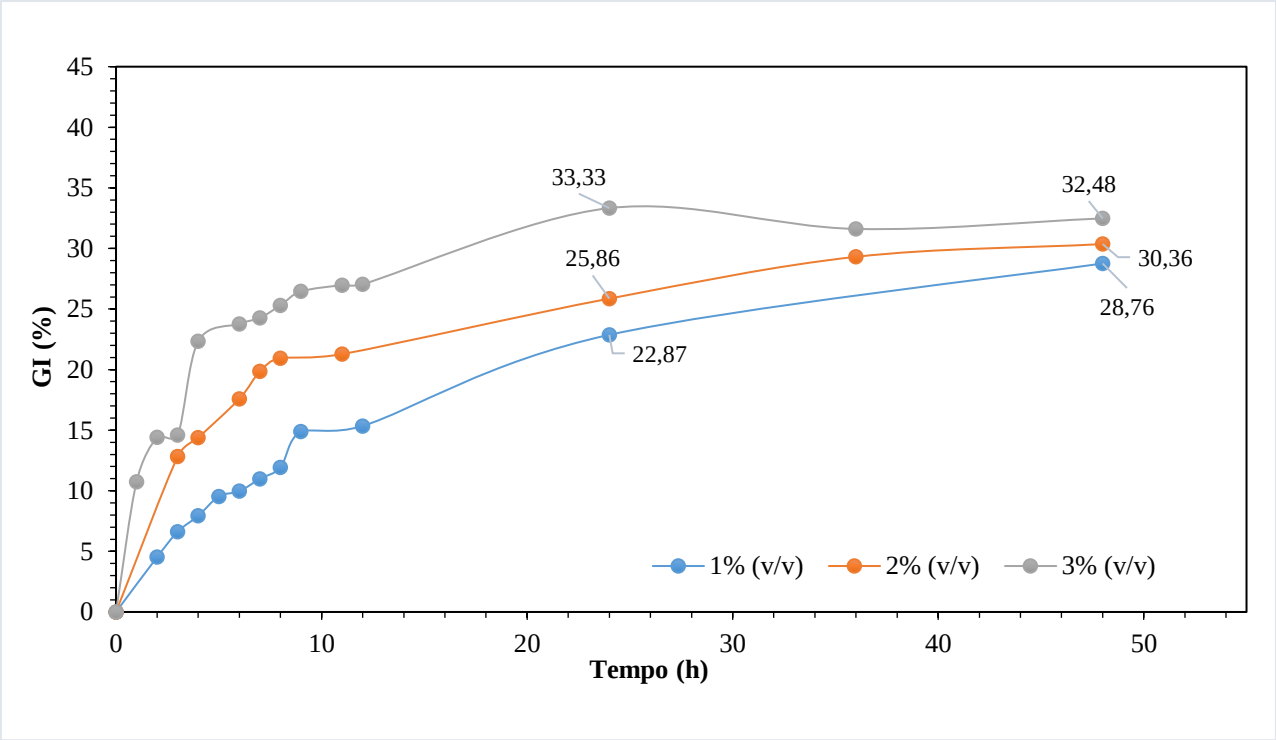
Amostra	Viscosidade (cP)
Óleo de semente de uva	1,27
Produto obtido na reação com 1% (v/v) de enzimas	1,27
Produto obtido na reação com 2% (v/v) de enzimas	1,32
Produto obtido na reação com 3% (v/v) de enzimas	1,32

Os valores de viscosidade do óleo puro e após a reação são próximos, desta forma, assume-se que ao longo da reação a viscosidade não se altera muito, como observa-se na Tabela 8. Portanto, o escoamento do fluido no biorreator *airlift* observado para as três reações é idêntico. Outra observação é que óleo de semente de uva possui viscosidade igual a da reação com 1% (v/v) e as reações com 2 e 3 % (v/v) não variaram muito em relação a ele. Em outro trabalho do grupo de pesquisa foi observado este mesmo perfil ao realizar a acidólise do

óleo de algodão com o ácido cáprico, ou seja, perceberam que mesmo após a reação o valor da viscosidade do meio reacional continua semelhante ao do óleo puro.

A Figura 23 apresenta os resultados das reações com 1%, 2% e 3%(v/v) de Lipozyme RM IM[®].

Figura 23- Grau de incorporação do ácido cáprico (C10) ao decorrer de 48 horas das reações com 2 vvm de vazão de ar



Fonte: Acervo pessoal do autor

A Tabela 8 apresenta o resumo dos principais resultados obtidos durante a as reações de 1, 2 e 3% (v/v) a 2vvm.

Tabela 8- Grau de incorporação, índice de peróxido e velocidade máxima de incorporação em alguns tempos das reações de 1%, 2% e 3% na vazão de 2 vvm.

Reação	Tempo (h)	GI (%)	IP (mEq/kg)	Atividade Hidrolítica (U/g)	Consumo de potência (W)
1% (v/v)	0	0,00	0,72 ± 0,12	702,5±81,23	0,0457
	12	15,35± 0,16	-		
	24	22,87± 0,03	2,11 ± 0,14		
	48	28,76± 0,05	2,70 ± 0,09	589,71±78,28	
2% (v/v)	0	0,00	0,99 ±0,17	638,72±44,7	0,0471
	12	21,28± 0,03	-		
	24	25,85± 0,13	2,21 ± 0,24		

3% (v/v)	48	30,36± 0,09	2,83 ± 0,31	505,82±20,01	0,0472
	0	0,00	0,73 ± 0,04	1121,04±68,26	
	12	28,55± 1,47	-		
	24	32,32± 1,01	2,08 ± 0,11		
	48	32,06±0,042	2,73 ±0,07	806,45±103,89	

Fonte: Próprio autor

Nota-se na Figura 23 que ao elevar a carga de enzimas ocorre o aumento na velocidade de reação, ou seja, ocorreu uma aceleração na incorporação de ácidos-graxos. Este fato é observado ao duplicar a quantidade de enzimas quando comparado com a reação com 1% (v/v), o mesmo ocorre ao triplicar a quantidade de carga enzimática. Observa-se também que durante as primeiras horas de reação o grau de incorporação de ácidos graxos é maior que após o tempo de 10 horas. Nota-se que após este tempo a incorporação de C10 fica praticamente constante, levando a diminuição da velocidade de reação.

A reação com 1% de enzimas forneceu um GI de 28,76 % em 48h; já a síntese com o dobro de enzimas apresentou 30,36% de incorporação do ácido graxo de cadeia média no mesmo tempo, enquanto a reação com 3% forneceu um máximo de 32,32 % de incorporação de C10 em 24h. Em termos de tempo de reação a síntese de triglicerídeos dietéticos com o triplo de enzimas chama atenção, porém o seu custo é alto, e a reação com um terço dessa massa obteve somente 5% a menos de incorporação de ácidos graxos de cadeia média com o dobro do tempo de reação. Observa-se também que em 12 horas de reação com 3% (v/v) de carga obteve-se um grau de incorporação semelhante a uma reação com 1 % (v/v) em 48 horas, $27,05 \pm 0,06$ e $28,76 \pm 0,05$, respectivamente.

Percebe-se que nas primeiras horas a velocidade de incorporação na reação com alta carga enzimática, foi maior que nas outras reações, o mesmo é notado ao comparar o grau de incorporação por hora da reação com 2% em relação a 1%(v/v). A partir das 10 horas as reações com 2 e 3% de enzimas apresentaram diminuição na velocidade de incorporação do ácido cáprico, C10, em relação a síntese com menor carga. Possivelmente, este fato pode ser explicado devido à alta concentração de enzimas o que proporciona maior contato entre estes biocatalizadores e os reagentes, conforme passa o tempo de reação, ocorre o aumento da concentração dos triglicerídeos dietéticos e diminuição dos reagentes livres.

Nota-se também que ao aumentar a concentração de sólidos ocorreu aumento da velocidade de reação, o que está de acordo com os testes de mistura que mostram que com o aumento da carga do derivado enzimático o tempo de mistura tende a diminuir.

Em termos de índice de peróxido as três reações obtiveram oxidações semelhantes, variando em torno de 2,00 mEq/kg em relação ao IP do óleo no início da reação, tais valores estão dentro do aceitável segundo as normas da ANVISA (2005), que determina que para óleos e gorduras refinados é permitido um IP máximo de 10 mEq/kg.

Ao analisar as atividades enzimáticas pode-se concluir que o biorreator *airlift* promoveu baixo cisalhamento sobre a enzima. Percebe-se que as três reações realizadas perderam cerca de 20% da sua atividade inicial. A atividade enzimática final da Lipozyme utilizada na reação com 1%(v/v) de enzima manteve 84% da atividade inicial, já para a reação com 2% a final foi igual a 79 % da atividade hidrolítica inicial e para 3% duplicata a atividade final foi igual a 81% da atividade inicial. Na primeira replicata da reação com 3% a atividade enzimática foi menor após a reação, (63%), acredita-se que devido a variação de temperatura que ocorreu no banho termostático, a temperatura aumentou muito em alguns momentos o que pode ter gerado a desnaturação de boa parte das enzimas utilizadas.

Estes valores são satisfatórios, uma vez que, o valor máximo de incorporação de ácidos graxos é de 66,70% para um rendimento teórico de 100% (CABALLERO et al., 2014). Ou seja, o grau de incorporação máximo para obtenção de um triglicerídeo dietético do tipo MLM é de 66,70, uma vez que a incorporação dos ácidos graxos só ocorre nas posições sn-1 e sn-3, já que as reações foram catalisadas por lipases 1,3 específicas.

Há alguns estudos na literatura relatando o uso de lipases imobilizadas[®] para obtenção de óleos estruturados do tipo MLM. A Tabela 9 apresenta os resultados de dois trabalhos da literatura e os graus de incorporação de C10 do presente trabalho. A carga de enzima foi transformada para relação massa/massa para facilitar a comparação com a literatura, onde 6% (m/m), 4 (m/m) e 2% (m/m) equivalem a 3%(v/v), 2%(v/v) e 1%(v/v) de enzimas em relação ao volume dos substratos, respectivamente.

Tabela 9- Graus de incorporação de C10 no presente trabalho e em estudos da literatura sobre a produção de triglicerídeos dietéticos do tipo MLM

Reator	Óleo:c. Graxo	Lipase	Meio reacional (g)	Carga de enzimas (m/m)	Tempo (h)	T (°C)	GI (%)	Referência
Tanque agitado	Óleo de semente de uva:C10	Lipozyme TL IM	4,3	5%	31	45	29,9±0,07	Souza et al., 2018)
Tanque agitado	Óleo de semente de uva: C10	Lipozyme RM IM	30	8%	24	45	34,53±0,05	(Bassan et al., 2019)
Airlift de	Óleo de	Lipozyme	911,2	6%	24	45	32,3 ±1,1	Presente

tubos concentricos	semente de uva : C10	RM IM	4%	48	45	30,3±0,09	trabalho
			2%	48	45	28,8±0,05	

Nota-se que os estudos mencionados utilizaram reatores de tanque agitado. O rendimento e a qualidade do produto dependem de diferentes fatores como a razão molar do reagente, composição do substrato e parâmetros operacionais (KAVADIA et al., 2018; WANG et al., 2012). As condições reacionais do presente trabalho foram definidas de acordo com trabalhos do grupo (BASSAN et al., 2019).

O biorreator proposto para realização da reação de acidólise do óleo de semente de uva para obtenção de TAGs do tipo MLM mostrou-se eficiente, obtendo um máximo de grau de incorporação de ácidos graxos de 32,32% ± 1,10 utilizando somente 3% (v/v) de Lipozyme RM IM em 1 litro de meio reacional. E mesmo com baixa carga enzimática, 1 e 2% (v/v), obteve-se graus de incorporação viáveis, 28,76 ± 0,05 e 30,36 ± 0,09, respectivamente. Quando comparado ao trabalho de Bassan et. al, (2019) percebe-se que a quantidade de enzimas utilizadas no presente projeto foi menor e que os graus de incorporação foram semelhantes. Já ao comparar com Souza et al (2018), percebe-se que mesmo ao utilizar cargas inferiores, 4% e 2%(m/m), o grau de incorporação do presente projeto foi semelhante ao utilizado por estes pesquisadores.

Como mostrado na Tabela 8 o consumo de potência do reator proposto foi baixo para todas as cargas de enzimas utilizada. Mesmo não levando em consideração o gasto energético do compressor de ar, o biorreator airlift se mostra vantajoso quando comparado ao um tanque agitado, pois há estudos que mostram que o seu gasto energético é cerca de um terço da energia gasta por um reator com agitação mecânica.

Os valores obtidos não foram superiores aos encontrados na literatura, porém foram semelhantes mesmo utilizando menores cargas de enzima, portanto, o biorreator do tipo *airlift* mostra-se como mais uma opção para realização de reações de síntese de lipídeos estruturados. Além disso ele tem vantagens como baixa taxa de cisalhamento, baixo consumo de energia, entre outros parâmetros. Entretanto, o presente trabalho é pioneiro ao utilizar este biorreator, ele abre um campo para mais aplicações utilizando este tipo de biorreator pneumático. Até o momento não há na literatura trabalhos que utilizam o utilizam para a produção de triglicerídeos dietéticos.

Em termos de índice de acidez o regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e cremes vegetais (ANVISA, 2005) diz que o limite para óleos comerciais é de 4mg KOH/g. Porém, estudos anteriores do grupo mostraram que as amostras analisadas dos óleos

obtidos ao final das reações possuíam valor maior ao estipulado. Esse valor está relacionado ao fato de que, para a enzima catalisar a reação de acidólise do óleo de semente de uva, é necessário que haja ácidos graxos livres no meio reacional, de forma que esta consiga realizar a substituição dos ácidos graxos presentes nas posições 1 e 3 do triglicerídeo pelo ácido de interesse que foi adicionado ao meio. Sendo assim, além do excesso de ácido cáprico no meio, tem-se a liberação dos ácidos graxos resultantes da reação de acidólise. Para que o óleo sintetizado neste projeto possa ser utilizado para consumo, é preciso que seja realizada a neutralização destes ácidos graxos livres em excesso e recupere-se apenas os triglicerídeos dietéticos do tipo MLM.

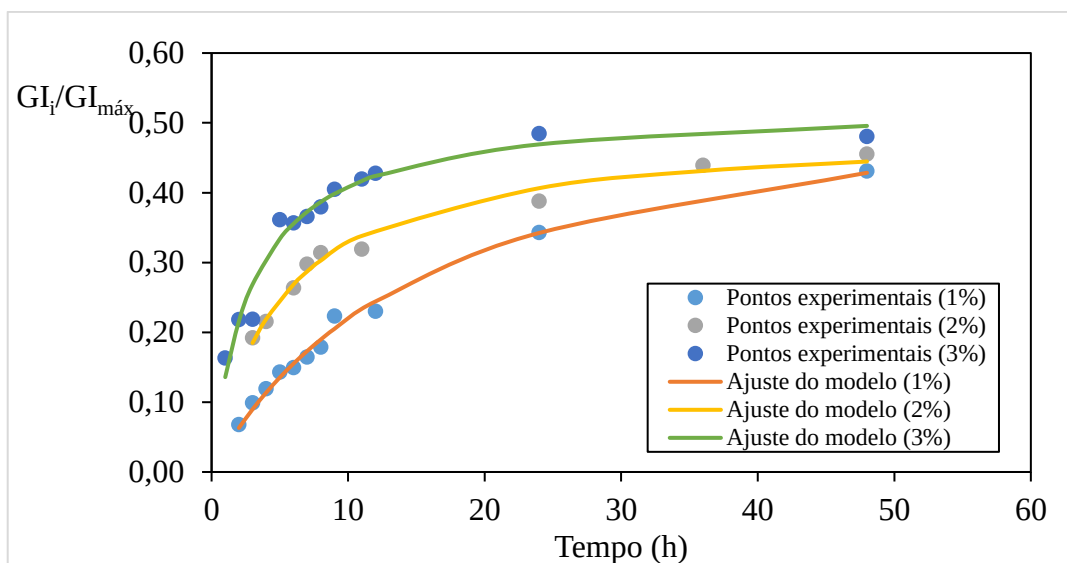
5.4.1. Cinética do grau de incorporação de ácidos graxos na reação de acidólise do óleo de semente de uva.

Após o estudo do grau de incorporação em relação ao tempo de reação para cada carga de enzimas imobilizadas utilizada, o modelo descrito pela Equação 6 foi ajustado aos dados experimentais do grau de incorporação normalizado ($GI_i/GI_{máx}$) em função do tempo de ensaio, para a estimativa do parâmetro cinético β (constante de velocidade do Grau de incorporação). Portanto, valores mais altos de β indicam uma produtividade menor por tempo, ou seja, uma reação mais lenta.

$$\frac{GI_i}{GI_{máx}} = \frac{t}{\beta + t}$$

O modelo ajustou adequadamente para todas as reações testadas, com valores de R^2 superiores a 0,98 para todas as sínteses. A Figura 25 apresenta o gráfico com o ajuste do modelo proposto. Os valores de grau de incorporação foram normalizados em relação ao valor máximo do grau de incorporação dos ácidos graxos de cadeia média, como a enzima utilizada é 1,3 específica este valor é igual 66,70%.

Figura 24-Ajuste do modelo proposto aos pontos experimentais



Como esperado a reação com 1% de enzima imobilizadas obteve o maior β , sendo igual a 16,14 já a reação com 2% apresentou um β com valor de 4,96 e a reação com 3% obteve 2,86 por sua vez. Portanto, a constante β é inversamente proporcional ao grau de incorporação (GI) dos ácidos graxos, desta forma quanto maior ela for mais lenta a reação será, como observa-se na reação com 1% de lipozyme. Já o β da reação com 3% de enzimas é o menor, o que também era esperado uma vez que a quantidade enzimas é o triplo.

6. CONCLUSÕES

Com este trabalho foi possível demonstrar o potencial do biorreator *airlift* para reações multifásicas com enzimas imobilizadas, especialmente para síntese enzimática de lipídeos estruturados. Desenvolveu-se uma nova configuração de um biorreator pneumático do tipo *airlift* de tubos concêntrico para mitigar problemas encontrados ao decorrer do projeto. O tubo interno proposto possui a estrutura de um tronco de cone, com diâmetro do topo menor que o diâmetro da base, ou seja, o tubo interno possui uma inclinação de 5°, logo, o diâmetro vai diminuindo da base até chegar em sua parte superior. A base do reator também foi modificada, sendo baseada no perfil de decantação das enzimas e da circulação do meio reacional. Espera-se que estas modificações diminuam a decantação dos derivados enzimáticos e promova uma melhor circulação da mistura trifásica. Para melhores conclusões sobre a eficiência desta nova configuração deste biorreator pneumático mais estudos acerca da hidrodinâmica devem ser realizados.

Percebeu-se que ao aumentar a carga de sólidos e a vazão de ar os tempos de mistura diminuíram e que isso pode ter ocorrido devido ao aumento de vórtice nas zonas de mistura provocada pelas colisões dos sólidos. Como o fluido utilizado é o óleo de semente de uva, em altas vazões pode ocorrer alta taxa de coalescência das bolhas o que pode provocar um efeito negativo na mistura. A partir dos testes hidrodinâmicos a melhor vazão para prosseguir a realização das outras reações foi a de 2 vvm.

A realização das reações com 1%(v/v) de carga de enzimas variando o fluxo de ar em 1 e 2 vvm permitiu verificar a melhor vazão para prosseguir as próximas reações e como observado nos testes de mistura a vazão com 2 vvm mostrou-se mais eficaz. Percebeu-se que a maior vazão ocasionou maior grau de incorporação de ácidos graxos, $28,76 \pm 0,05$, enquanto a menor vazão (1% v/v) obteve GI de $24,02 \pm 0,13\%$ durante 48 horas de reação, portanto as sínteses com 2 e 3% (v/v) foram realizadas com esta vazão.

Os valores do grau de incorporação de ácidos graxo de cadeia média no óleo de semente de uva utilizando a lipase imobilizada comercial Lipozyme RM IM[®] mostraram-se satisfatórios. O melhor grau de incorporação, $33,33 \pm 0,07$, foi obtido pela reação com maior carga de enzimas imobilizadas, 3% v/v, em 24 horas. Durante 12 horas de síntese com esta carga, o grau de incorporação, $27,05 \pm 0,06$, foi semelhante ao obtido durante 48h pela reação com menor carga (1%), $28,76 \pm 0,05$. Outro ponto observado foi que o grau de incorporação em 48h na reação com 2% (v/v) foi semelhante ao encontrado em 24h na reação de 3% (v/v), sendo $30,36 \pm 0,09\%$ e $33,33 \pm 0,07\%$, respectivamente. Estes valores são considerados

promissores uma vez que o máximo obtido na produção de triglicerídeos dietéticos do tipo MLM é 66, 70 %.

Observou-se que o aumento da carga de enzima acelerou a velocidade de reação, ou seja, acelerou o grau de incorporação de ácido cáprico. Nas primeiras 10 horas de reação essa velocidade foi maior que após este período. Como esperado a reação com maior carga obteve uma velocidade maior no início e menor no final em relação as outras reações com menor carga.

Outro ponto satisfatório foi o índice de peróxido resultante durante este tempo, o qual mostrou-se muito baixo, pois houve um aumento mínimo quando comparado com o óleo colocado no início da reação. O grau de oxidação do óleo foi pequeno, ao contrário do esperado, o índice de peróxido máximo foi em torno de $2,83 \pm 0,31$, valor cerca de 4 vezes menor que o estipulado pela Anisa (2005) (10 mEq/kg).

Observou-se que reator do tipo *airlift* utilizado obteve uma boa homogeneidade do meio com ótimos tempos de mistura para as vazões e cargas de sólidos estudadas e com baixo consumo de potência. A excelente mistura obtida provocou o contato dos reagentes com as enzimas imobilizadas obtendo ótimos graus de incorporação de ácidos graxos de cadeia média. Estes resultados permitem a seleção de um reator não utilizado para obtenção destes triglicerídeos estruturados, com resultados promissores na área de engenharia de bioprocessos.

REFERÊNCIAS

- ABED, S. M. et al. Synthesis of structured lipids enriched with medium-chain fatty acids via solvent-free acidolysis of microbial oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. **LWT**, v. 93, p. 306–315, 1 jul. 2018.
- ABOLPOUR HOMAEI, A. et al. Enzyme immobilization: an update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, n. 4, p. 185–205, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>.
- AL-BUSAFI, A. et al. Study on Mixing Time and Gas Hold-up in an Airlift Bioreactor. September, 2016. In: 3rd International Conference on Civil, Environment and Waste Management (CEWM-16) Proceeding Sept1.12-14-110-114.pdf, 2016 Dubai (UAE).
- ARAÚJO, M. E. M. B. DE et al. Synthesis of structured triacylglycerols enriched in n-3 fatty acids by immobilized microbial lipase. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1006–1013, 1 out. 2016.
- BADINO, A. C. ET AL. Biorreatores Pneumáticos : Simples e Eficientes. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 32, n. 1, p. 24–33, 2016.
- BAI, S. et al. Lipase-Catalyzed Synthesis of Medium-Long-Medium Type Structured Lipids Using Tricaprylin and Trilinolenin as Substrate Models. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, p. 377–389, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2185-9>.
- BANNARI, R.; BANNARI, A.; SELMA, B.; PROUXL, P. Mass transfer and shear in an airlift bioreactor: Using a mathematical model to improve reactor design and performance. **Chemical Engineering Science**, v. 66, p. 20157–2067, 2011.
- BARBOSA, O. et al. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 435–456, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>.
- BASSAN, N. **Modificação enzimática de óleos vegetais visando à obtenção de triglicerídeos dietéticos através do emprego de reatores de tanque agitado e leito fixo**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Unesp, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2017.
- BASSAN, N. et al. Enzymatic modification of grapeseed (*Vitis vinifera* L.) oil aiming to obtain dietary triacylglycerols in a batch reactor. **LWT**, v. 99, n. May 2018, p. 600–606, 2019.
- BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, p. 110607, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>.
- BELITZ, H.D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. Heidelberg, Berlin: Springer, 2009. 1070 p. ISBN: 978-3-540-69934– 7.
- CABALLERO, E. et al. Potential Use of Avocado Oil on Structured Lipids MLM-Type Production Catalysed by Commercial Immobilised Lipases. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e107749, 23 set. 2014.
- CALVO, F. et al. CFD simulation of multiphase (liquid–solid–gas) flow in an airlift column photobioreactor. **Acta Mechanica**, v. 228, n. 7, p. 2413–2427, 2017.
- CAO, Y. et al. Synthesis of Structured Lipids by Lipase-Catalyzed Interesterification of

Triacetin with Camellia Oil Methyl Esters and Preliminary Evaluation of their Plasma Lipid-Lowering Effect in Mice. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 3733–3744, 25 mar. 2013.

CERRI, M. O. **Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores Arlift de circulação interna geometricamente semelhantes**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009. Disponível em: <<http://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/3864>>. Acesso em: 6 abr. 2021.

CHANG, C. M. et al. Comparison of airlift and stirred tank reactors for immobilized enzyme reactions. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 2, p. 133–138, 1 jan. 1994.

CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Gas hold up in pneumatic bioreactors. **Chemical Engineering Journal**, v. 38, p. 149–152, 1988.

CHISTI, Y. **Airlift bioreactors**. London; New York: Elsevier Applied Science, 1989. ISBN-10: 1851663207.

CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**. v. 119, p. 497-520, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.01.017>.

CIPOLATTI, E. P. et al. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 99, p. 56-67, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.10.019>.

COZENTINO, I. DE S. C. et al. Enzymatic synthesis of structured lipids from grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil in associated packed bed reactors. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 0, n. 0, p. bab.2085, 27 dez. 2020. <https://doi.org/10.1002/bab.2085>.

DE CASTRO, H. F. et al. Modification of oils and fats by biotransformation. **Quimica Nova**, v. 27, n. 1, 146-156, fevereiro, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000100025&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 7 abr. 2021

DE MIRANDA, A. S.; MIRANDA, L. S. M.; DE SOUZA, R. O. M. A. Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 372-393, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.015>.

DURANTE, M. et al. Seeds of pomegranate, tomato and grapes: An underestimated source of natural bioactive molecules and antioxidants from agri-food by-products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 65–72, 1 out. 2017.

ESPERANÇA, M. N. **Contribuição ao Estudo do Desempenho de Biorreatores Arlift de Circulação Interna**: Análise das Condições Operacionais e da Geometria do Equipamento. 221 p. Universidade Federal de São Carlos Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, São Carlos, 2018b.

FERNANDES, P.; ROSELL, C. M. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research, Special Issue**, v. 2010, Article ID 862537, 2010. <https://doi.org/10.4061/2010/862537>.

FERREIRA-DIAS, S. et al. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. **Electronic Journal of Biotechnology**, [online]. v. 16, n.3, 38 p. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue3->

fulltext-5>. Acesso em: 6 abr. 2021

FREITAS, C.; TEIXEIRA, J. A. Hydrodynamic studies in an airlift reactor with an enlarged degassing zone. **Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 4, p. 267–279, 1998.

FU, C. et al. Performance of airlift bioreactors with net draft tube. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 4, p. 332–342, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00151-0).

GAVRILESCU, M.; UNGUREANU, F.; TUDOSE, R. Z. Triphasic external-loop airlift reactors. Hydrodynamic and dispersion studies. **Environmental Engineering and Management Journal**, v. 7, n. 3, p. 217–225, 2008.

HANSEN, K. B. et al. 2-Oleoyl Glycerol Is a GPR119 Agonist and Signals GLP-1 Release in Humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 9, p. E1409–E1417, 1 set. 2011.

HECK, J.; ONKEN, U. Characteristics of solid suspensions in a bubble column without and with draft tube. **Chemical Engineering & Technology**, v. 11, n. 1, p. 335–340, 1988.

HEIDOR, R. et al. The chemopreventive activity of butyrate-containing structured lipids in experimental rat hepatocarcinogenesis. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 2, p. 420–429, 1 fev. 2016.

HEIJNEN, J. J. et al. A simple hydrodynamic model for the liquid circulation velocity in a full-scale two- and three-phase internal airlift reactor operating in the gas recirculation regime. **Chemical Engineering Science**, v. 52, n. 15, p. 2527–2540, 1997.

HORCHANI, H. et al. Staphylococcal lipases: Biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 125–132, 1 abr. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.11.018>.

HUANG, Q. et al. Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms. **Engineering**, v. 3, n.3, p. 318–329, 2017. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.020>.

HUANG, Q. et al. Simulation of the light evolution in an annular photobioreactor for the cultivation of *Porphyridium cruentum*. **Chemical Engineering Science** v. 84, p.718–726, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2012.09.017>.

KANDA, A.; NAMIKI, F.; HARA, S. Enzymatic Preparation of Structured Oils Containing Short-Chain Fatty Acids. **Journal of Oleo Science**, v. 59, n. 12, p. 641–645, 2010.

KAVADIA, M. R. et al. Synthesis of designer triglycerides by enzymatic acidolysis. **Biotechnology Reports**, v. 18, p. e00246, 1 jun. 2018.

KOSSEVA, M. R. et al. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 5, p. 437–447, 1 dez. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.09.005>.

KOUZBOUR, S. et al. CFD simulation and analysis of reactive flow for dissolved manganese removal from drinking water by aeration process using an airlift reactor. **Journal of Water Process Engineering**, v. 36, n. November 2019, p. 101352, 2020.

LECHOWSKA, J. et al. Hydrodynamic studies in magnetically assisted external-loop airlift

reactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 362, p. 298–309, 15 abr. 2019.

LEE, Y. Y.; TANG, T. K.; LAI, O. M. Health benefits, enzymatic production, and application of medium- and long-chain triacylglycerol (mlct) in food industries: A review. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 8, ago. 2012.

LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6236–6249, 8 jul. 2013.

LIU, S. L. et al. Ultrasonic pretreatment in lipase-catalyzed synthesis of structured lipids with high 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol content. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 100–108, 1 mar. 2015.

LIVINGSTON, A. G.; ZHANG, S. F. Hydrodynamic behaviour of three-phase (gas-liquid-solid) airlift reactors. **Chemical Engineering Science**, v. 48, n. 9, p. 1641–1654, 1993.

LOTTENBERG, A. M. P. Importance of the dietary fat on the prevention and control of metabolic disturbances and cardiovascular disease. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 595–607, 2009.

LUO, L. et al. Hydrodynamics and mass transfer characteristics in an internal loop airlift reactor with sieve plates. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 91, n. 12, p. 2377–2388, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.06.002>.

MAIER, T. et al. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 551–559, 1 fev. 2009.

MALJAARS, J. et al. Effect of fat saturation on satiety, hormone release, and food intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 4, p. 1019–1024, 1 abr. 2009.

MANDENIUS, C.-F. **Bioreactors: Design, Operation and Novel Applications**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2016.

MENDES, A. A. et al. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 109–115, 1 jan. 2011.

MENDES, C. E. **Avaliação das condições hidrodinâmicas, de transferência de oxigênio e de cisalhamento em diferentes modelos e escalas de reatores pneumáticos**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

MOJOVIĆ, L. et al. *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification of palm oil midfraction in a gas-lift reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 2, p. 159–162, 1 fev. 1994.

MOREIRA, D. K. T. et al. Production and characterization of structured lipids with antiobesity potential and as a source of essential fatty acids. **Food Research International**, v. 99, p. 713–719, 1 set. 2017.

MOTA, D. A. et al. Production of low-calorie structured lipids from spent coffee grounds or olive pomace crude oils catalyzed by immobilized lipase in magnetic nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 307, p. 123223, 1 jul. 2020.

MOUDOUD, N. et al. Global hydrodynamic of hybrid external loop airlift reactor: Experiments and CFD modelling. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 129, p. 118–130, 1 jul. 2018.

NALDER, T. D. et al. A simplified method for active-site titration of lipases immobilised on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 113, p. 18–23, 1 jun. 2018.

NARAYANA, S. G. et al. Genetic analysis of groups of mid-infrared predicted fatty acids in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4731–4744, 1 jun. 2017.

NARWAL, S. K.; GUPTA, R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 4, p. 479-490, 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-012-1116-z>>. Acesso em: 7 abr. 2021

NUNES, P. et al. Production of MLM-type structured lipids catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase. **J Am Oil Chem Soc**, v. 88, n. 4, p. 473-480, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1702-y>.

NUNES, P. A. et al. Batch operational stability of immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase during acidolysis of virgin olive oil with medium-chain fatty acids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 67, p. 265–268, 15 ago. 2012.

OLIVEIRA, D. et al. Influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática de óleo de mamona. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 178–182, jun. 2004.

PALLA, C. A.; CARRÍN, M. E. Kinetics modeling of the acidolysis with immobilized *Rhizomucor miehei* lipases for production of structured lipids from sunflower oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p. 184-194, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.06.006>.

PARRISH, C. R; MOGENSEN, K.M. Essential Fatty Acid Deficiency. (NUTRITION ISSUES IN GASTROENTEROLOGY, SERIES #164). **Practical gastroenterology**, v. 41, n. 6, p. 37-44, June 2017. <https://practicalgastro.com/2017/06/01/essential-fatty-acid-deficiency/>. Acesso em: 7 abr. 2021.

PFLUCK, A. C. D. et al. Stability of lipases in miniemulsion systems: Correlation between secondary structure and activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 114, p. 7–14, 1 jul. 2018.

PHUAH, E. T. et al. Kinetic study on partial hydrolysis of palm oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 91–97, 1 jun. 2012.

PINO, M. S. et al. Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. **Chemical Engineering Journal**, v. 347, p. 119-136, 1 set. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.057>.

POPPE, J. K. et al. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 511-525, 1 set. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.011>.

PRADO, J. M. et al. Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 2, p. 249–257, 1 mar. 2012.

RAEISI, M. et al. Effect of carboxymethyl cellulose-based coatings incorporated with Zataria multiflora Boiss. essential oil and grape seed extract on the shelf life of rainbow trout fillets. **LWT**, v. 64, n. 2, p. 898–904, 1 dez. 2015.

RIBEIRO, M. M. M. **Interesterificação enzimática de lipídios estruturados a partir de óleo de girassol alto oléico com triacilgliceróis saturados de cadeia longa**. 162 p. 2016. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 2016.

RIOS, R. et al. Application of fats in some food products. **Food Sci. Technol.**, Campinas, 34, n. 1, p. 3-15, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014000100001>.

ROCKENBACH, I. I. et al. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MS n and LC-ESI-FTICR-MS. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 848–855, 1 out. 2012.

RODRÍGUEZ, J. et al. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v. 83, p. 41-59, 1 maio 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.032>.

SÄRKELÄ, R. et al. Mixing efficiency studies in an airlift bioreactor with helical flow promoters for improved reactor performance. **Chemical Engineering and Processing, Process Intensification**, v. 137, n. February, p. 80–86, 2019.

SIEGEL, M. H.; ROBINSON, C. W. Application of airlift gas-liquid-solid reactors in biotechnology. **Chemical Engineering Science**, v. 47, n. 13–14, p. 3215–3229, 1 set. 1992.

SIVAKANTHAN, S.; MADHUJITH, T. Current trends in applications of enzymatic interesterification of fats and oils: A review. **LWT**, v. 132, 109880, 1 out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109880>.

TAO, J. et al. Experimental investigation of hydrodynamics and mass transfer in a slurry multistage internal airlift loop reactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 386, n. September 2019, p. 122769, 2020.

TEERAPATSAKUL, C. et al. Repeated batch for dye degradation in an airlift bioreactor by laccase entrapped in copper alginate. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 120, p. 52–57, 2017.

TRÄGER, M. et al. Comparison of airlift and stirred reactors for fermentation with *Aspergillus niger*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 68, n. 2, p. 112–116, 1 jan. 1989.

TRAN, D. T.; CHEN, C. L.; CHANG, J. S. Continuous biodiesel conversion via enzymatic transesterification catalyzed by immobilized Burkholderia lipase in a packed-bed bioreactor. **Applied Energy**, v. 168, p. 340–350, 15 abr. 2016.

VAFEIADOU, K. et al. Replacement of saturated with unsaturated fats had no impact on vascular function but beneficial effects on lipid biomarkers, E-selectin, and blood pressure: results from the randomized, controlled Dietary Intervention and VAScular function (DIVAS) study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 1, p. 40–48, 1 jul. 2015.

WANG, X. et al. Synthesis of 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol by enzymatic acidolysis in a solvent-free system. **Food Chemistry**, v. 228, p. 420–426, 1 ago. 2017.

WANG, Y. et al. Lipase-catalyzed acidolysis of canola oil with caprylic acid to produce medium-, long-and medium-chain-type structured lipids. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 4, p. 707-712, Oct. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.02.003>.

WANG, Y. et al. Lipase-catalyzed acidolysis of canola oil with caprylic acid to produce medium-, long- and medium-chain-type structured lipids. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 4, p. 707–712, out. 2012.

WEUSTER-BOTZ, D. Bioreaction Engineering - Vol. 2: Characteristic Features of Bioreactors. Von K. Schügerl . John Wiley & Sons, Chichester - New York - Brisbane 1991. XXIV, 393 S., zahlr. Abb. u.Tab., geb., US-\$ 95,-. **Chemie Ingenieur Technik**, v. 64, n. 5, p. 490–490, 1 maio 1992.

WILLIBALDO SCHMIDELL, FACCIOTTI, M, C. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, Willibaldo. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. v.2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

XIE, W.; HUANG, X. Synthesis of biodiesel from soybean oil using heterogeneous KF/ZnO catalyst. **Catalysis Letters**, v. 107, n. 1–2, p. 53–59, fev. 2006.

XU, X. Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 289-304, 2003.

YAKUBU-GUMERY, F. Mixing characteristics of draft tube airlift bioreactor using the electrical resistance tomography. 2010. Theses and dissertations. Paper 884. : <https://digital.library.ryerson.ca/islandora/object/RULA%3A1369/datastream/OBJ/view>.

YANG, T. et al. Hydrodynamics and mass transfer in an internal airlift slurry reactor for process intensification. **Chemical Engineering Science**, v. 184, p. 126–133, 20 jul. 2018.

YAZDIAN, F. et al. Investigation of gas properties, design, and operational parameters on hydrodynamic characteristics, mass transfer, and biomass production from natural gas in an external airlift loop bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 64, n. 10, p. 2455–2465, 2009.

ZHANG, Y. et al. Self-assembly of lipase hybrid nanoflowers with bifunctional Ca²⁺ for improved activity and stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 132, 109408, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109408>.

ZHAO, X. Y. et al. Structured lipids enriched with unsaturated fatty acids produced by enzymatic acidolysis of silkworm pupae oil using oleic acid. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 117, n. 6, p. 879–889, 1 jun. 2015.

ZIEGENHEIN, T. et al. On the hydrodynamics of airlift reactors, Part I: Experiments. **Chemical Engineering Science**, v. 150, p. 54–65, 21 ago. 2016.