

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



ANDRÉIA FÁTIMA ZANETTE

ESTUDO DE SISTEMAS REACIONAIS ENZIMÁTICOS DE PRODUTOS QUÍMICOS
COM ALTO VALOR DE MERCADO

Maringá

2014

ANDRÉIA FÁTIMA ZANETTE

ESTUDO DE SISTEMAS REACIONAIS ENZIMÁTICOS DE PRODUTOS QUÍMICOS
COM ALTO VALOR DE MERCADO

Tese apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química, área de Desenvolvimento de Processos – Universidade Estadual de Maringá.

Orientadores:

Dr. Lúcio Cardozo Filho
Dr^a Ivana Corrêa Ramos Leal
Dr. Rodrigo O. M. A. de Souza

Maringá

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

Zanette, Andréia Fátima
Z28e Estudo de sistemas reacionais enzimáticos de
produtos químicos com alto valor de mercado /
Andréia Fátima Zanette. -- Maringá, 2014.
xx, 109 f. : il. color., figs., tabs., retrs.

Orientador : Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho.
coorientador : Prof.^a Dr.^a Ivana Corrêa Ramos
Leal.

Coorientador : Prof. Dr. Rodrigo O. M. A. Souza.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de
Engenharia Química, Programa de Pós-Gaduação em
Engenharia Química, 2014.

1. Esterificação - Epoxidação - Lipases - Micro
emulsões. 2. Biocatalisador - Lipases. 3. Meio
pressurizado - Dióxido de carbono - Equilíbrio de
fases. I. Cardozo Filho, Lúcio, orient. II. Leal,
Ivana Corrêa Ramos, coorient. III. Souza, Rodrigo O.
M. A de, coorient. IV. Universidade Estadual de
Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de
Engenharia Química. Programa de Pós-Gaduação em
Engenharia Química. V.Título.

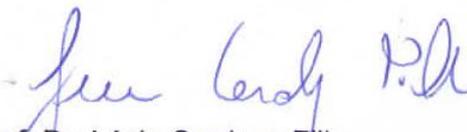
CDD 21.ed.660.6

Zss-2076

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Tese de Doutorado apresentada por Andréia Fátima Zanette perante a Comissão Julgadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em 24 de fevereiro de 2014.

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Luiz Stragevitch
Membro



Profª Drª Andresa Carla Feihrmann
Membro



Prof. Dr. Edson Antonio da Silva
Membro



Prof. Dr. Marcelo Fernandes Vieira
Membro

*Dedico esse trabalho à minha mãe Ildes e ao meu pai Severino (in memoriam),
com todo meu amor e gratidão.*

*“À medida que os homens se modificam em natureza,
também se modificam os seus pensamentos.”*

Empédocles

Agradecimentos

À minha família, que sempre apoiou e incentivou a concretizar meus objetivos. Mesmo nos momentos difíceis, compreendeu a necessidade de algumas ausências físicas, porém, em pensamento sempre estivemos unidos.

Ao meu esposo, Cleberson, obrigada por tudo! Sem ti, tudo teria sido mais difícil.

Ao professor Lúcio, obrigada por compartilhar parte de seu conhecimento, que foram essenciais para a realização deste trabalho, e permitiu meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores Rodrigo e Ivana, pelos conhecimentos repassados, receptividade e apoio durante o trabalho.

Ao doutor Xenakis e equipe, pelo apoio recebido durante o período que estive em doutorado sanduíche.

Aos colegas de trabalho e amigos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho com ideias, discussões e motivações sempre que necessário.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

À UEM e a CAPES, pelo suporte e apoio financeiro.

RESUMO

ZANETTE, Andréia Fátima. **Estudo de Sistemas Reacionais Enzimáticos para Produção de Produtos Químicos de Alto Valor de Mercado**. Orientadores: Lúcio Cardozo Filho, Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza e Ivana Correa Ramos Leal. Maringá: UEM/Pós-Graduação em Engenharia Química, 2014. Tese de doutoramento (Doutorado em Desenvolvimento de Processos).

O objetivo do presente trabalho consistiu na produção enzimática de dois produtos de alto valor de mercado: o mono-oleato de glicerila (mono-oleína) e o ácido epoxioleico. A mono-oleína foi produzida pela reação de esterificação do ácido oleico com solketal (R,S-1,2 Isopropylidenglycerol) utilizando a lipase Lipozyme RM IM como biocatalisador. A reação foi conduzida em condições supercríticas. Primeiramente, o comportamento dos sistemas binário (CO₂ + solketal) e ternário (CO₂ + solketal + ácido oleico) foi estudado a fim de prever a solubilidade do sistema. Posteriormente, foi realizado um planejamento fatorial completo, com triplicata no ponto central, onde foi avaliada a influência de três variáveis independentes: temperatura (33 a 67°C); razão molar ácido oleico:solketal (1:0,1 a 1:6,4) e concentração da enzima (0,1 a 13% (m/m)), mantendo-se fixo o tempo em 3 horas de reação e a densidade do CO₂ em 718 kg/m³. Ao finalizar o planejamento, o tempo reacional foi avaliado. A condição otimizada correspondeu ao tempo de 1 hora de reação, 60°C, 1% (m/m) de concentração de enzima e razão molar ácido oleico:solketal de 1:5, atingindo rendimentos de aproximadamente 70% em produto. O segundo produto de interesse industrial, o epóxido, foi obtido pela reação de epoxidação do ácido oleico com o acetato de etila utilizando peróxido de hidrogênio como agente oxidante. A lipase *Candida antarctica B* foi imobilizada em microemulsões baseadas em organogéis com hydroxyl-propyl-methyl cellulose (HPMC) e utilizada como biocatalisador. A epoxidação foi realizada em baixa pressão e em condições supercríticas, com CO₂ como solvente. Em condições ambientes, a reação foi otimizada por meio de um planejamento fatorial 2³ com triplicata no ponto central, que totalizou 11 experimentos. As seguintes variáveis independentes foram consideradas: temperatura (35-55°C), concentração de ácido

oleico (50-100 mmol/L) e concentração de enzima (0,4-0,8 mg/mL microemulsão). A quantidade de H₂O₂ foi mantida fixa em 1,2 mL, pois em estudos anteriores observou-se que um excesso de oxidante não afetou a estrutura da enzima. A condição otimizada correspondeu ao tempo de 48 horas de reação, 35°C, 50 mmol/L de ácido oleico e concentração de enzima de 0,8 mg/mL de microemulsão atingindo rendimentos em epóxidos de aproximadamente 84%. O estudo da cinética da reação permitiu observar que a reação é lenta, atingindo 10% em rendimentos com 1 hora de reação. Para realizar a reação de epoxidação em condições supercríticas, o comportamento do sistema ternário (CO₂ + acetato de etila + ácido oleico) foi primeiramente avaliado a fim de prever a solubilidade do sistema. Em seguida, foi realizada a reação, que não apresentou resultados satisfatórios. Foi realizado um planejamento experimental, em que o rendimento da reação foi em torno de 10% em todas as condições avaliadas. O baixo rendimento obtido na reação pode estar relacionado pela grande quantidade de água presente no sistema, e o CO₂ em condições supercríticas tem sua solubilidade bastante limitada em sistemas aquosos.

Palavras-chave: Lipases. Mono-oleína. Epóxido. Microemulsões. Fluido Supercrítico. Dióxido de Carbono. Equilíbrio de Fases.

ABSTRACT

ZANETTE, Andréia Fátima. **Study of Reactive Enzyme Systems to Produce High Value Chemicals Market**; Supervisors: Lúcio Cardozo Filho, Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza and Ivana Correa Ramos Leal. Maringá: UEM/Pós-Graduação em Engenharia Química, 2014. Doctoral Thesis (Chemical Engineering Process Development).

The aim of this work was the enzymatic production of two high-value products to market: glyceryl monooleate (monoolein) and epoxioleic acid. The mono-olein was produced by esterification of oleic acid with solketal (D,L-,1,2 Isopropylidenglycerol) using Lipozyme RM IM lipase as biocatalyst. The reaction was carry out in supercritical conditions. First, the behavior of binary (CO₂ + solketal) and ternary (CO₂ + solketal + oleic acid) systems was study to predict the solubility of the system. Afterwards we performed a full factorial design with three replications at the center point where the influence of three independent variables was evaluated: temperature (33-67°C), molar ratio oleic acid:solketal (1:0.1 to 1:6,4) and enzyme concentration (0.1 to 13% (w/w)), keeping constant the time at 3 hour reaction and the density of the CO₂ in 718 kg/m³. Finally, the reaction time was evaluated. The optimized condition corresponds to the time of 1 hour of reaction, 60°C, 1% (w/w) of enzyme concentration and molar ratio oleic acid:solketal in 1:5, reaching yields of about 70 % in the product. The second product of industrial interest, the epoxide, was obtained by epoxidation reaction of oleic acid with ethyl acetate using hydrogen peroxide as oxidizing agent. *Candida antarctica B* lipase was immobilized in microemulsion based organogels with cellulose hydroxylpropylmethyl cellulose (HPMC) was used as biocatalyst. The epoxidation was carried out at low pressure and in supercritical conditions, using CO₂ as solvent. At ambient conditions, the reaction was optimized using a 2³ factorial design with center point in triplicate, totaling 11 experiments. The following independent variables were considered: temperature (35-55°C), concentration of oleic acid (50-100 mmol/L) and amount of enzyme (0.4-0.8 mg E/mL microemulsion). The amount of H₂O₂ was fixed in 1.2 mL, given that in previous studies it can be seen that an excess of oxidant does not affect the structure of the

enzyme. The optimized condition corresponds to the time of 48 hour reaction, 35°C, 50 mmol/L oleic acid and 0.8 mg E/mL microemulsion reaching yields about 84 % in epoxides. The study of reaction kinetics allowed us to observe that the reaction is slow, reaching 10 % in income after 1 hour of reaction. To conduct the epoxidation reaction in supercritical conditions, the behavior of the ternary system (ethyl acetate + CO₂ + oleic acid) was first assessed in order to predict the solubility of the system. Then, the reaction, which did not show satisfactory results, was evaluated. An experimental design was performed and the yield remained around 10 % for all conditions evaluated. A possible negative influence for this result is the large amount of water present in the system, and CO₂ under supercritical conditions has very limited solubility in aqueous systems.

Keywords: Lipases. Mono-olein. Epoxy. Microemulsions. Supercritical Fluid. Carbon Dioxide. Phase Equilibria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura de uma proteína	9
Figura 2. Mecanismo da atividade enzimática.....	10
Figura 3. Diagrama de fases de uma substância pura.	17
Figura 4. Representação esquemática de um surfactante formado por uma cabeça hidrofílica (polar) e uma cadeia alquil, a cauda hidrofóbica (apolar)	24
Figura 5. Rota enzimática para a síntese de mono-oleína.	26
Figura 6. Representação esquemática da alcoólise de triglicerídeos usando KOH como catalisador seguido pela epoxidação do ácido oleico.....	29
Figura 7. Representação esquemática da epoxidação químio-enzimática do ácido oleico.....	29
Figura 8. Representação esquemática da formação de uma microemulsão baseada em organogel em que a lipase está alojada.	32
Figura 9. Aparato experimental..	41
Figura 10. Diagrama da composição-pressão do sistema {CO ₂ (1) + solketal(2) } para T = 35°C (●); 45°C (■); 55°C (◆); 65°C (▲).	54
Figura 11. Diagrama da pressão-composição do sistema {CO ₂ (1) + (0,75 solketal(2) + 0,25 ácido oleico(3))} a T = 35°C (●); 45°C (■); 55°C (◆); 65°C (▲). Região onde ocorre a reação (*).	56
Figura 12. Comparação do diagrama pressão-composição entre os sistemas {CO ₂ (1) + solketal(2)} a T = 35°C (○); 65°C (□) e {CO ₂ (1) + (0,75 solketal(2) + 0,25 ácido oleico(3))} a T = 35°C (●); 65°C (■).	57

Figura 13. Pressões experimentais e calculadas no ponto de bolha para o sistema binário {CO ₂ (1) + solketal(2)} a diferentes temperaturas: ●, 35°C; ◆, 45°C; ▲, 55°C; ■, 65°C.	59
Figura 14. Pressões experimentais e calculados no ponto de bolha para o sistema ternário {CO ₂ (1) + solketal(2) + ácido oleico(3)} em várias temperaturas: ●, 308 K; ◆, 318 K; ▲, 328 K; ■, 338 K.....	60
Figura 15. Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos das variáveis.....	62
Figura 16. Superfícies de respostas em função do rendimento em mono-oleína para: (a) Temperatura versus Enzima; (b) Razão AO:solketal versus Temperatura; (c) Razão AO:solketal versus Enzima.	66
Figura 17. Curva cinética da reação de esterificação do ácido oleico catalisada pela Lipozyme em ScCO ₂	67
Figura 18. MEV da Lipozyme RM IM. Visão geral da lipase não usada (a), 200x; detalhe da enzima não usada (b), 500x, detalhe da enzima após uso na reação (c), 500x.....	68
Figura 19. Estimativa dos efeitos lineares e de interação das variáveis.....	74
Figura 20. Análise da influência do tempo no rendimento da reação.	75
Figura 21. Efeito da temperatura na velocidade inicial da epoxidação do ácido oleico com H ₂ O ₂ catalisado pela lipase <i>C. antarctica B</i> imobilizada em organogel HPMC/lecitina.....	77
Figura 22. Arrhenius plot para a reação de epoxidação catalisada pela lipase CalB imobilizada microemulsões de lecitina com HPMC em organogel. A energia de ativação aparente calculada é de 41 kJ mol ⁻¹	78
Figura 23. Resultado do reuso da lipase CalB imobilizada em organogéis na epoxidação do ácido oleico.	79

Figura 24. Diagrama pressão-composição do sistema {CO₂(1) + (0,75 acetato de etila(2) + 0,25 ácido oleico(3)) a T = 35°C (●); 45°C (■); 55°C (◆); 65°C (▲). ...83

Figura 25. Diagrama pressão-composição do sistema {CO₂(1) + (0,90 acetato de etila(2) + 0,10 ácido oleico(3)) a T = 35°C (●); 45°C (■); 55°C (◆); 65°C (▲). ...84

Figura 26. Diagrama pressão-composição: comparação com dados da literatura. Este trabalho, sistema ternário {CO₂(1) + (0,995 acetato de etila(2) + 0,005 ácido oleico(3))}: ●, 35°C; ■, 45°C; ◆, 55°C; ▲, 65°C. SIMA et al. (2012), sistema binário (CO₂(1) + acetato de etila(2)): ○, 50°C; □, 60°C; ◇, 70°C; △, 80°C.85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aplicações de enzimas em processos industriais e ambientais.....	7
Tabela 2. Classificação das enzimas, de acordo com a International Enzyme Commission.....	11
Tabela 3. Especificidade de algumas enzimas.	14
Tabela 4. Propriedades críticas de alguns fluidos supercríticos utilizados como meios reacionais.....	18
Tabela 5. Exemplos de interface envolvendo uma fase líquida.	24
Tabela 6. Variáveis e níveis avaliados no DCCR.....	44
Tabela 7. Valores reais e codificados avaliados no DCC.....	50
Tabela 8. Valores reais e codificados avaliados no DCC.....	51
Tabela 9. Dados de equilíbrio de fase ELV do sistema CO ₂ (1) + solketal(2).....	53
Tabela 10. Dados de equilíbrio de fase para o sistema {CO ₂ (1) + (0,75 solketal(2) + 0,25 ácido oleico(3))}.....	55
Tabela 11. Temperaturas críticas, pressões críticas, fatores acêntricos e parâmetros de interação binária usados nos cálculos.....	58
Tabela 12. Valores reais e codificados e resposta do Planejamento.....	61
Tabela 13. Análise de Variância (ANOVA) referente à produção de mono-oleína....	63
Tabela 14. Condições avaliadas para otimizar a reação.....	64
Tabela 15. Influência da velocidade de adição de H ₂ O ₂ no rendimento da reação...	70

Tabela 16. Valores reais e codificados e resposta do Planejamento.....	71
Tabela 17. Efeitos dos parâmetros estimados no DCC 2 ³ para a epoxidação do ácido oleico catalisado pela CalB imobilizada em HPMC MBGs.....	73
Tabela 18. Análise de Variância para validação do modelo matemático (ANOVA). .	74
Tabela 19. Dados de equilíbrio de fase para o sistema ternário.....	81
Tabela 20. Valores reais e codificados e resposta do Planejamento.....	86
Tabela 21. Testes para avaliar o rendimento da reação de epoxidação em scCO ₂ ..	87

SÍMBOLOS E SIGLAS

AO	Ácido Oleico
(A/O)	Micelas água em óleo
AOT	Bis-(2-etilexil) sulfosuccinato de sódio
CaIB	Lipase <i>Candida antarctica B</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
DCC	Delineamento Composto Central
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
ELV	Equilíbrio Líquido Vapor
GC	Cromatografia Gasosa
GC/MS	Cromatógrafo Gasoso acoplado à Espectroscopia de Massa
HPMC	Hidroxipropilmetil cellulose
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
LC-MS/MS	Cromatógrafo Líquido acoplado à Espectroscopia de Massa
LL	Líquido-Líquido
LV	Líquido-Vapor
MBG	Microemulsões Baseadas em Organogéis
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MSTFA	N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide
PB	Ponto de Bolha
P _c	Pressão crítica
PO	Ponto de Orvalho
scCO ₂	Dióxido de Carbono supercrítico
SCF	Fluido Supercrítico
T _c	Temperatura crítica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 BIOCATÁLISE	6
3.2 CATALISADORES BIOLÓGICOS: ENZIMAS	8
3.2.1 Imobilização de Enzimas.....	11
3.2.2 Lipases.....	12
3.2.3 Aplicações das lipases como biocatalisadores.....	15
3.3 REAÇÕES ENZIMÁTICAS EM FLUÍDO SUPERCRÍTICO.....	16
3.3.1 Equilíbrio de Fases.....	20
3.4 MONO-OLEÍNA.....	22
3.4.1 Aplicações, características e formas de obtenção da mono-oleína.....	22
3.5 EPÓXIDOS.....	28
3.5.1 Aplicações, características e formas de obtenção dos epóxidos	28
3.5.2 Microemulsões	31
3.5.3 Microemulsões em fluido supercrítico	35
3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 OBTENÇÃO DA MONO-OLEÍNA.....	38
4.1.1 Especificação dos Materiais	38

4.1.2 Procedimento Experimental	39
4.1.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	39
4.1.2.2 Determinação do rendimento da reação	39
4.1.2.3 Aparato experimental utilizado no equilíbrio de fases	40
4.1.2.4 Aparato experimental utilizado na reação de esterificação	42
4.1.2.5 Estudo das condições de operação.....	43
4.2 OBTENÇÃO DO EPÓXIDO	44
4.2.1 Materiais.....	45
4.2.2 Procedimento Experimental	46
4.2.2.1 Preparo da microemulsão	46
4.2.2.2 Preparo das microemulsões baseadas em organogéis.....	46
4.2.2.3 Síntese enzimática do epóxido do ácido oleico.....	46
4.2.2.4 Determinação do rendimento da reação	47
4.2.2.5 Estudo das condições de operação.....	49
4.2.2.6 Reuso do catalisador.....	51
5. RESULTADOS: PRODUÇÃO DE MONO-OLEÍNA.....	52
5.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1.1 Dados de equilíbrio de fases	52
5.1.1.1 Sistema binário CO ₂ + solketal	52
5.1.1.2 Sistema Ternário	55
5.1.2 Modelagem.....	58
5.1.3 Planejamento experimental	60
5.1.4 Análise da estrutura dos biocatalisadores em MEV	68
6. REAÇÃO DE EPOXIDAÇÃO	69
6.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
6.1.1 Reação de epoxidação a baixa pressão.....	69
6.1.1.1 Efeito da temperatura de incubação na velocidade inicial e cálculo da energia de ativação E _a	76
6.1.1.2 Reuso da enzima.....	78
6.1.2 Reação de epoxidação em condições supercríticas.....	79

6.1.2.1 Dados de Equilíbrio de fases.....	80
6.1.2.2 Planejamento experimental	85
7. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	89
7.1 CONCLUSÕES	89
7.2 SUGESTÕES	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. INTRODUÇÃO

As lipases (glicerol-ester-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam na hidrólise de acilgliceróis liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases [DALLA-VECCHIA, 2004; KAZLAUSKAS E BORNSCHEUR, 2008]. Desempenham um importante papel nos processos industriais enzimáticos, para os quais se estima que 80% de todas as enzimas industriais são membros desta classe. Apresentam grande afinidade por um número grande de substratos, geralmente são biocatalisadores eficazes devido à elevada atividade específica pelo substrato, baixo impacto ao ambiente, grupo funcional e estereoseletividade [LIAW e LIU, 2010; OLIVEIRA et al., 2006].

Grande número de trabalhos tem sido voltados para utilização das lipases na transformação de moléculas de ácidos graxos de elevada massa molecular, tal como o ácido oleico [LEE et al., 2002]. As lipases podem catalisar eficazmente o processo de esterificação e epoxidação de ácidos graxos, em condições brandas de reação, a baixa pressão, além de poder ser utilizado em condições supercríticas, com solventes tais como o dióxido de carbono [CENI et al., 2010; HABULIN et al., 2008].

O mono-oleato de glicerila, ou mono-oleína, pertence à classe dos monoacilgliceróis e, como tal, apresenta um balanço hidrofílico-hidrofóbico, que lhe confere propriedades emulsificantes e surfactantes não-iônicos, além de estabilizantes e antiespumantes de grande importância na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica [KULKARNI et al., 2011]. Exemplos de alimentos processados, que são emulsões, incluem creme de leite, molhos para salada, salsicha, bolos, chocolate, recheios e produtos instantâneos.

O mercado global de surfactantes está projetado para atingir 2,3 milhões de toneladas até 2015, impulsionado pelo uso de emulsificantes em alimentos e bebidas, e pelo uso crescente em produtos de cuidados pessoais. Os avanços tecnológicos na indústria de processamento de alimentos deverão impulsionar o crescimento do mercado nos próximos anos [INSUMOS, 2012].

A produção da mono-oleína pode ser realizada a partir da hidrólise parcial de óleos vegetais catalisada por lipases, e também pela esterificação do glicerol com o

ácido oleico, tendo como principais dificuldades a insolubilidade do glicerol em solventes orgânicos e a formação de diacilgliceróis [KULKARNI et al., 2011]. Trabalhos atuais relatam a utilização preferencial do solketal em substituição ao convencional glicerol [MACHADO et al., 2011]. O solketal é um álcool primário obtido a partir da reação do glicerol com a acetona e tende a diminuir o impedimento estérico causado pelo álcool [ITABAIANA JR et al., 2012].

O ácido epoxioleico é um produto de alto valor agregado, e entre as aplicações importantes de óleos vegetais epoxidados e ésteres de ácido graxos são como agente plastificante para o cloreto de polivinilo (PVC) e outros materiais plásticos, como diluentes reativos para tintas e como intermediários para a produção de poliuretano-poliol [ORELLANA-COCA et al., 2005].

O produto de interesse (epóxido) é obtido por meio de um processo de epoxidação seletiva, que envolve a utilização de uma lipase para catalisar a formação do perácido a partir de H_2O_2 e do ácido graxo correspondente. O perácido, o qual transfere o oxigênio para as duplas ligações, é formado in situ a partir de peróxido de hidrogênio [CORREA et al., 2012].

Para a imobilização das enzimas são utilizados organogéis baseados em microemulsões de água-em-óleo. Nestas microemulsões, as enzimas ficam aprisionadas no núcleo da água da emulsão, podendo manter a sua atividade e aumentar a sua estabilidade no interior da matriz do gel. A importância da microemulsão baseada em organogéis (MBGs) se apoia em seus potenciais em inúmeras aplicações biotecnológicas. Um exemplo importante é a utilização de vários sistemas de microemulsões de lipase em reações hidrolíticas [ZOUNPANIOTI et al., 2010].

A catálise enzimática muitas vezes fornece uma alternativa mais seletiva e favorável ao meio ambiente do que a catálise química. As enzimas são consideradas biocatalisadores efetivos por ter alta especificidade ao substrato, grupo funcional específico e estereoespecificidade em meio aquoso [MAMURO et al., 2001]. As reações enzimáticas propiciam condições amenas de operação, facilidade de separação e purificação dos produtos [JIANG et al., 2013].

Em busca de substitutos aos usuais solventes orgânicos, tem-se dado atenção especial aos fluidos supercríticos. Tal técnica se beneficia da elevada difusividade apresentada por fluidos no estado supercrítico para obter-se elevados

rendimentos em diversos tipos de reação. Aliado a esta vantagem, está o benefício de ser uma técnica limpa, de fácil separação dos produtos, reduzindo significativamente os danos causados ao meio ambiente [HABULIN et al., 2008].

O processo de produção da mono-oleína e do ácido epoxioleico utilizando enzimas e a reação em condições supercríticas utilizando dióxido de carbono apresenta-se como alternativa ao processo convencional de produção, uma vez que as condições reacionais (temperatura) utilizadas são brandas, em menor tempo de reação, com um aumento no rendimento e na seletividade do produto. Além disso, a separação do produto é facilitada, uma vez que em condições atmosféricas, o dióxido de carbono é completamente disperso no ambiente.

Com base nos aspectos expostos, este trabalho visa explorar o potencial da utilização de dióxido de carbono em condições supercríticas para a produção de produtos de interesse industrial. Tais reações foram conduzidas em condições supercríticas e lipases foram utilizadas como biocatalisadores. As técnicas utilizadas vêm ao encontro com o foco das pesquisas e do direcionamento das indústrias nos dias atuais: redução do impacto ambiental.

2. OBJETIVOS

Esta tese foi um trabalho conjunto entre os Departamentos de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro e do National Hellenic Research, em Atenas, Grécia.

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho consiste na produção enzimática de dois produtos de alto valor agregado: mono-oleína e ácido epoxioleico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Produção enzimática de mono-oleína em dióxido de carbono supercrítico:

- i. Obtenção dos dados de transição de fase para os sistemas binário (CO₂ e solketal) e ternário (CO₂ + solketal + ácido oleico);
- ii. Avaliar o desempenho do biocatalisador imobilizado numa reação de esterificação em dióxido de carbono em condições supercríticas e verificar a influência das condições reacionais no rendimento através de um planejamento de experimentos DCC;
- iii. Otimizar as condições reacionais.

Produção enzimática do ácido epoxioleico em baixa pressão:

- i. Validação do método de análise de epóxidos em GC e LC-MS/MS;
- ii. Avaliar o desempenho da aplicação de microemulsões baseadas em organogéis em uma reação de formação de epóxido a partir do ácido oleico, bem como estudar as condições reacionais no rendimento em epóxido por meio de um planejamento de experimentos DCC;
- iii. Otimizar as condições reacionais;
- iv. Estudar o efeito das variáveis na cinética da reação.

Produção enzimática do ácido epoxioleico em dióxido de carbono supercrítico:

- i. Obtenção dos dados de transição de fase para o sistema ternário (CO₂ + acetato de etila + ácido oleico);
- ii. Validação do método de análise de epóxidos em GC;
- iii. Estudar o efeito das variáveis no rendimento da reação por meio de um planejamento experimental.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão sobre o estado da arte referente às reações enzimáticas de esterificação e epoxidação. Levando em consideração os objetivos delineados para este trabalho, será dada ênfase especial à utilização de enzimas em duas reações químicas específicas e conduzidas em condições supercríticas.

3.1 BIOCATÁLISE

A biocatálise é relativamente uma tecnologia verde. Reações enzimáticas podem ocorrer na presença de água a temperatura ambiente e pH neutro, sem a necessidade de condições extremas, economizando energia para o processo. Hoje, as biotransformações altamente químico-, regio- e estereosseletivas podem simplificar os processos de fabricação e torná-los ainda mais economicamente atrativos e ambientalmente aceitáveis [LIESE et al., 2000].

Nos últimos anos, a utilização de enzimas em processos industriais tem aumentado consideravelmente (Tabela 1). O “Fungal Genomics Project” é um centro de pesquisa que identifica enzimas fúngicas para aplicações industriais e ambientais. Este centro prevê a identificação de mais de 70.000 genes de 15 novas espécies de fungos, identificados por meio da sequência genética de cada fungo [FUNGAL GENOMICS PROJECT, 2013].

O mercado de enzimas está dividido em enzimas industriais (enzimas técnicas, enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para pesquisa) [MONTEIRO e SILVA, 2009].

Tabela 1. Aplicações de enzimas em processos industriais e ambientais.

Processo industrial/ambiental	Enzimas	Aplicações/Substratos
Fabricação de celulose e papel	Lacases, celulasas, pectinases, xilanases, esterases, lipases	Lignina, celulose e hemicelulose
Tratamento e descontaminação de água	Lignina-peroxidases, manganese-peroxidases, lacases, citocromo P450, esterases, lipases	Cloroanilina, clorobifenil, clorofenóis, DDT, plásticos, corantes heterocíclicos, nitrotolueno, óleo diesel
Liquefação do carvão	Peroxidases, lacases, esterases	Carvão
Testes ecotoxicológicos	Lignina-peroxidases, citocromo P-450, monoxigenases, glutathione-transferases	Biossensores, biomarcadores, modelo do metabolismo xenobiótico dos mamíferos
Detergentes domésticos/industriais	Proteases, lipases, amilases, celulasas	Lavanderia e limpeza de louça em uma ampla faixa de T
Processamento de alimentos e funcionalidades	Proteases, invertases, alfa-amilases, pectinases, glucomilases, celulasas, xilanases, lactases	Clarificação e extração de sucos, melhoramento do sabor, extração de carne, produção de açúcar, textura de massas
Alcool combustível	Celulasas, amilases, glucoamiasas, xilanases, proteases	Amido ou açúcar com base de matérias-primas vegetais em álcool
Panificação	Alfa-amilases, oxidases, lipases, lipoxigenases, xilanases, proteases	Maximizar a fermentação, condicionamento, branqueamento e fortalecimento da massa
Fermentação	Alfa-acetolactato-decarboxilases, beta-gluconases, celulasas, xilanases, proteases	Reduzir o tempo de maturação da cerveja, melhorar o rendimento e filtrabilidade, extração de proteína
Vinificação	Pectinases, glucosidases, celulasas	Liberação de compostos de cor e aroma, clarificação do vinho
Alimentação animal	Fitases, xilanases, beta-gluconases, alfa-amilases, proteases, endo-xilanases	Melhorar a digestibilidade
Farmacêutico e química fina	Citochrome P450 oxigenases, glutathione transferases, lactases, alfa-galactosidases	Biotransformação de antibióticos, antitumorais, esteróides, etc
Têxtil	Celulasas, proteases, amilases, catalases	Remoção de corante, degomagem
Processamento do couro	Proteases e lipases	Remoção de gordura e cabelo da pele e do couro cru
Cuidados pessoais	Proteases, glucoamilases, glucose-oxidases, catalases	Pasta de dente, solução de limpeza para lentes de contato

Fonte: Fungal Genomics Project (2013).

A biotecnologia envolve a utilização de células microbianas e enzimas na obtenção de produtos químicos, incluindo aminoácidos, medicamentos, e polímeros e tem atraído considerável atenção [SUDHEESH et al., 2010; SOETAERT e

VANDAMME, 2006]. É aplicada para a produção sustentável de produtos químicos provenientes de fontes renováveis usando células vivas e suas enzimas [LI et al., 2012; LI et al., 2011; SEVERAC et al., 2011, STEPHANOPOULOS, 2007], contribuindo assim para a realização de processos limpos com mínima geração de resíduos e diminuição do consumo de energia.

Além da produção de produtos químicos úteis, produtos químicos tóxicos podem ser removidos por micro-organismos. A perspectiva é de que o desenvolvimento das pesquisas conduza à melhoria das proteínas e das técnicas utilizadas, fazendo com que estes biocatalisadores sejam mais eficazes, sempre em busca de uma sociedade sustentável [KURODA e UEDA, 2011].

3.2 CATALISADORES BIOLÓGICOS: ENZIMAS

As enzimas são proteínas que podem ser usadas como catalisadores biológicos. A catálise das reações biológicas é imprescindível para a conservação, reprodução dos seres vivos e transformações químicas, uma vez que a maioria das reações que ocorrem nos organismos tem, na ausência de catalisadores, velocidades muito baixas. As reações catalisadas por enzimas têm velocidades altas, entre 10^6 e 10^{12} vezes maiores que as reações não catalisadas e algumas ordens de grandeza maiores que as reações catalisadas por catalisadores inorgânicos. Além disso, por apresentarem uma estrutura complexa, possuem um alto grau de especificidade, propriedade ausente nos catalisadores inorgânicos. Portanto, sua presença permite a seleção das reações que poderão ocorrer em um determinado organismo / substrato [PAQUES e MACEDO, 2006; BORZANI et al., 2001].

As enzimas são proteínas globulares compostas por vinte diferentes aminoácidos. Estes se caracterizam por terem, unidos ao átomo de carbono, um grupo amino (básico), um grupo carboxila (ácido) e um radical variável. São macromoléculas, com peso molecular variando entre cerca de 5.000 até mais de 1.000.000 de Da. Dalton (Da) é uma unidade de massa, equivalente a 1/12 da massa de um átomo de carbono 12 [MALAJOVICH, 2009; BORZANI et al., 2001]. As

enzimas são catalisadores biológicos que diminuem a energia de ativação, acelerando a taxa de reação, sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre de reação [ISICK et al., 2003].

A presença de um carbono assimétrico resulta em duas formas moleculares (R) e (S) que diferem por suas propriedades ópticas. Os aminoácidos que compõem as proteínas correspondem à forma (R). A reação de condensação entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amina de outro cria uma ligação peptídica. A união de vários aminoácidos forma uma cadeia peptídica que se caracteriza não só pelo número e tipo de aminoácidos que a compõem, como pela sequência em que estes se encontram, denominada estrutura primária. Ao se estabelecerem ligações entre os grupos que formam os enlaces peptídicos, a cadeia adota uma estrutura regular ou estrutura secundária, geralmente em forma de hélice ou de folha. As interações entre as cadeias laterais dos aminoácidos causam o dobramento da proteína, resultando uma configuração espacial que é chamada de estrutura terciária. A forma final de uma proteína dependerá ainda da associação entre vários polipeptídeos, no que se denomina de estrutura quaternária (Figura 1). Quando sintetizada dentro da célula, uma proteína adotará espontaneamente a configuração espacial que decorre de sua estrutura primária. Entretanto, fatores ambientais como o pH, a concentração salina ou a temperatura podem causar alterações momentâneas ou definitivas na forma da molécula [MALAJOVICH, 2009].

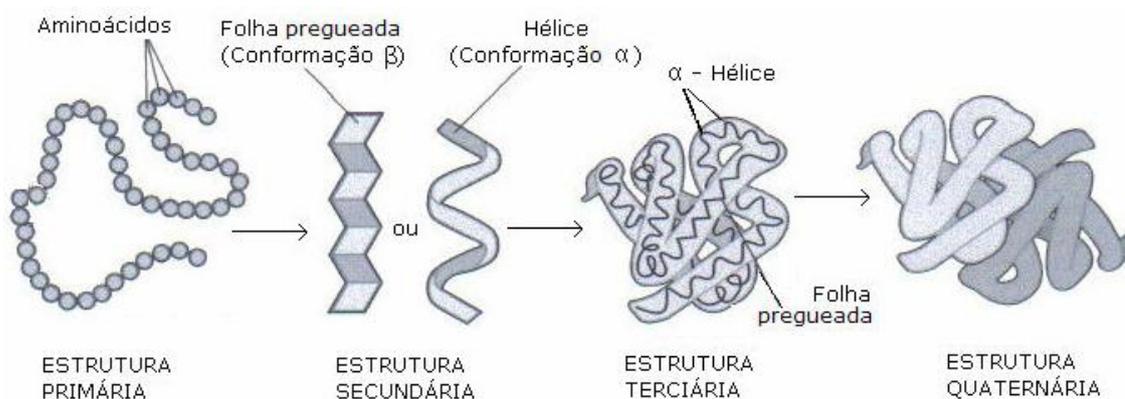


Figura 1. Estrutura de uma proteína (Malajovich, 2009).

Alterações ambientais, tais como pH, temperatura e força iônica do meio, dentre outros fatores, podem causar mudanças na estrutura das enzimas e, em decorrência, afetam suas propriedades [BORZANI et al., 2001].

Devido à grande diferença de tamanho entre a enzima e seus substratos, estes se ligam à molécula em uma região específica de sua superfície, chamada sítio ativo (Figura 2). O sítio ativo é uma cavidade com forma definida, aberta na superfície da molécula globular da enzima, e é essa forma definida do sítio ativo que confere especificidade à catálise enzimática. A ligação entre o sítio ativo e o substrato é extremamente específica: a molécula precisa ter certas características eletrônicas e espaciais que permitam o seu “encaixe” com a proteína [PRIMO et al., 2007; BORZANI et al., 2001].

Algumas enzimas têm especificidade quase absoluta por um dado substrato e não ataca nem mesmo moléculas muitíssimo semelhantes. Já outras, têm especificidade relativamente ampla e agem em muitos compostos com características estruturais comuns [LEHNINGER, 1993].

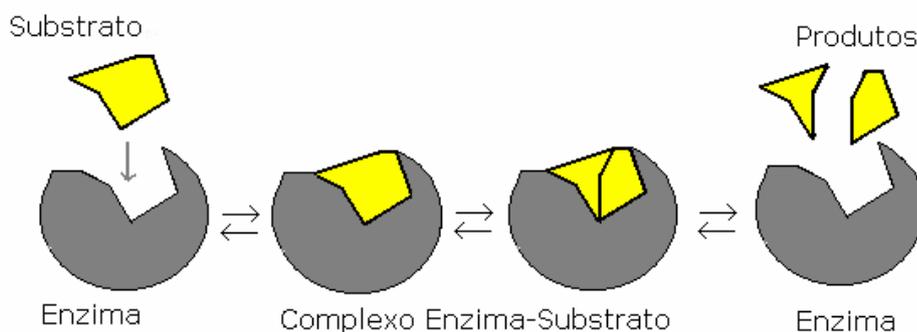


Figura 2. Mecanismo da atividade enzimática.

Fonte: Malajovich (2009).

As enzimas são classificadas pelo tipo de reação que catalisam (Tabela 2). Aproximadamente 75% das enzimas aplicadas industrialmente são hidrolases. Entre as enzimas classificadas como hidrolases, as proteases dominam o mercado enzimático, representando cerca de 40% de todas as enzimas comercializadas [SAID e PIETRO, 2004].

Tabela 2. Classificação das enzimas, de acordo com a International Enzyme Commission.

Classe	Reação catalisada	Exemplos
Oxidoredutases	Reações de oxidação-redução	Desidrogenases, oxidases
Transferases	Transferência de grupos funcionais	Transaminases, fosforilases
Hidrolases	Reações de hidrólise	Proteases, carboidrases, peptidases, lipases
Liasas	Eliminação de grupos (formação de duplas ligações)	Decarboxilases (renina, trombina)
Isomerases	Reações de isomerização	Isomerases, mutases
Ligases	Formação de ligação acoplada com a clivagem de um trifosfato	Sintetases.

3.2.1 Imobilização de Enzimas

Na biocatálise, é vantajoso utilizar a enzima imobilizada ao invés da enzima livre, devido à facilidade para separar os produtos de uma reação química. Também, a enzima suportada pode ser facilmente limpa e usada em outras reações [BUISSON et al., 2001].

Enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas em um espaço, separadas por barreiras que permitem o contato entre a enzima e o substrato no meio da reação, mas que as tornam pouco solúveis em qualquer meio [GIRELLI e MATTEI, 2005].

Embora as enzimas sejam muito ativas e seletivas, elas são menos estáveis do que catalisadores químicos, especialmente no que diz respeito à temperatura, pH e solventes orgânicos. Outro problema é que enzimas são muitas vezes mais caras do que os catalisadores químicos, de modo que a reciclagem e reutilização é muitas vezes uma necessidade para a viabilidade comercial [ROTHENBERG, 2008].

Todos estes inconvenientes podem ser eliminados ou removidos em grande parte por meio da imobilização da enzima. A enzima imobilizada possui muitas vantagens a um convencional catalisador sólido: é mais fácil de manusear, pode ser

recuperada a partir da mistura do produto por filtração, e, mais importante, é bem adequada para os processos contínuos de grande escala. Além disso, as enzimas imobilizadas são geralmente mais estáveis em relação à temperatura, pH e solventes orgânicos. A principal desvantagem é que a imobilização cria uma barreira de difusão adicional [ROTHENBERG, 2008; ZANIN e MORAES, 2004].

3.2.2 Lipases

As lipases (glicerol-ester-hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas encontradas em vários organismos como animais, plantas, fungos e bactérias. Estas enzimas catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa em ácidos graxos correspondentes e glicerol [DIAZ et al., 2006; KAZLAUSKAS e BORNSCHEUR, 2008].

Apresentam grandes vantagens em processos de biotransformações por possuírem grande afinidade por um número grande de substratos, atividade elevada sem perdas durante o processo ou alterações na seletividade. Além disso, possuem disponibilidade comercial [LIAW e LIU, 2010; LO et al., 2009] e não necessitam de cofatores (substâncias inorgânicas necessárias para auxiliar na catálise ou aumentar a taxa de reação da mesma).

As lipases podem atuar como catalisadores em diversas reações: esterificação, transesterificação, hidrólise, alcoólise, acidólise e aminólise [FORESTI e FERREIRA, 2006; CARVALHO et al., 2003].

A maioria das pesquisas sobre lipases está focada na caracterização estrutural, elucidação do mecanismo de ação, cinética, sequenciamento e clone de genes das lipases e características gerais do seu desempenho [SHARMA et al., 2001], uma vez que conhecendo tais informações, pode-se prever como irá se comportar em uma reação.

As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima se devem aos seguintes fatores: alta estabilidade em solventes orgânicos; não requerem a presença de co-fatores; possuem uma larga especificidade pelo substrato e, exibem

uma alta enantiosseletividade [CASTRO et al., 2004]. As lipases atuam sobre substratos pouco solúveis em água e em interfaces de lipídeo/água, formando microemulsões [CÔTÉ e SHARECK, 2008].

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais como fungos, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum sp*, por leveduras de *Tulopsis sp* e *Candida sp* e bactérias como *Pseudomonas sp*, *Achromobacter sp* e *Staphylococcus sp*. As lipases de microrganismos são as mais utilizadas devido à facilidade de obtenção da enzima e o número ilimitado de microrganismos possíveis capazes de produzi-las. A maioria das lipases utilizadas como catalisadores em síntese orgânica são de origem microbiana, como *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus niger*, *Thermomices lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* [AL-ZUHAIR et al., 2009; LEAL, 2000].

As lipases podem ter peso molecular variando entre 20 a 75 kDa, dependendo da fonte, apresentam atividade em pH na faixa de 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. Lipases são geralmente estáveis em soluções aquosas neutras, apresentando atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C, sendo que sua termoestabilidade varia consideravelmente em função de sua origem, em que as lipases microbianas são as mais termoestáveis [CYGLER e SCHARG, 1999].

A especificidade das lipases se divide em três grupos: lipases não-específicas; lipases 1,3-específicas; lipases ácido graxo específicas. As lipases 1,3-específicas (*Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium roquefortii*) catalisam as reações nas posições dos alcoóis primários do glicerol (posição 1 e 3), formando assim, produtos com composições diferentes daqueles obtidos por lipases não-seletivas ou mesmo por catalisadores químicos. A lipase pancreática é uma típica lipase 1,3-específica, entre diversas outras, como lipases vegetais (colza, mostarda e lupino) que também possuem este tipo de especificidade (Tabela 3).

Tabela 3. Especificidade de algumas enzimas.

Lipase	Especificidade
<i>Aspergillus niger</i>	Relativamente 1,3-específica
<i>Candida antarctica B</i>	1,3-específica
<i>Candida antarctica A</i>	Não-específica ou 2-específica
<i>Candida rugosa</i>	Não-específica
<i>Rhizomucor oryzae</i>	Altamente 1,3-específica
<i>Rhizomucor miehei</i>	Relativamente 1,3-específica
<i>Geotricum candidum</i>	Ácido graxo específica
<i>Rhizomucor javanicus</i>	Levemente 1,3 específica

Fonte: Bornscheuer e Kazlauskas (1999).

Lipases também apresentam enantioseletividade, ou seja, a capacidade da enzima de reagir com diferentes velocidades com os dois enantiômeros, com formação preferencial de um enantiômero do produto em relação ao outro [FABER, 2000].

Uma das características específicas das lipases é a sua capacidade de agir sobre substratos pouco solúveis em água, atuando na interface água/lipídeo. A atividade catalítica das lipases é reduzida na ausência de uma interface, o que é evidenciado pela baixa conversão na reação hidrólise de ésteres solúveis em água. A facilidade com que estas enzimas aceitam diferentes substratos e de vários tamanhos sugere que sua estrutura é flexível e pode adotar diversas conformações. Devido a essa facilidade, a baixa barreira de energia necessária para que ocorram mudanças conformacionais dificulta a modelagem e a previsão das interações estereoquímicas para este grupo de biocatalisadores [ZAKS e KLIBANOV, 1988].

Além disso, apresentam problemas quando utilizadas na biotransformação com a atividade de água presente no sistema. Uma vez que na reação de esterificação ocorre formação de água, este parâmetro pode deslocar o equilíbrio da reação, diminuindo a atividade e seletividade da enzima [VOLL, 2011; FREITAS et al., 2008].

3.2.3 Aplicações das lipases como biocatalisadores

Os parâmetros reacionais de todas as reações utilizando catalisadores químicos ou enzimáticos, devem ser otimizados para se obter os melhores rendimentos possíveis com estabilidade do catalisador, buscando menores custos de produção. Os parâmetros que podem ser avaliados em uma reação com aplicação de lipases como biocatalisador são: pH, temperatura, solventes, tampão, cofatores, métodos de imobilização, concentração de substratos e produtos, adição de antioxidantes ou estabilizantes, material do reator ou revestimento e tratamento físico (agitação, fluxo, fases gás-líquido, etc) [AWADALLAK et al., 2013; SUWANNARANGSEE et al., 2012].

Na reação enzimática de ácido palmítico com isopropanol visando a produção de palmitato de isopropil (utilizado na preparação de sabões, cremes para a pele, lubrificantes, etc) as seguintes condições reacionais foram avaliadas: pH, temperatura e tempo, obtendo rendimentos ótimos em pH 7,0 na temperatura de 60°C por meio da lipase imobilizada de *Candida antarctica* (EC 3.1.1.3). Foi obtido um rendimento de 99% em 14 horas de reação realizadas em um reator batelada. Como citado anteriormente, neste trabalho foi relatado o problema de produção de água durante a síntese do éster. Dois processos geralmente são empregados para sua remoção: a água da reação é removida por destilação azeotrópica (álcool:água) ou alternativamente, a água é removida durante a esterificação por pervaporação a 80°C [HILLS et al., 1990].

Cheong et al. (2007) realizaram a hidrólise parcial da oleína utilizando a lipase Lipozyme RMIM como catalisador. Foi utilizada a metodologia de superfície de resposta para avaliar os parâmetros da reação: quantidade de água, concentração de enzima, temperatura e tempo de reação. Além destes trabalhos, inúmeros outros podem ser citados onde se avaliam os parâmetros reacionais [BABICZ et al., 2010; ZHONG et al., 2010; LO et al., 2009].

3.3 REAÇÕES ENZIMÁTICAS EM FLUÍDO SUPERCRÍTICO

A primeira observação relatada da ocorrência de uma fase supercrítica foi feita por Baron Cagniard de La Tour em 1822. Ele notou visualmente que o limite gás-líquido desaparecia quando a temperatura de certos materiais era aumentada por aquecimento em um reator fechado [TAYLOR, 1996]. Desde então, diversos estudos tem sido realizados a fim de se utilizar as diversas vantagens apresentadas pelos fluidos supercríticos, tanto em processos de separação, detecção, reação, entre outras.

Um gás, quando comprimido isotermicamente a pressões mais elevadas que a sua pressão crítica, exibe poder de solvatação reforçada na vizinhança da sua temperatura crítica. Tais fluidos são chamados de fluidos supercríticos (SCF) e seu estado termodinâmico correspondente para uma substância pura é ilustrado na Figura 3 [RIZVI, 1994].

O estado supercrítico é obtido ao se elevar a pressão e a temperatura de um gás ou de um líquido de forma que se altere o estado de agregação, consequentemente modificando as propriedades do líquido e do gás. Um fluido supercrítico é definido como qualquer substância que esteja acima de sua temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c). A temperatura crítica (T_c) é a maior temperatura na qual um gás pode ser convertido a líquido por aumento na pressão. A pressão crítica (P_c) é a maior pressão na qual um líquido pode ser convertido em gás por aumento na temperatura. A região crítica é a região de uma única fase e possui ambas as propriedades, de líquido (solvatação) e de gás (difusividade) [SUN, 2002; RIZVI, 1994].

Um fluido supercrítico exibe propriedades de transporte desejáveis que melhoram a sua adaptabilidade em diversas reações. A densidade de um SCF é comparada com a dos líquidos e sua viscosidade é comparada com a de gases. A alta densidade dos SCF contribui para a alta difusividade equivalente aos de líquidos. Portanto, esta mais rápida dissolução de partículas de soluto em SCF tem contribuído para a utilização crescente de SCF para fins de reação e extração [RIZVI, 1994].

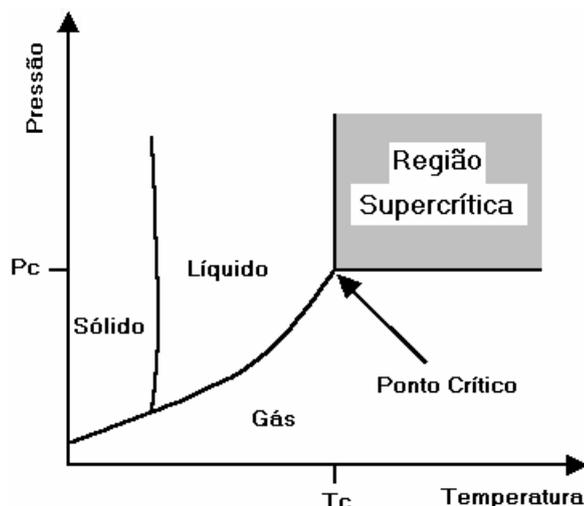


Figura 3. Diagrama de fases de uma substância pura.

As vantagens dos SCF, comparados com solventes orgânicos, incluem solubilidade facilmente controlada dos componentes, alta difusividade, velocidades reacionais maiores, e cabe salientar a baixa toxicidade, o que um torna um solvente ambientalmente correto [HABULIN et al., 2008b].

Entre as reações enzimáticas em SCF, o uso de lipases é promissor, mostrando diversas aplicações na síntese de diversos compostos químicos. Dióxido de carbono supercrítico tem capacidade de dissolver água, e sua solubilidade depende da escolha da temperatura e da pressão [RIZVI, 1994].

Para utilizar tal tecnologia, é importante avaliar a solubilidade do solvente no meio reacional. A solubilidade de compostos pode variar significativamente dependendo do solvente. Associações químicas entre solvente-soluto e solvente-solvente pode afetar consideravelmente a solubilidade. A capacidade do solvente de entrar em contato com o soluto (fator do tamanho molecular do solvente, impedimento estérico) também pode influenciar fortemente a solubilidade [JENNINGS e WEISFENNING, 2005].

O dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) é potencialmente considerado como substituto de solventes convencionais em alimentos e aplicações farmacêuticas. As vantagens do scCO₂ incluem solvente livre de poluição, baixas temperaturas de operação, baixo custo energético e altas velocidades de transferência de massa e difusividade [RIZVI, 1994].

Para um estudo detalhado com relação às aplicações do CO₂ supercrítico, há a necessidade de definir os comportamentos do equilíbrio de fase entre este e os componentes do sistema próximos ao ponto crítico. Na prática, quando se utiliza o CO₂ supercrítico, seja para extração, reação, impregnação entre outras, sempre haverá a necessidade de envolver mais de uma substância [SILVA et al., 2014; GIUFRIDA et al., 2011].

O propano compete em muitas aplicações supercríticas com o dióxido de carbono. Como é possível observar na Tabela 4, o propano apresenta pressão crítica de 42,5 bar, de modo que é possível trabalhar a pressões mais baixas que a do CO₂, o que propicia menores gastos de pressurização. Por outro lado, embora o poder solvente do propano seja maior que o do CO₂, com baixo grau de toxicidade, seu uso é restrito por ser um solvente inflamável [ESPINOSA, 2001]. Este gás, apesar da inflamabilidade, tem se mostrado interessante para a solvatação ou intumescimento de polímeros de alta massa molar. O propano está ganhando popularidade, seja por suas propriedades, seja por razões econômicas. O CO₂ é altamente solúvel em solventes apolares, por sua vez, o propano tem alta solubilidade em solventes polares.

Tabela 4. Propriedades críticas de alguns fluidos supercríticos utilizados como meios reacionais.

Solvente	Fórmula	T _c (°C)	P _c (bar)	ρ _c (g/cm ³)
Dióxido de carbono	CO ₂	31,0	73,8	0,47
Etano	C ₂ H ₆	32,2	48,8	0,20
Propileno	C ₃ H ₆	91,8	46,0	0,23
Propano	C ₃ H ₈	96,7	42,5	0,22
Éter dimetílico	C ₂ H ₆ O	126,9	52,4	0,26
n-pentano	C ₅ H ₁₂	196,6	33,7	0,24
Metanol	CH ₃ OH	239,5	80,9	0,27
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	240,7	61,4	0,28
Água	H ₂ O	374,2	221,2	0,32

No trabalho já citado de Habulin et al. (2008a), onde os autores sintetizaram diferentes ésteres de ácidos graxos de açúcares (palmitato de frutose, laurato de frutose, etc) catalisados por lipase em 2-metil-2-butanol a pressões atmosféricas e em scCO₂ (dióxido de carbono supercrítico) a 10 MPa obteve-se um rendimento de 67% em 24 horas de reação a 80°C. O estudo verificou um aumento da estabilidade da lipase em scCO₂, provavelmente devido à rigidez da lipase imobilizada em scCO₂ a altas temperaturas. Ao contrário, quando a síntese foi realizada em solvente orgânico a temperaturas superiores a 60°C, as forças que estabilizam a estrutura da proteína diminuíram a força que leva à quebra da conformação de seus ativos.

Os resultados indicaram que há um caminho promissor em se usar scCO₂ como um meio reacional seguro para a síntese enzimática de ésteres de ácidos graxos de açúcares. Devido a não toxicidade e inflamabilidade deste solvente é possível usá-lo na indústria de alimentos como aditivo. Rendimentos de até 61% foram obtidos podendo aumentar até 74% ao adicionar peneira molecular. A separação dos ésteres de açúcares a partir da mistura reacional foi realizada por extração líquido-líquido com etanol. A lipase e o açúcar que não reagiu foram separados por centrifugação e o etanol foi evaporado sob vácuo [HABULIN et al., 2008a].

A reação de esterificação enzimática (Novozym 435, SP 382 de *Candida antarctica* e Lipozyme IM de *Rhizomucor miehei*) para produção do laurato de citronelol foi realizada em scCO₂ foi investigada por Habulin et al., 2008. Os autores avaliaram os efeitos da temperatura e pressão e o efeito de diferentes co-solventes na velocidade da reação [HABULIN et al., 2008b].

Segundo Habulin et al., (2008b) SCFs têm sido usados para a biossíntese devido às vantagens comparadas aos métodos convencionais que utilizam solventes orgânicos. Entre os SCFs, o scCO₂ provém um interessante meio para síntese de ésteres de terpeno devido a sua boa capacidade de solvatação, alta difusividade e baixa viscosidade que aumenta a transferência de massa do substrato para as partículas do catalisador, fácil recuperação dos produtos sem traços de solventes, que é um dos aspectos mais atrativos, especialmente na produção de gêneros alimentícios.

Rosso et al. (2013) avaliaram uma alternativa aos métodos convencionais de síntese de poliésteres. O produto de interesse foi obtido por meio da polimerização enzimática em dióxido de carbono supercrítico. O reator de volume variável, onde foi conduzida a reação, foi adequado para proporcionar o controle das variáveis do processo.

Matsuda (2013) descreve uma interessante revisão sobre os avanços recentes na biocatálise utilizando dióxido de carbono supercrítico (scCO₂). São abordadas as metodologias de estabilização de enzimas em CO₂ supercrítico, bem como as reações de síntese orgânica. O autor prevê a necessidade de mais estudos com a utilização de uma grande variedade de enzimas em scCO₂ com o objetivo de encontrar a biotransformação adequada a ser aplicada no processo industrial. Além disso, ressalta que essas reações podem promover o desenvolvimento da química verde no futuro.

Ceni et al. (2010) relatam a produção de 1-gliceril benzoato por transesterificação enzimática em n-butano comprimido, utilizando a lipase imobilizada comercial Novozym 435. Os experimentos foram planejados com base em dados de equilíbrio de fases do sistema de benzoato de metila/butano, medidos utilizando o método sintético estático com uma célula de volume variável. As condições ótimas foram de 5,5% (m/m) de enzima, razão molar de substratos de 3:1, 50°C e 6 horas de reação, obtendo uma conversão em de benzoato de 1-glicerilo de cerca de 6%.

3.3.1 Equilíbrio de Fases

A utilização de sistemas pressurizados em reações requer informações sobre o comportamento de fases do sistema, pois a solubilidade entre substratos e fluido supercrítico é fundamental para que ocorra a reação química. Tais dados são importantes, uma vez que fornecem informações sobre a solubilidade dos reagentes e dos produtos em relação ao solvente, bem como as condições de temperatura e pressão em que ocorrem uma, duas ou mais fases em equilíbrio [SUN, 2002; TAYLOR, 1996].

Lay et al. (2010) mediram as pressões no ponto de bolha entre o dióxido de carbono e n-heptano em um aparato PVT (pressão, volume e temperatura). Para este sistema binário as frações molares de CO₂ avaliadas foram entre 0,502 e 0,91 e temperatura entre 25 e 40°C. Os resultados indicam que a pressão no ponto de bolha aumenta com o aumento da fração molar de CO₂ a temperatura constante, ou seja, é verificado que o dióxido de carbono pode se dissolver prontamente em n-heptano.

Lanza (2004) indicou que há miscibilidade em toda a faixa de composição em pressões entre 50 e 130 bar em propano e butano em estado supercrítico com óleo de soja. O glicerol é um solvente polar e os óleos vegetais são apolares, portanto, sua miscibilidade é limitada. Desta forma, um surfactante, pela sua característica molecular, tem a capacidade de dispersar solventes polares em apolares, formando microemulsões [KAEWTHONG e KITTIKUN, 2004].

Schwarz e Knoetze (2007) estudaram o equilíbrio de fases de alcoóis de alto peso molecular em propano supercrítico indicando que na faixa de temperatura e pressão estudadas todos os alcoóis se mostraram miscíveis.

Na revisão realizada por Guclu-Ustundag e Temelli (2006) é reportado o comportamento de fase de lipídios em sistemas ternários e foi realizada a análise para determinar o efeito dos parâmetros operacionais e de composição sobre o comportamento de solubilidade e na eficiência de separação. Os autores ressaltam que o conhecimento do comportamento das fases é essencial para o desenvolvimento de qualquer processo supercrítico.

Há um grande interesse na produção de biodiesel em solventes pressurizados, além do que, a utilização de CO₂ supercrítico pode ser uma alternativa interessante para melhorar a purificação de biodiesel. Desta forma, Araujo et al. (2012) obtiveram medidas de equilíbrio da fase para o sistema ternário CO₂ + glicerol + etanol para obter uma melhor compreensão do comportamento do sistema.

São encontrados na literatura alguns trabalhos cujo foco da pesquisa foi estudar o sistema binário CO₂ + ácido oleico. Os estudos permitem a obtenção dos parâmetros cinéticos, que podem melhor descrever alguns processos industriais como de separação e fracionamento de produtos [AL-DARMAKI et al., 2011;

FERNANDEZ-RONCO et al., 2010; HONG et al., 2010]. Penedo et al. (2009) utilizaram a equação cúbica de estado de Peng-Robinson com regra de mistura de van der Waals com interação binária dos parâmetros para modelar os dados experimentais. O modelo foi adequado para tratar os dados experimentais. O autor destaca a importância da obtenção destes dados experimentais para utilização em processos de separação em condições supercríticas, já que os ácidos graxos estão presentes em concentração elevada em óleos vegetais e estão sendo largamente utilizados na indústria.

Laudani et al. (2009) estudaram o equilíbrio de fases a alta pressão do sistema ternário ácido oleico/1-octanol/CO₂ para obter informações para otimização da síntese enzimática de n-octil oleato. Os dados de equilíbrio foram medidos a temperaturas de 35, 323 e 343 K ao longo de uma faixa de pressão de 1 a 25 MPa. A solubilidade do CO₂ aumentou com o aumento da pressão até 10 MPa. A pressões mais elevadas, não se observou aumento significativo da solubilidade. A equação de estado Soave-Redlich-Kwong com regra de mistura quadrática foi utilizada com sucesso para a correlação dos dados estudados.

Sima et al. (2012) estudaram dados de equilíbrio de vapor do sistema binário CO₂ e acetato de etila nas temperaturas de 50, 60, 70, 80 e 90°C atingindo pressões entre 0,85 e 10,9 MPa. Os dados experimentais foram modelados por uma equação geral cúbica de estado usando regra de misturas de van der Waals, e apresentaram concordância entre o modelo e os dados experimentais.

3.4 MONO-OLEÍNA

A seguir, será descrita brevemente a aplicação, características e formas de obtenção da mono-oleína, um dos produtos a serem obtidos neste trabalho. Os substratos utilizados na reação são também revisados.

3.4.1 Aplicações, características e formas de obtenção da mono-oleína

A mono-oleína ou mono-oleato de glicerila é uma mistura de glicerídeos derivados do ácido oleico e outros ácidos graxos, que consiste principalmente em mono-oleato. A cadeia acil (ácido oleico) é ligada ao esqueleto do glicerol (ou solketal, foco deste estudo) por uma ligação éster. O glicerol pode formar hidrogênio e é referida como a “cabeça” da molécula, que proporciona características hidrofílicas. A cadeia de hidrocarboneto fornece características hidrofóbicas para mono-oleína e é muitas vezes chamado de “cauda” [KULKARNI et al., 2011; BOYLE e GERMAN, 1996].

A mono-oleína pode ser produzida por esterificação direta de ácidos graxos, principalmente o ácido oleico, com o glicerol ou pela glicerólise (transesterificação) de óleos vegetais refinados. Geralmente, os catalisadores utilizados nestes processos são o hidróxido de sódio, em temperaturas entre 200 e 250°C, sendo necessária uma etapa posterior de recuperação para separar os mono e diglicerídios [GANEM-QUINTANAR et al., 2000; ITABAIANA et al., 2012]. Comercialmente disponível, a mono-oleína pode ser obtida em duas formas: como glicerídeo misto (ou simplesmente mono-oleína) ou como mono-oleína destilada, este último é o preferido para aplicações farmacêuticas, devido a sua alta pureza. A mono-oleína pode ser misturada com um surfactante aniônico, que geralmente é usado como um emulsionante primário para sistemas óleo-em-água. Apresenta-se como uma pasta cerosa amarela com odor característico. A mono-oleína é um produto não-tóxico e biodegradável [KULKARNI et al., 2011].

Uma das principais aplicações da mono-oleína é como surfactante, abreviação para agentes ativos de superfície, são substâncias capazes de diminuir a tensão superficial do meio no qual se encontram e/ou a tensão interfacial com outras fases. É caracterizado por possuir tendência a ‘unir’ as superfícies e interfaces. O termo interface denota uma ligação entre quaisquer duas fases imiscíveis. São constituídos de duas partes distintas: uma que é solúvel em um fluido específico (a parte liofílica) e outra que é insolúvel (a parte liofóbica) (Figura 4) [HOLMBERG et al., 2003].

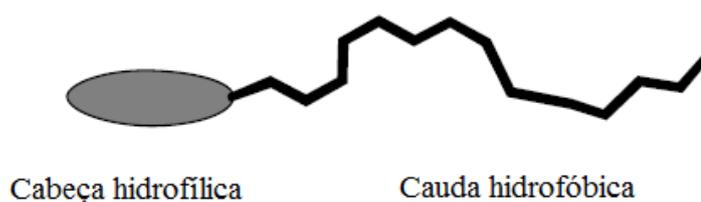


Figura 4. Representação esquemática de um surfactante formado por uma cabeça hidrofílica (polar) e uma cadeia alquil, a cauda hidrofóbica (apolar)

A aplicação de surfactantes é interessante devido as suas características: diminuição das tensões superficiais e interfaciais; molhabilidade, penetrabilidade, difusão, hidrofilicidade e hidrofobicidade, emulsificação, detergência, formação de gel, formação de espuma, floculação, atividade sequestrante de metais e ações antimicrobianas. Além destas características, apresentam as vantagens de possuírem biodegradabilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade e digestibilidade e biorremediação [NITSCHKE E PASTORE, 2002; REHM, 1996]. A Tabela 5 apresenta alguns exemplos de interfaces que podem envolver uma fase líquida, na qual são utilizados surfactantes.

O impacto dos surfactantes sobre o meio ambiente tem aumentado de importância. Recentemente, a questão tornou-se um fator importante na formulação de todos os trabalhos envolvendo surfactantes, já que a maioria destes produtos usados nos domicílios e na indústria escoam para esgotos. Desta forma, é essencial que o surfactante ofereça o mínimo risco possível para o meio ambiente [HOLMBERG et al., 2003].

Tabela 5. Exemplos de interface envolvendo uma fase líquida.

Interface	Tipo de sistema	Produto
Sólido – líquido	Suspensão	Base de solvente de tinta
Líquido – líquido	Emulsão	Leite, creme
Líquido – vapor	Espuma	Creme de barbear

Os biossurfactantes, de acordo com a sua estrutura química e propriedades, são utilizados na indústria de cosméticos com diferentes funções tais como emulsificantes, espumantes, hidratantes e agentes antimicrobianos, em cremes, loções, pastas, géis, repelentes, anticaspas, desodorantes, tintas de cabelo, batons, entre outros [KOSARIC, 1996].

Na indústria de alimentos, os biossurfactantes são empregados como aditivos em pequenas quantidades. Os alimentos (industrializados ou não) necessitam de emulsificantes, visto que, além da água, contêm três outros componentes principais: proteína, carboidrato e gordura. Também são utilizados como conservantes para pães [ITABAIANA JR et al., 2011].

No controle ambiental, os biossurfactantes têm desempenhado um importante papel, removendo acúmulo de materiais tóxicos na água e no solo [KITAMOTO et al., 2002; KELKAR et al., 2006]. Na agricultura, são empregados nas formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são, geralmente, hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas [LIN, 1996].

Embora a mono-oleína seja uma molécula bem conhecida e largamente utilizada como um agente emulsionante e como um aditivo alimentar desde os anos 1950, a sua potencial aplicabilidade na indústria farmacêutica é grande. Ela tem sido focada em diversos estudos como sistema para liberação de drogas por meio de diferentes vias de administração [GANEM-QUINTANAR et al., 2000; ESPOSITO et al., 2013].

No trabalho de Esposito et al. (2013), a mono-oleína foi utilizada em dispersões aquosas como sistemas de liberação de drogas, tal como a curcumina. A curcumina possui efeitos terapêuticos, que liberada controladamente, aumentam sua eficiência no organismo.

Com o mesmo objetivo, Mengesha et al. (2013) desenvolveram um novo método de liberação de drogas baseado em monoacilgliceróis (monooleato e monoestearato de gliceril), especialmente voltado para uso na quimioterapia intracavitária.

A forma mais usual de se obter a mono-oleína é pela reação da esterificação utilizando catalisadores químicos a partir do ácido oleico e do glicerol. Porém, a

síntese química é restritiva, pois são utilizadas altas temperaturas e solventes tóxicos que levam traços destes resíduos para os produtos. Visando novas rotas alternativas para obtenção do produto em questão, estudos tem substituído a catálise química pela catálise enzimática. Os processos enzimáticos, altamente regioseletivos, são os mais indicados para a transformação destas substâncias e representam uma importante vantagem sobre os processos químicos convencionais de baixa seletividade [HOLMBERG et al., 2003]. A esterificação enzimática para obtenção do mono-oleato de glicerila é apresentada na Figura 5.

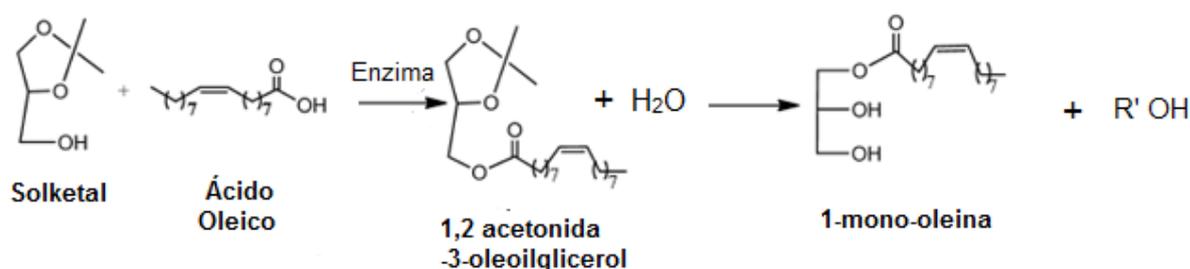


Figura 5. Rota enzimática para a síntese de mono-oleína.

Os ácidos graxos são a primeira escolha de um hidrofóbico natural (cauda) para surfactantes por serem facilmente transformados e devido a sua abundância [HOLMBERG et al., 2003].

O solketal, um álcool primário obtido a partir da reação do glicerol com acetona. O solketal ((R,S)-1,2-isopropylidene glycerol (4-hydroxymethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane) pode ser transformado a partir da glicerina, um subproduto da reação de biodiesel, que está disponível abundantemente no mercado atual, devido ao desenvolvimento da produção de biodiesel [SURIYAPRAPADILOK e KITTYANAN, 2011, FERREIRA et al., 2010]. A estrutura do solketal pode ser visualizada na Figura 5.

Tal composto possui característica de solvente e de surfactante, podendo ser intitulados “solvo-surfactante verde”, e é um substituto potencial do etileno e do propileno glicol. Além disso, é um composto oxigenado útil como aditivo em combustíveis, diminuindo sua viscosidade e reduzindo a emissão de partículas

[ROYON et al., 2011]. É utilizado em maior escala como solvente e plastificante e como agente de suspensão em preparações farmacêuticas [CARKSON et al., 2001].

A função acetal formada bloqueia os grupos hidroxil central e um terminal, sendo composto quiral importante na síntese de monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos, fosfatos de glicerol e muitos compostos biológicos ativos [ITABAIANA et al., 2012].

Estudos sugerem que o uso de solketal leva a altas conversões e altas velocidades iniciais da reação. Isto pode ser deduzido devido a menor quantidade de água produzida na reação com este álcool [HESS et al., 1994].

São encontrados alguns trabalhos na literatura para obtenção da mono-oleína, como o de Wang et al. (2013) que relatam um novo método para a sua síntese. Para este propósito foi utilizado 1,2-acetonida glicerol que reagiu com ácido oleico e metanol por meio de uma reação de esterificação catalisado pela lipase Novozyme 435. Os substratos da reação passaram por purificações antes de realizar a reação. O rendimento obtido, nas condições ótimas reacionais, foi de 94,6% não purificado.

A grande inovação deste trabalho é unir a catálise enzimática, já reconhecida pelas suas inúmeras vantagens, com uma reação conduzida em dióxido de carbono em condições supercríticas. Os trabalhos citados na literatura ainda utilizam solventes orgânicos, tais como heptano, para conduzir a reação. Este trabalho é focado na substituição total do heptano pelo scCO₂.

A síntese enzimática por meio de solventes supercríticos ainda é pouco estudada. São encontrados alguns trabalhos, como o de Habulin et al (2008a) em que sintetizaram diferentes ésteres de ácidos graxos de açúcares como palmitato de frutose, laurato de frutose, palmitato de sacarose e laurato de sacarose catalisados pela enzima imobilizada Novozym 435 em 2-metil-2-butanol a pressões atmosféricas e em scCO₂ a 10 MPa. Os resultados obtidos indicam o potencial em se utilizar scCO₂ como meio para obtenção de ésteres de açúcares, obtendo rendimentos de até 61%.

3.5 EPÓXIDOS

A seguir, será descrito brevemente a aplicação, características e formas de obtenção de epóxidos. É dado foco especial na obtenção do produto pela reação de epoxidação do ácido oleico, o ácido epoxioleico, o segundo produto, cuja produção será avaliada neste trabalho.

3.5.1 Aplicações, características e formas de obtenção dos epóxidos

A epoxidação é uma reação muito útil em síntese orgânica. Devido à elevada reatividade do grupo epóxido, pode ser utilizada como um intermediário ativo para a síntese de muitos produtos de alto valor comercial tais como álcoois, glicóis, alcaloaminas, compostos de carbonil, compostos olefínicos e polímeros como poliésteres, surfactantes de alta tecnologia, poliuretanos e resinas epoxi [DINDA et al., 2011, RIOS et al., 2005].

Classicamente, a síntese de um epóxido é realizada por oxidação de um ácido orgânico e peróxido de hidrogênio (portador de oxigênio) que gera um perácido (Figura 6). As reações pioneiras nesta área posteriormente levaram o nome de seus inventores, que são a reação de epoxidação de Prilezhaev e a reação de Baeyer-Villiger [KOTLEWSKA et al., 2011]. Recentemente, polímeros à base de óleo vegetal estão sendo preparados por reações de polimerização, incluindo a condensação e fazendo o uso de dióxido de carbono [ROUMANET et al., 2013].

Durante a epoxidação química, peroxiácidos são produzidos pela reação de ácido acético ou ácido fórmico e peróxido de hidrogênio na presença de um ácido forte, tais como H_2SO_4 e H_3PO_4 , que pode causar corrosão de equipamentos e iniciar a indesejável abertura do anel.

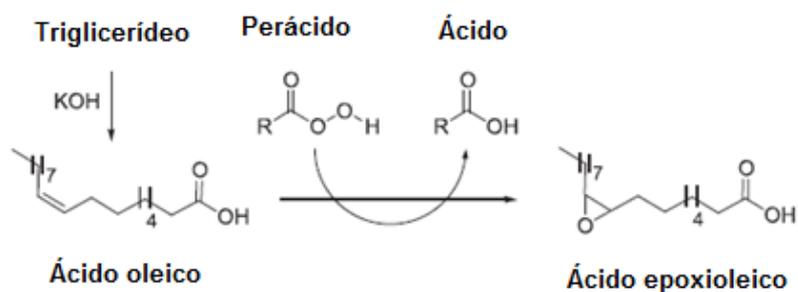


Figura 6. Representação esquemática da alcoólise de triglicerídeos usando KOH como catalisador seguido pela epoxidação do ácido oleico.

Recentemente, epoxidação enzimática tem sido desenvolvida com êxito, mostrando-se superior à síntese química [PETROVIC et al., 2002, Sun et al., 2011] (Figura 7). As condições de reação são suaves, ocorre a formação de hidroperóxidos estáveis diretamente a partir de ácidos graxos, as enzimas apresentam alta, regio e estereosseletividade, suprimindo significativamente reações secundárias, obtendo conversões elevadas [CORREA et al., 2012; LU et al., 2010].

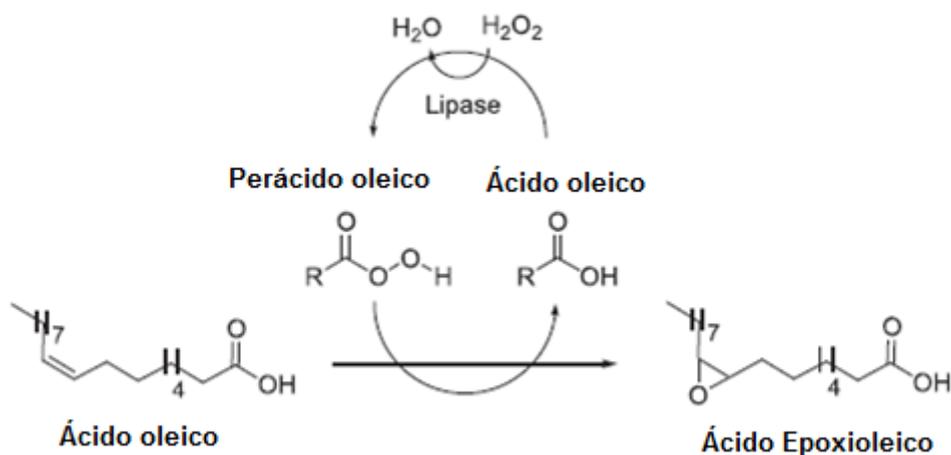


Figura 7. Representação esquemática da epoxidação químio-enzimática do ácido oleico.

O peróxido de hidrogênio é o oxidante mais utilizado na reação de epoxidação, devido a sua acessibilidade e baixo custo, porém tem sua aplicação limitada para síntese oxidativa, não apresentando rendimento sem adição de um

catalisador. Catalisadores metálicos têm sido usados em conjunto com peróxido de hidrogênio para formar epóxidos. Esses catalisadores proporcionam boa seletividade e rendimentos e podem ser usados em quantidades relativamente pequenas. No entanto, problemas com a estabilidade do catalisador e a necessidade de separação e de reciclagem pós-reação proporcionam desafios adicionais de processamento e custos mais elevados [NOLEN et al., 2002].

Dinda et al. (2011) investigaram a cinética de epoxidação do óleo de semente de algodão por ácido peroxiacético (PAA) gerado “in situ” a partir de peróxido de hidrogênio e ácido acético glacial na presença de resina de troca iônica ácida (Amberlite IR-120) como catalisadores. Obtiveram conversão de oxirano superior a 65% nas condições ótimas são: temperatura entre 70 e 80°C, razão molar H₂O₂:concentração de insaturação de cerca de 1,5, relação molar de ácido acético:concentração de saturação de 0,5 e quantidade de catalisador de 15% em relação à fase de óleo presente no sistema.

Mushtaq et al. (2013) realizaram a reação de epoxidação dos ésteres metílicos obtidos do óleo de *Jatropha curcas*. Obtiveram 92,89% de rendimento nas seguintes condições reacionais: 70°C, razão molar ácido fórmico/C=C de 0,96 mol, razão molar peróxido de hidrogênio/C=C de 3,12 mol em 277 minutos de reação.

Correa et al. (2012) realizaram a reação de epoxidação do ácido oléico usando a lipase PSCL Amano como biocatalisador. Foi aplicado planejamento de experimentos CCD para avaliar a influência das variáveis no rendimento da reação. As condições ótimas obtidas foram: 55°C, 10%(m/m) de enzima, 0,2% de peróxido de hidrogênio, 150 rpm em 3 horas de reação. O rendimento obtido foi de 88%.

Sun et al. (2011) conduziram a epoxidação do óleo da semente de *Sapindus mukorossi* usando peróxido de hidrogênio como doador de oxigênio e ácido esteárico como transportador de oxigênio ativo na presença lipase imobilizada *Candida antarctica B*. As condições ótimas obtidas através de metodologia de superfície de resposta foram: 50°C, 7 horas, 2% de enzima (em relação à massa de óleo), razão molar H₂O₂/ligações C=C de 4:1. Nestas condições, o rendimento obtido foi de 4,6% em epóxido.

Além dos trabalhos descritos, diversos outros trabalhos encontrados na literatura utilizaram catalisador biológico para conduzir a reação de epoxidação de

ácidos graxos e óleos [SUN et al., 2011; SILVA et al., 2011; KOTLEWSKA et al., 2011].

Roumanet et al. (2013) sintetizaram vários poliésteres a partir de vários diois alifáticos derivados do ácido oleico, um dos mais abundantes ácidos graxos presente, por exemplo, no óleo de oliva, óleo de soja e óleo de girassol. Apresentou 100% de rendimento em poliésteres. Os autores afirmam que o material sintetizado contribuirá para um novo e grande campo de polímeros biodegradáveis derivados de recursos renováveis.

O efeito do tipo de processo de epoxidação do óleo de soja sobre as características dos óleos de soja epoxidados foi investigado no estudo de Saithai et al. (2013). Foram utilizados dois processos de epoxidação: epoxidação química “in situ” utilizando peróxido de hidrogênio e ácido fórmico, e uma epoxidação quimio-enzimática utilizando duas enzimas: Novozyme 435 (CALB) e uma lipase aciltransferase (CpLIP2). A epoxidação quimio-enzimática produziu alta concentração de epóxidos e, em contraste, a epoxidação química mostrou uma baixa produção de epóxidos. Mais uma vez foi evidenciada neste estudo, a vantagem em se utilizar enzimas na transformação de produtos.

Fuchs e Schwab (2013) avaliaram o desempenho da enzima peroxigenase extraída do tomate na catálise de diversas reações: epoxidação, hidroxilação e aromatização, transformando diferentes ácidos graxos. Na reação de epoxidação, obteve-se um rendimento de 97% em epóxidos. O estudo em questão permite novas aplicações na síntese de química fina a partir de recursos renováveis.

3.5.2 Microemulsões

Biotransformações utilizando enzimas em meios com baixo teor de água tem sido estudado por meio de várias abordagens. Entre esses meios, podemos citar as microemulsões de água em óleo (A/O), também conhecidas como micelas reversas [ITABAIANA JR et al., 2013; XENAKIS et al., 2009; PAVLIDIS et al., 2009; PAPADIMITRIOU et al., 2011; NISHIYAMA et al., 2006].

O meio onde estão inseridas as microemulsões é constituído por nanogotas aquosas dispersas em uma fase orgânica não polar estabilizada por tensioativos e/ou álcoois de cadeia curta. Este líquido termodinamicamente estável com uma grande área interfacial proporciona uma fase aquosa onde enzimas hidrofílicas podem ser hospedadas, e uma fase orgânica não polar, onde substratos ou produtos hidrófobos são solubilizados [DANDEVATE et al, 2009; FULTON e SMITH, 1988].

As aplicações práticas de microemulsões A/O podem ser dificultadas pela necessidade de separar o surfactante do produto da reação. As técnicas usuais aplicadas para realizar esta separação apresentam alguns problemas, tais como a formação de emulsões e de espuma causadas pela presença de surfactantes. Desta forma, tais microemulsões podem ser "geleificadas" pela adição de gelatina ou de outros agentes geleificantes, como os derivados de celulose ou ágar, obtendo-se uma matriz adequada para a imobilização de enzimas (Figura 8). O termo organogel é utilizado para caracterizar os sistemas em que o líquido em seu interior é formado por óleo. A preparação de organogéis a base de microemulsão (MBGs) envolve a geleificação de microemulsões A/O em lecitina ou AOT [ZOUMPANIOTI et al., 2010].

Lipases imobilizadas em organogéis mantem a sua atividade catalítica e estabilidade durante longos intervalos de tempo. Além disso, na maioria das condições, a matriz de gel retém completamente o surfactante, gelatina, água e enzima componente, permitindo a difusão de substratos não polares ou produtos entre a fase não polar [ZOUMPANIOTI et al., 2010].

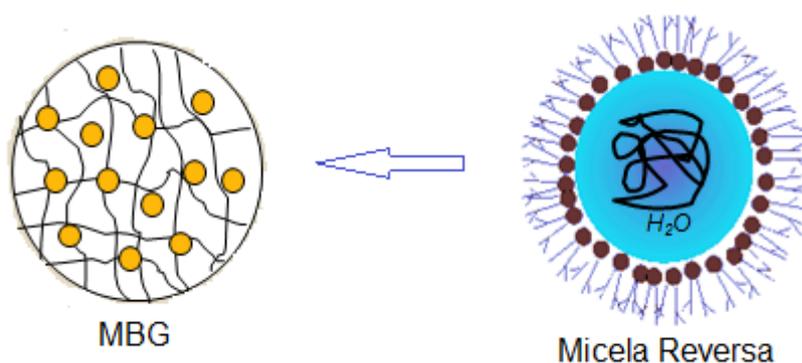


Figura 8. Representação esquemática da formação de uma microemulsão baseada em organogel em que a lipase está alojada.

Organogéis contendo enzimas oferecem muitas vantagens em relação a apenas microemulsões contendo enzimas, tais como a capacidade de dispersar o biocatalisador a um nível molecular e a incorporar um cofator da enzima [DELIMITSOU et al., 2002]. Tem sido demonstrado que as enzimas imobilizadas em géis de hidroxilpropilmetil celulose (HPMC) mantem a sua atividade catalítica e o organogel se mantem estável, mesmo em temperaturas mais elevadas [ZOUMPANIOTI et al., 2008]. A utilização de enzimas imobilizadas em MBGs é caracterizada por conversões elevadas e altas purezas ópticas, até mesmo em temperatura ambiente. A reutilização de enzima e recuperação do produto são facilitadas por este processo [ZOUMPANIOTI et al. , 2010].

Chen e Yeh (1998), ao avaliarem o grande potencial para aplicação industrial nos processos de biotransformação utilizando micelas reversas, desenvolveram um modelo matemático que possibilita a interpretação dos dados cinéticos da hidrólise de *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo por β -galactosidase em sistema aquoso e micela reversa. Ao avaliar os parâmetros cinéticos, o maior efeito sobre a velocidade de hidrólise é devido à quantidade de água livre em micelas reversas, e não devido a mudanças estruturais nas moléculas da enzima. Prevendo e correlacionando os parâmetros cinéticos, é possível estimar o efeito das moléculas de água que participam na biossíntese de sistemas micro-aquosos, por exemplo, a síntese de sacarose contendo poliéster ou a esterificação catalisada por lipases.

Miyata et al. (2011) estudaram a formação de micelas poliméricas de copolímeros e as suas performances como sistema carreador de drogas. O grupo desenvolveu um sistema constituído por micelas poliméricas versáteis para o carregamento de drogas e estrutura hidrofílica biocompatível, em escala nanométrica. Estas características são preferíveis, pois permitem que a permeabilidade da droga seja aumentada, aumentando o efeito da retenção. Essas micelas “inteligentes” permitem a liberação de drogas pela estabilização reversível da estrutura da micela, controlando o trânsito intracelular. Elas são úteis em diversas situações, apresentando respostas melhores quando comparadas a outras drogas sem esta funcionalidade. Além disso, a capacidade de se controlar o tamanho das micelas poliméricas na faixa de algumas dezenas a centenas de nanômetros afeta

significativamente sua longevidade na corrente sanguínea e eficiência de acumulação e penetração. Diversos outros estudos também apontam sobre o futuro promissor de micelas para a liberação controlada de fármaco, melhorando sua biodisponibilidade oral [NISHIYAMA e KATAOKA, 2006; FRANCIS et al., 2004].

Papadimitriou et al. (1995) estudaram a formação de micelas em reações de esterificação enzimática. Os autores utilizaram bis-(2-etil-hexil) sulfossuccinato de sódio (AOT) em micelas reversas para cossolubilizar os reagentes hidrofílicos e hidrofóbicos da reação enzimática de esterificação. Obteve-se oleato de pentil a partir da reação de ácido oleico e pentanol, utilizando uma lipase para catalisar a reação. Os autores verificaram que a natureza do álcool (1-pentanol e isopentanol) altera drasticamente a velocidade inicial da reação, realizando um estudo estrutural do sistema micelar para explicar esta mudança de atividade. A partir do observado, surgiu a hipótese que a formação de micelas preserva a capacidade catalítica da enzima e melhora a interação entre reagentes hidrofóbicos e hidrofílicos.

O estudo verificou que tal reação é possível, permitindo a solubilização de ambos os reagentes hidrofílicos e hidrofóbicos. A lipase fica localizada na interface, e não é muito perturbada pela interação intermicelar. No caso do ácido oleico e derivados do pentanol, a natureza da interface é fortemente perturbada. A natureza do pentanol não contribui para a perturbação observada mesmo que a viscosidade seja fortemente diminuída. A mudança de atividade da lipase dos alcoóis não é devido a um efeito estrutural, mas é provavelmente devido à especificidade da enzima [PAPADIMITRIOU et al., 1995].

Avramiotis et al. (1996) utilizaram microemulsões água-óleo baseadas em lecitina e AOT para solubilizar lipase de *Pseudomonas cepacia*. A atividade enzimática foi testada na reação de esterificação entre o ácido láurico e vários alcoóis de cadeia curta. Foi constatado que a lipase é específica em sistemas com propanol em lecitina, enquanto as microemulsões com AOT a enzima não mostraram qualquer preferência a nenhum álcool. A enzima fica posicionada próximo à interface, com a eficiência da transferência sendo mais pronunciada em sistemas com AOT [AVRAMIOTIS et al., 1996].

Microemulsões água em óleo (A/O), composta por azeite virgem como a fase de óleo contínua, uma mistura de lecitina e propanol como emulsionantes e

água como a fase dispersa, tem sido utilizadas com sucesso como meio de um modelo biomimético para realizar reações enzimáticas que podem ocorrer naturalmente em azeite de oliva. O espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi utilizado para avaliar o tamanho dos domínios dispersos polares como uma função do teor de água; espectroscopia de ressonância elétrica paramagnética (EPR) foi utilizada para estudar a polaridade no interior dos pólos dispersos. O estudo verificou que a atividade enzimática foi afetada pelo ambiente restrito dos nanorreatores e também a polaridade diferente do meio, levando a velocidade inicial a valores comparáveis para ambos os substratos [PAPADIMITRIOU et al., 2011].

As microemulsões em óleo de oliva foram preparadas misturando óleo de oliva virgem com uma mistura de lecitina e 1-propanol para resultar em um sistema contendo 85% de óleo de oliva virgem, 10% de 1-propanol e 5% de lecitina. Em seguida, quantidades adequadas de água ou tampão aquoso foram adicionadas para obter uma solução clara de micela reversa. A atividade enzimática e a especificidade de substrato foram significativamente afetadas nas microemulsões principalmente devido à baixa polaridade e a ausência de água livre no microambiente onde as enzimas foram realocadas [PAPADIMITRIOU et al., 2011].

Podemos citar ainda diversos trabalhos em que micelas reversas foram utilizadas para solubilizar lipases em reações de esterificação. O efeito da adição de água foi avaliado, bem como o rendimento das reações, citando a facilidade em recuperar o produto da reação [ZOUMPANIOTI et al., 2006; ZOUMPANIOTI et al., 2010].

3.5.3 Microemulsões em fluido supercrítico

Estudos em que micelas são formadas em fluidos supercríticos têm sido realizados nas últimas décadas devido às diversas vantagens que apresentam. A formação de micelas aumenta o rendimento da reação, pois facilita a solubilidade dos reagentes. O fluido supercrítico substitui o uso de solventes orgânicos, além de apresentar as vantagens já citadas de melhor solubilidade e difusividade.

Podemos citar o trabalho de Fulton e Smith (1988) que utilizaram o surfactante AOT para formar micelas reversas e microemulsões em etano e propano supercrítico em sistemas contendo alcanos. As microemulsões formadas mostraram ser fortemente dependentes da pressão. Também se verificou que a solubilidade de AOT em etano e propano apresenta comportamento típico de sólidos em fluidos supercríticos. A 300 bar, o sistema propano-SC e surfactante é capaz de solubilizar uma quantidade muito maior de água do que o sistema etano-SC e surfactante. A difusividade de reagentes ou produtos é maior em fluido supercrítico em comparação com líquidos, altas velocidades de transporte são verificadas, podendo aumentar potencialmente as velocidades da reação [FULTON E SMITH, 1988].

No trabalho de Hakoda et al. (2003) foram formadas micelas reversas em AOT em uma reação enzimática contendo lipases em etano supercrítico. As micelas reversas foram formadas sob várias condições onde seus diâmetros hidrodinâmicos foram medidos usando o espectrofotômetro de espalhamento dinâmico de luz. As observações indicam que a lipase em micelas reversas AOT em etano supercrítico apresenta boa atividade. A conversão de trioleína aumentou com o aumento no tamanho das micelas reversas. Ficou claro que a lipase em AOT com formação de micelas em etano supercrítico mostra atividade, sendo que a conversão de trioleína aumentou com o aumento da proporção de água, atingindo seu valor máximo perto da temperatura crítica.

Outros estudos demonstram a eficácia da utilização de micelas reversas em reações enzimáticas promovidas por fluidos supercríticos [HABULIN et al., 2008a; LI et al., 2007; KANE et al., 2000; EHRHARDT et al., 1999], citando vantagens tais como boa solubilidade, fácil recuperação dos produtos, alta atividade enzimática, altos rendimentos, não toxicidade dos solventes, podendo ser utilizado em aditivos alimentares.

Blattner et al. (2006) utilizaram lipases encapsuladas em microemulsões de lecitina baseadas em organogéis para realizar a reação de esterificação do ácido láurico e 1-propanol e $scCO_2$ como solvente para o substrato. Velocidades iniciais maiores foram observadas no sistema com $scCO_2$ quando comparado com a reação utilizando isooctano como solvente. O estudo em questão se mostrou como uma

alternativa promissora para processos de bioconversão, atingindo 36% em 3 horas de reação.

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na revisão bibliográfica constatou-se que há vários trabalhos que citam reações enzimáticas para a produção de diversos compostos químicos. E, atualmente, é tendência na indústria fazer a substituição de catalisadores químicos por catalisadores enzimáticos. Em contrapartida, são poucos os trabalhos na literatura que relatam tais reações enzimáticas conduzidas em condições supercríticas, fazendo uso do dióxido de carbono como solvente.

Neste contexto, o presente trabalho aborda a produção enzimática de monoestearato de glicerila em $scCO_2$, onde os efeitos dos parâmetros reacionais serão investigados, bem como dados de equilíbrio inéditos para o referido sistema.

Também aborda a produção enzimática de epóxidos fazendo uso de micelas reversas. Este estudo foi conduzido a baixas e altas pressões e os parâmetros reacionais investigados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e os métodos utilizados nas duas reações estudadas neste trabalho: a reação de esterificação para obtenção do mono-oleato de glicerila e a reação de epoxidação para a obtenção do epóxido derivado do ácido oleico.

4.1 OBTENÇÃO DA MONO-OLEÍNA

Neste item estão incluídas as especificações dos materiais utilizados, as metodologias de análise e os procedimentos experimentais realizados para obtenção da mono-oleína a partir da reação de esterificação do ácido oleico com solketal em scCO₂ supercrítico. Os procedimentos para obtenção dos dados de equilíbrio de fases para os sistemas binário (CO₂ + solketal) e ternário (CO₂ + solketal + ácido oleico) também estão descritos.

4.1.1 Especificação dos Materiais

Nos experimentos para a obtenção dos dados de equilíbrio de fases e na reação de esterificação para síntese da mono-oleína foram utilizadas os seguintes materiais (todos os materiais foram utilizados como recebido, sem nenhum tipo de tratamento):

- ácido oléico padrão analítico (Vetec);
- R,S-1,2-Isopropilidenglicerol (solketal) (pureza 98%, Sigma Aldrich);
- dióxido de carbono USP 99,9% (White Martins);
- lipase Lipozyme® obtida de Mucor Miehei, imobilizada em resina de troca iônica macroporosa, 30 U/g (1 U corresponde à quantidade de enzima

que liberta 1 μmol de ácido esteárico por minuto a pH 8,0 e 70°C) (Sigma Aldrich);

Na quantificação dos produtos, foram utilizados os seguintes materiais:

- n-heptano, pureza 99,5% (Vetec);
- acetato de cobre II, padrão analítico (Vetec).
- N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) (Sigma-Aldrich)

4.1.2 Procedimento Experimental

4.1.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A caracterização microestrutural dos biocatalisadores foi realizada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio Shimadzu SuperScan SS-550 com a finalidade de verificar alterações na lipase antes e após o uso na reação. Esta técnica permite visualizar a superfície do material. Todas as micrografias foram obtidas das superfícies do material seco recobertas com ouro.

4.1.2.2 Determinação do rendimento da reação

O método modificado de Lowry and Tiesley (1976) foi utilizado para quantificar os produtos da reação. Trata-se de um método colorimétrico que mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons cobre II e os ácidos graxos livres solúveis na fase orgânica. Tal técnica apresenta maior rapidez de análise e menor custo. Os resultados obtidos pelo método de Lowry-Tiesley foram confirmados por meio de cromatografia gasosa acoplado à espectroscopia de massa.

Inicialmente, foi preparada uma solução aquosa 5% (p/v) de acetato de cobre(II). Essa solução foi filtrada e o pH ajustado na faixa de 6,0-6,2 com a utilização de piridina.

Alíquotas de 300 μL do meio reacional (diluído 10 vezes em heptano) foram retiradas e transferidas para frascos *eppendorff*, que continham 300 μL de solução de acetato de cobre II (preparação previamente descrita) e 600 μL de heptano. A solução final foi vigorosamente agitada em vórtex por 30 segundos e aguardava-se a separação das fases, após o descanso por alguns minutos. A fase superior foi analisada em espectrofotômetro a 715 nm. Cada reação foi analisada em duplicata e o rendimento calculado de acordo com a diferença de absorbância da amostra e da solução estoque. Para comprovar a eficácia do método, leituras em GC foram realizadas.

A análise de GC-MS foi realizada utilizando o método modificado EN 14105. Os ácidos graxos livres e o R,S-1,2-Isopropilidenglicerol (solketal) foram transformados em derivados silanizados mais voláteis na presença de piridina e MSTFA. As medidas foram realizadas em duplicata em um cromatógrafo gasoso Agilent GC 7890 acoplado a um detector de massa MS 8990, com uma coluna capilar (ZB-5 30m x 0,25m x 0,1 μm). As amostras em GC-MS foram preparados por dissolução de 0,1g do produto final em 1 mL de n-heptano. Alíquotas de 100 μL desta solução foram adicionados 100 μL de MSTFA. Após 15 minutos, estes reagentes foram dissolvidos em n-heptano. Alíquotas de 1 μL desta amostra foi então injetada no GC.

4.1.2.3 Aparato experimental utilizado no equilíbrio de fases

As medidas experimentais de equilíbrio de fases a altas pressões foram baseadas no método estático sintético e o aparato e metodologia experimentais utilizados são similares ao proposto por Pinto et al. (2013), Santos et al. (2012), Mazzer et al. (2012) e Giufrida et al. (2011). O aparato experimental é composto de uma bomba volumétrica de alta-pressão do tipo seringa (ISCO 260D, Lincoln, USA) e uma célula volumétrica de alta pressão com capacidade de 27 cm^3 , de volume

variável e com janelas laterais e frontal de safira. As condições operacionais foram controladas por meio de um controlador de pressão absoluto com precisão de 0,03 MPa (Smar LD 301, Sertãozinho, Brasil) e controlador de temperatura ligado a um termopar (tipo T, a precisão de $\pm 1,0$ K), que esteve em contato com o sistema no interior da célula. Internamente, a célula de equilíbrio é composta por um pistão móvel, que permite a variação da pressão, controlada por uma bomba do tipo seringa (Figura 9).

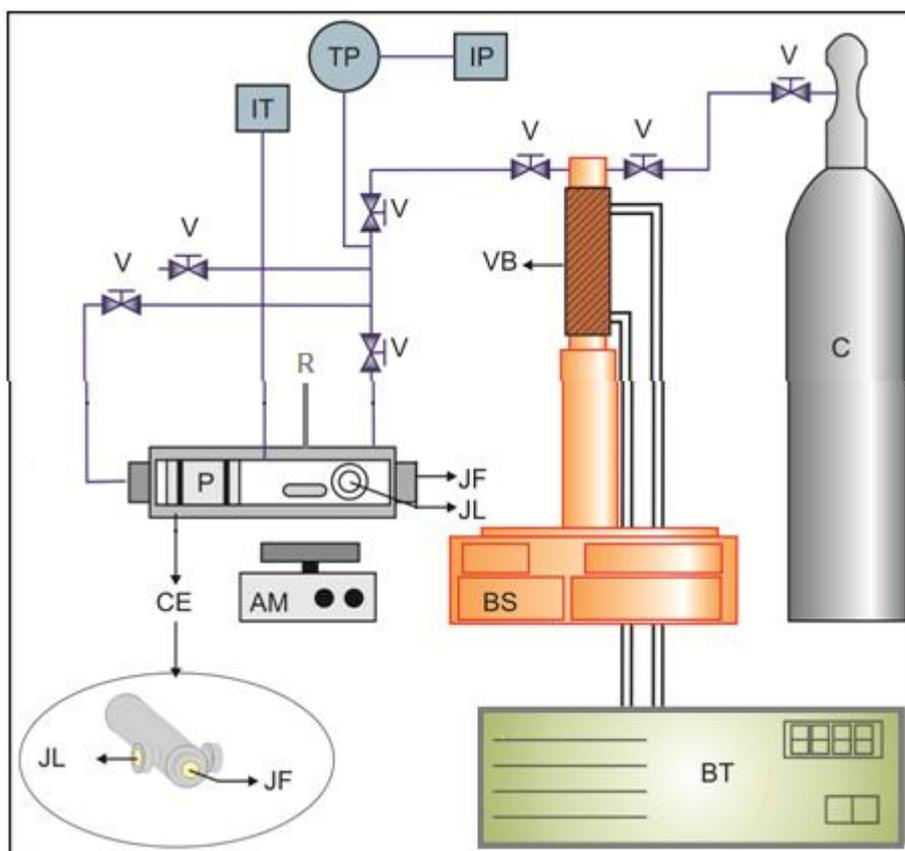


Figura 9. Aparato experimental. BS – Bomba tipo seringa, C – Cilindro de CO₂, VB – Vaso da bomba, V – Válvulas do tipo agulha, AM – Agitador magnético, CE – Célula de equilíbrio, JF – Janela frontal, JL – Janela lateral, R – Resistência elétrica, P – Pistão, IT – Indicador de temperatura, TP – Transdutor de pressão, IP – Indicador de pressão, BT – Banho termostático.

Ao início de cada experimento, a célula era purgada com CO₂ para remoção do ar residual. A alimentação da célula (solketal ou solketal + ácido oleico) foi realizada por meio da injeção com uma seringa, pela abertura da conexão da linha de alimentação, à temperatura ambiente. O reator era fechado e então conectado a linha de abastecimento do solvente. Todos os controladores e cabos eram conectados e iniciava a alimentação do reator com o solvente. Com condições previamente determinadas de pressão e temperatura é possível determinar a quantidade exata de CO₂ a ser alimentado, calculado a partir de sua densidade. A pressão do sistema é calculada pela equação de Peng-Robinson. Inicialmente, a temperatura foi fixada e o sistema pressurizado até se manter monofásico. Em seguida, para obtenção dos dados de equilíbrio do tipo LV diminuía-se a pressão do sistema gradativamente até o surgimento de uma nova fase. As medidas de transição foram realizadas para as temperaturas de 35, 45, 55 e 65°C. Os dados foram obtidos com base em três repetições de cada ponto experimental.

4.1.2.4 Aparato experimental utilizado na reação de esterificação

O aparato utilizado para conduzir a reação de esterificação para obtenção da mono-oleína foi o mesmo descrito no item 4.1.2.3 (Figura 9). A célula de equilíbrio foi usada como reator, com a diferença que, durante todo o tempo reacional, tanto a pressão quanto a temperatura se mantiveram fixas em condições operacionais pré-determinadas.

Para o preparo do sistema reacional, quantidades pré-definidas de ácido oleico, solketal e de biocatalisador foram pesadas em balança analítica e adicionadas ao reator (célula de equilíbrio), à temperatura ambiente, juntamente com a barra magnética para promover a agitação do sistema. O reator foi fechado e conectado à linha de abastecimento do solvente. Todos os controladores e cabos eram conectados e iniciava a alimentação do reator com CO₂, a 20°C e 100 bar. A densidade do sistema foi fixada em 718 kg/m³. Em seguida, a temperatura foi ajustada na condição da reação. Foi considerado como tempo inicial da reação o

momento em que o sistema atingiu a temperatura e pressão desejadas. Depois do tempo estipulado de reação, o sistema foi resfriado e despressurizado lentamente. O material foi coletado e as amostras analisadas em duplicata pelo método colorimétrico de Lowry-Tiesley, descrito no item 4.1.2.2.

4.1.2.5 Estudo das condições de operação

Com base nos dados disponíveis na literatura, iniciou-se o estudo da produção de mono-oleína por método enzimático em $scCO_2$ como solvente. O estudo foi realizado por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) considerando 3 variáveis independentes: temperatura, quantidade de catalisador e razão molar AO:solketal. O tempo não foi selecionado como variável independente para evitar que mascarasse o efeito das demais variáveis, já que possui grande influência em qualquer reação. Esta variável foi estudada após realizar o planejamento de experimentos. O tempo reacional selecionado para conduzir as reações foi baseado em dados experimentais disponíveis na literatura e considerando que reações enzimáticas tendem a ocorrer rapidamente.

Foram selecionadas concentrações de solketal maiores que a quantidade estequiométrica do ácido oleico para deslocar o equilíbrio em direção à formação do produto.

As temperaturas selecionadas estão na faixa de temperatura que as lipases atuam (33 – 67°C). Maiores temperaturas poderiam causar a desnaturação da enzima.

A quantidade de catalisador foi baseada no exposto na literatura e em uma faixa suficientemente ampla (0,1 – 13% em relação à massa de substrato).

O tempo foi fixado em 3 horas, suficiente para que a reação ocorra, baseado no exposto na literatura, visto que reações enzimáticas possuem cinética rápida [ITABAIANA et al., 2012]. A densidade do CO_2 foi mantida em 718 kg/m³. Nesta densidade, os substratos da reação estão todos solubilizados (verificado por meio

dos dados de transição de fase). As variáveis estudadas e os respectivos níveis são apresentados na Tabela 6.

Novos testes foram realizados com base nos resultados obtidos no DCCR com a finalidade de aumentar o rendimento da reação. Testes com razões molares maiores de substratos (AO:solketal) foram avaliados, bem como a cinética da reação.

Tabela 6. Variáveis e níveis avaliados no DCCR.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	33	40	50	60	67
(Enzima] (m/m%)	0,1	1	5,5	10	13
Razão AO:Solketal	1:0,1	1:1	1:3	1:5	1:6,4

4.2 OBTENÇÃO DO EPÓXIDO

Neste item estão incluídas as especificações dos materiais utilizados, as metodologias de análise e os procedimentos experimentais realizados para obtenção do ácido epoxioleico a partir da reação de epoxidação do ácido oleico com uso de peróxido de hidrogênio como doador de oxigênio. As reações foram conduzidas em baixas pressões e altas pressões. Em condições pressurizadas foi utilizado CO₂. Os procedimentos para obtenção dos dados de equilíbrio de fases para o sistema ternário (CO₂ + acetato de etila + ácido oleico) também são descritos.

4.2.1 Materiais

Para a obtenção dos dados de equilíbrio de fase e para a reação de epoxidação para obtenção do ácido epoxioleico foram utilizados os seguintes materiais (todos os materiais foram utilizados como recebido, sem tratamentos prévios):

- ácido oléico grau analítico (Vetec);
- acetato de etila grau analítico (Merck e Sigma Aldrich);
- peróxido de hidrogênio 35% (m/m) (Soluay Chemicals S.A. e FMaia);
- iso-octano grau analítico (Merck);
- 1-propanol grau analítico (Sigma Aldrich);
- Hidroxypropyl methyl cellulose (HPMC, viscosidade 2600–5600 cP, 2% em H₂O, 20°C) obtido da Sigma Aldrich;
- trizma hydrochloride, grau reagente (Sigma Aldrich);
- lecitina (L- α -Phosphatidyl-Choline)(L- α -lecithin) contendo 36% de fosfatidilcolina (Sigma Aldrich);
- lipase *Candida antarctica B* recombinada do microrganismo *aspergillus oryzae*. A atividade enzimática da enzima foi de 10,8 U/mg (U corresponde à quantidade de enzima necessária para hidrolisar tributirina, de modo que 1 mol de ácido butírico por minuto em pH 8 e temperatura de 50°C é liberado) (Sigma Aldrich).

Na quantificação dos produtos, foram utilizados os seguintes materiais:

- acetato de etila grau analítico (Merck e Sigma Aldrich);
- n-dodecano grau analítico (Sigma Aldrich);
- metanol grau-HPLC (Lab-Chem);
- N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSDFA).

4.2.2 Procedimento Experimental

4.2.2.1 Preparo da microemulsão

Microemulsões de lecitina foram usadas para imobilizar a enzima. Tais microemulsões contêm 3,5% (m/m) de lecitina dissolvida em iso-octano com 5% (v/v) de 1-propanol. As proporções para a formação da microemulsão foram determinadas em trabalhos anteriores do grupo [DELIMITSOU et al., 2002]. Quantidades determinadas da enzima *Candida antarctica B* foram dissolvidas em solução tampão tris/HCl (pH = 7,5) e adicionadas a 980 µL de microemulsão. (O volume total de microemulsão com enzima foi de 1 mL, sendo 980 µL de microemulsão e 20 µL de enzima+tampão).

4.2.2.2 Preparo das microemulsões baseadas em organogéis

As microemulsões baseadas em organogéis (MBGs) foram preparadas introduzindo quantidades apropriadas de microemulsões contendo a lipase *Candida antarctica B* (previamente descrita) para uma segunda solução de hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) em água. Para isso, 1 mL de lecitina contendo a lipase foi geleificada com 1g de HPMC e 2 mL de água, à temperatura ambiente. Esta solução foi misturada até se tornar homogênea, sendo então adicionada ao meio reacional.

4.2.2.3 Síntese enzimática do epóxido do ácido oleico

Reação a baixa pressão (Os ensaios foram realizados no laboratório do Instituto de Biologia, Química Medicinal e Biotecnologia, Atenas, Grécia):

A síntese enzimática a baixa pressão do epóxido foi realizado em uma incubadora shaker orbital Lab Tech tipo horizontal com controle de temperatura e agitação. A agitação foi fixada em 150 rpm e a reação foi conduzida em um frasco reagente de vidro com tampa. Neste frasco foi adicionado 5 mL de acetato de etila (quantidade mantida fixa em todo os experimentos), quantidades pré-determinadas de ácido oleico e 10 µL de dodecano (padrão interno para análise em GC). Com os substratos prontos, foi adicionado à esse frasco/reator a MBGs previamente preparada (descrito no item 4.2.2.2). Ao adicionar peróxido de hidrogênio (1,2 mL) ao sistema reacional iniciou-se a contagem do tempo, depois de incubar no sistema por 10 minutos. Amostras foram retiradas a intervalos fixos de tempo e analisadas através de cromatografia gasosa e de um sistema LC/MS/MS.

Reação a altas pressões

Para a síntese enzimática a alta pressão do epóxido foi utilizada a célula de equilíbrio como reator. O procedimento experimental utilizado foi o mesmo utilizado para a obtenção da mono-oleína, descrito no item 4.1.2.4. O modo de preparo das MBGs foi igual ao usado para preparar o sistema a baixa pressão, descrito no parágrafo anterior. Ao reator foi adicionado 5 mL de acetato de etila (quantidade mantida fixa em todo os experimentos), quantidades pré-determinadas de ácido oleico e de H₂O₂. Posteriormente, estes substratos foram adicionados ao reator juntamente com a MBGs previamente preparada (descrito no item 4.2.2.2).

4.2.2.4 Determinação do rendimento da reação

Reação a baixa pressão (As análises foram realizadas no laboratório do Instituto de Biologia, Química Medicinal e Biotecnologia, Atenas):

O rendimento das reações de epoxidação foi monitorado via GC e a identificação do produto através do método analítico LC-MS/MS.

Cromatografia Gasosa: Para a determinação do rendimento da reação, foi utilizado um cromatógrafo gasoso Hewlett Packard (HP), modelo 6890C. As

condições cromatográficas empregadas foram: coluna capilar HP-INNOWAX (30m x 0,32 mm d.i. x 0,25 μ m) a um fluxo de 1 mL/min. A temperatura do injetor foi de 270°C e a temperatura do detector FID de 290°C. A temperatura do forno aumentou de 150 até 260°C a uma taxa de 30°C/min e mantida constante por 12 minutos. Os dados foram analisados baseados no consumo de ácido oleico durante a reação, por meio de uma curva de calibração. N-dodecano foi utilizado como padrão interno.

Cromatografia Líquida – Espectroscopia de Massa: O procedimento de preparação da amostra envolveu diluição de cada amostra em metanol. O sistema LC-MS/MS consistia em um espectrômetro de massa 3200 Q TRAP® com íon triplo-quadrupolo linear equipado com uma interface TurbolonSpray (AB Sciex Instruments, EUA) e um sistema Agilent HPLC 1200 (consistindo de um micro degaseificador a vácuo G1379B, um bomba binária G1312A, um amostrador automático G1329 e um compartimento para coluna G1316A). A separação foi realizada utilizando uma coluna de fase inversa Zorbax Eclipse Plus C-18 (50 mm x 2,1 mm de diâmetro interno, 3,5 μ m tamanho de partícula). A fase móvel consistiu de fase A (água com 0,05% de ácido fórmico (v/v)) e fase B (acetonitrila com 0,05% de ácido fórmico (v/v)). A velocidade de fluxo foi de 0,3 mL / min. A fim de determinar os analitos, um sistema de gradiente foi aplicado: 90% da fase B foram mantidos durante 1 minuto e aumentou para 98% por 7 minutos. Após, mantida a 98% durante 3 minutos e diminuiu para 90% ao longo de 1 minuto, em que foram re-equilibrados durante 2 minutos. O tempo de análise total foi de 14 minutos. O sistema foi operado uma temperatura ambiente (23-25°C). A saída da coluna foi diretamente ligada à sonda ESI com tubo PEEK. O volume de injeção foi de 5 μ L.

Ionização por electrospray (ESI) operando em modo negativo foi usado para todos os analitos. Solução de ácido oleico em metanol de 1 mg/mL foi infundido diretamente usando uma bomba seringa. A aquisição dos dados foi realizada no modo Q1 MI (quadrupolo de íons múltiplos) e os seguintes íons foram monitorados: (m/z): 281,2 (ácido oleico); 279,1 (ácido linoleico); 297,1 (epóxido ácido oleico); 295,1 (mono-epóxido de ácido linoleico); e 311,4 (di-epóxido linoleico).

Reação a altas pressões:

Para a análise dos produtos da reação, foi utilizado um cromatógrafo gasoso Agilent GC 7890 acoplado a um detector de massa MS 8990 e a separação ocorreu com uma coluna capilar (ZB-5, 30 m x 0,25 mm x 0,1 µm). A temperatura da coluna se manteve a 60°C por 1 minuto e então aumentou para 280°C a 15°C/min, se mantendo por 10 minutos. O gás de arraste foi o hélio (He) com um fluxo de 1 mL/min. A temperatura de injeção foi de 280°C. As temperaturas da fonte de íons e a interface foram de 280 e 200°C, respectivamente. Os ácidos graxos foram transformados em derivados silanizados mais voláteis na presença de piridina e MSTFA. As amostras foram preparadas pela adição de 100 µL de MSTFA a 100 µL da reação. Depois de 15 minutos, estes reagentes foram dissolvidos em 2 mL de acetato de etila. Alíquotas de 1µL desta amostra foi injetada no equipamento GC-MS.

Foram reproduzidos alguns experimentos realizados em Atenas e analisados no cromatógrafo gasoso do Laboratório de Tecnologia Supercrítica e Equilíbrio de Fases / DEQ / UEM para verificar a reprodutibilidade dos resultados. Os resultados foram semelhantes, tornando possível a utilização do equipamento e da técnica.

4.2.2.5 Estudo das condições de operação

Reação a baixa pressão (Laboratório do Instituto de Biologia, Química Medicinal e Biotecnologia, Atenas):

Para determinar as condições ótimas da reação de epoxidação do ácido oleico foi utilizado o Delineamento Composto Central (DCC) com três variáveis: temperatura, quantidade de enzima e concentração de ácido oleico. O ponto central foi realizado em triplicata para calcular o erro experimental. As variáveis e seus níveis reais e codificados estão demonstrados na Tabela 7. Estudos prévios conduzidos pelo grupo de pesquisa indicaram que a quantidade de peróxido não afeta o rendimento da reação. Foi conclusivo neste estudo que o organogel fornece proteção à enzima, que não sofre a ação do H₂O₂. Desta forma, a quantidade de

H₂O₂ foi fixada em excesso, em 1,2 mL. O tempo de reação foi estudado posteriormente e, nas reações do planejamento, foi fixado em 10 horas. Os níveis de cada variável foram selecionados baseados em resultados prévios e da experiência sobre o tema pelo grupo de pesquisa.

Tabela 7. Valores reais e codificados avaliados no DCC.

Fator	-1	0	+1
Temperatura (°C)	35	45	55
Concentração de enzima (mg/mL de microemulsão)	0,4	0,6	0,8
Concentração de ácido oleico (mmol/L)	50	75	100

Reação a alta pressão com scCO₂

Para determinar as condições ótimas da reação de epoxidação do ácido oleico em scCO₂ foi utilizado o planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹ com dois níveis e quatro variáveis independentes: temperatura, quantidade de enzima, concentração de H₂O₂ e concentração de ácido oleico. O ponto central foi realizado em triplicata, e o planejamento totalizou 11 experimentos. As variáveis e seus níveis reais e codificados são apresentados na Tabela 8. O tempo foi mantido constante em 3 horas de reação. A pressão do CO₂ foi mantida em 718 kg/m³.

A faixa de temperatura estudada foi a mesma avaliada na reação realizada em condições ambientes (35 – 55°C).

A concentração de H₂O₂ foi incluída como uma variável no planejamento e em baixa concentração, pois pode influenciar negativamente no rendimento da reação, já que o CO₂ possui baixa afinidade a água. O oxidante utilizado possui 35% de H₂O₂, o restante é constituído por água.

A faixa selecionada para avaliar a concentração de ácido oleico foi mais ampla, pois se considerarmos proporções industriais seria necessário um volume

extremamente grande de acetato de etila para a produção de uma pequena quantidade de epóxido (5 mL de acetato de etila e 50 mM de AO \cong 100 μ L de AO).

Tabela 8. Valores reais e codificados avaliados no DCC.

Fator	-1	0	+1
Temperatura ($^{\circ}$ C)	35	45	55
Qtde de enzima (mg/mL microemulsão)	0,8	1,5	2,2
Volume de H ₂ O ₂ (μ L)	200	600	1000
Concentração de ácido oleico (mM)	0,1	0,5	0,9

4.2.2.6 Reuso do catalisador

A fim de determinar a estabilidade da lipase imobilizada em organogéis (HPMC), o biocatalisador foi reutilizado em independentes bateladas consecutivas. Cada batelada da reação foi mantida durante 80 min a 35 $^{\circ}$ C. O volume total da reação foi de 6,2 ml em cada caso. Depois de cada execução, os organogéis contendo lipase foram lavados três vezes com 5 mL de acetato de etila e uma nova reação de epoxidação foi realizada tal como descrito anteriormente.

5. RESULTADOS: PRODUÇÃO DE MONO-OLEÍNA

5.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos na produção enzimática da mono-oleína em sistemas pressurizados. A primeira etapa do trabalho consistiu em obter os dados de transição de fase dos componentes envolvidos na reação. Posteriormente, são apresentados os resultados da reação de esterificação para formação da mono-oleína.

5.1.1 Dados de equilíbrio de fases

Para identificar as regiões de temperatura e pressão mais apropriadas para a síntese da mono-oleína, é importante o conhecimento sobre o comportamento de fases dos componentes envolvidos no sistema estudado. Desta forma, os dados de transição de fase de misturas binárias e ternárias entre o solketal, ácido oleico e o dióxido de carbono como solvente foram obtidos.

Seguindo o procedimento experimental descrito no Capítulo 4 no item 4.1.2.4, foram obtidos dados experimentais de equilíbrio de fases para os seguintes sistemas binário e ternário: CO₂ + solketal e CO₂ + solketal + ácido oleico a 35, 45, 55 e 65°C.

5.1.1.1 Sistema binário CO₂ + solketal

As medidas experimentais para o sistema binário CO₂(1)+solketal(2) foram realizadas em frações molares de dióxido de carbono na faixa de entre 0,35 a 0,85 e nas temperaturas de 35, 45, 55 e 65°C. Na Tabela 9 são apresentados os valores

experimentais $P \times T$ e as transições de fase, sendo que foram detectados apenas equilíbrio líquido-vapor (ELV) do tipo ponto de bolha (PB) em todas as frações estudadas. A pressão medida e o desvio padrão relativo a estas medidas são apresentados para cada temperatura e composições globais avaliadas. Os dados experimentais são apresentados em termos de fração molar de CO_2 (x_1), pressão de transição de fase (P) e o desvio padrão das replicatas $u(p)$.

Tabela 9. Dados de equilíbrio de fase ELV do sistema $\text{CO}_2(1) + \text{solketal}(2)$.

x_1	P/MPa	uP ()/MPa	Tipo ^b	x_1	P/MPa	$u(p)$ /MPa	Tipo ^b
$T = 35^\circ\text{C}$				$T = 45^\circ\text{C}$			
0,35	2,93	0,02	ELV (PB)	0,35	3,45	0,01	ELV (PB)
0,45	3,67	0,01	ELV (PB)	0,45	4,36	0,01	ELV (PB)
0,55	4,21	0,01	ELV (PB)	0,55	5,24	0,02	ELV (PB)
0,65	4,85	0,03	ELV (PB)	0,65	6,35	0,02	ELV (PB)
0,75	5,45	0,02	ELV (PB)	0,75	7,65	0,02	ELV (PB)
0,85	6,26	0,01	ELV (PB)	0,85	8,29	0,01	ELV (PB)
$T = 55^\circ\text{C}$				$T = 65^\circ\text{C}$			
0,35	3,99	0,02	ELV (PB)	0,35	4,40	0,01	ELV (PB)
0,45	5,14	0,01	ELV (PB)	0,45	6,07	0,01	ELV (PB)
0,55	6,18	0,02	ELV (PB)	0,55	7,13	0,01	ELV (PB)
0,65	7,50	0,02	ELV (PB)	0,65	8,87	0,01	ELV (PB)
0,75	9,13	0,02	ELV (PB)	0,75	10,34	0,03	ELV (PB)
0,85	9,93	0,01	ELV (PB)	0,85	12,14	0,02	ELV (PB)

A Figura 10 apresenta graficamente os resultados experimentais obtidos para o sistema $\text{CO}_2(1) + \text{solketal}(2)$. Observa-se que, ao aumentar a fração de CO_2 , aumenta a pressão da transição de fase. Para cada uma das isotermas representadas, a região acima da curva dos pontos experimentais representa uma região de uma única fase fluida, enquanto que abaixo da curva tem-se uma região

em que duas fases coexistem. Esta região é constituída por uma líquida e outra vapor.

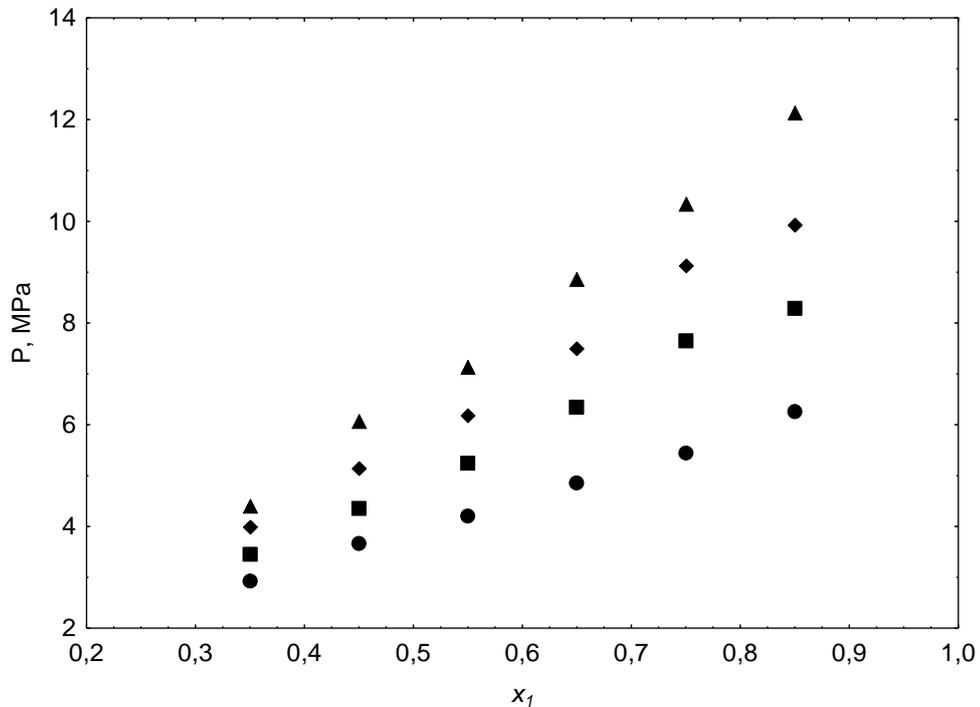


Figura 10. Diagrama da composição-pressão do sistema $\{CO_2(1) + solketal(2)\}$ para $T = 35^\circ C$ (●); $45^\circ C$ (■); $55^\circ C$ (◆); $65^\circ C$ (▲).

É possível verificar que o solketal apresenta boa solubilidade em CO_2 em todas as composições avaliadas. Para fins de comparação, podemos citar dados do sistema binário entre CO_2 e glicerol. O glicerol possui uma estrutura semelhante e é o álcool mais utilizado na produção da mono-oleína. Medina-Gonzalez et al. (2013) estudaram este sistema em temperaturas entre 40 e $200^\circ C$ a pressões até 35MPa. Em relação à fase rica em CO_2 , observou-se que a solubilidade de CO_2 em glicerol foi extremamente baixa. Por outro lado, a fase rica em glicerol dissolveu-se facilmente em CO_2 .

5.1.1.2 Sistema Ternário

As medidas experimentais para o sistema ternário CO₂(1)+solketal(2)+ ácido oleico(3) foram realizadas em frações molares de CO₂ na faixa de 0,55 a 0,95 nas temperaturas de 35, 45, 55 e 65°C. A razão molar entre solketal:ácido oleico foi constante e igual a 3:1 (0,75 solketal + 0,25 ácido oleico] (Tabela 10).

Tabela 10. Dados de equilíbrio de fase para o sistema {CO₂(1) + (0,75 solketal(2) + 0,25 ácido oleico(3))}.

x_1	x_2	P/MPa	$u(p)/$ MPa	Tipo ^b	x_1	x_2	P/MPa	$u(p)/$ MPa	Tipo ^b
$T = 35^\circ\text{C}$					$T = 45^\circ\text{C}$				
0,55	0,33	5,27	0,01	ELV (PB)	0,55	0,33	5,24	0,02	ELV (PB)
0,65	0,26	5,36	0,02	ELV (PB)	0,65	0,26	6,03	0,02	ELV (PB)
0,70	0,22	5,49	0,02	ELV (PB)	0,70	0,22	6,44	0,01	ELV (PB)
0,75	0,18	5,84	0,02	ELV (PB)	0,75	0,18	7,01	0,03	ELV (PB)
0,80	0,15	6,73	0,01	ELV (PB)	0,80	0,15	7,85	0,01	ELV (PB)
0,85	0,11	7,23	0,03	ELV (PB)	0,85	0,11	8,87	0,01	ELV (PB)
0,90	0,07	9,47	0,01	ELV (PO)	0,90	0,07	11,83	0,02	ELV (PO)
0,95	0,04	13,15	0,01	ELV (PO)	0,95	0,04	15,50	0,01	ELV (PO)
$T = 55^\circ\text{C}$					$T = 65^\circ\text{C}$				
0,55	0,33	6,12	0,03	ELV (PB)	0,55	0,33	6,57	0,01	ELV (PB)
0,65	0,26	7,06	0,02	ELV (PB)	0,65	0,26	8,05	0,02	ELV (PB)
0,70	0,22	8,24	0,02	ELV (PB)	0,70	0,22	8,98	0,02	ELV (PB)
0,75	0,18	8,73	0,01	ELV (PB)	0,75	0,18	10,47	0,02	ELV (PB)
0,80	0,15	9,47	0,02	ELV (PB)	0,80	0,15	11,80	0,01	ELV (PB)
0,85	0,11	11,09	0,01	ELV (PB)	0,85	0,11	13,88	0,04	ELV (PB)
0,90	0,07	14,57	0,01	ELV (PO)	0,90	0,07	17,37	0,03	ELV (PO)
0,95	0,04	17,88	0,03	ELV (PO)	0,95	0,04	19,76	0,02	ELV (PO)

Foram verificadas transições de fases líquido-vapor (ELV) do tipo ponto de bolha (PB) e, em frações mais elevadas de CO₂, tipo ponto de orvalho (PO). Os dados experimentais são apresentados em termos de fração molar de CO₂ (x_1), fração molar de solketal (x_2), pressão de transição de fase (P) e o desvio padrão das replicatas $u(p)$ (Tabela 10).

Na Figura 11 é possível observar graficamente os resultados experimentais obtidos para o sistema ternário CO₂(1) + solketal(2) + ácido oleico(3). Ao aumentar a fração de CO₂, ocorre um aumento na pressão da transição de fase. Para cada uma das isotermais representadas, a região acima da curva dos pontos experimentais representa uma região com uma única fase. Abaixo da curva, duas fases distintas coexistem: uma líquida e outra vapor.

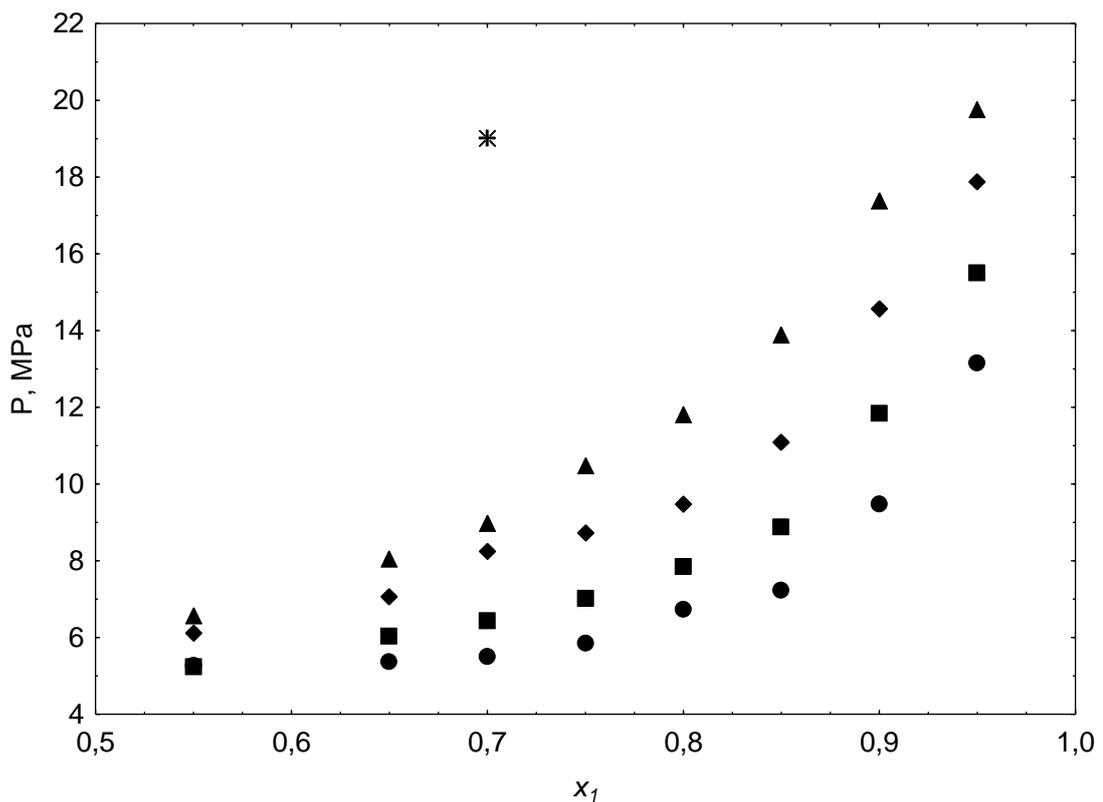


Figura 11. Diagrama da pressão-composição do sistema {CO₂(1) + (0,75 solketal(2) + 0,25 ácido oleico(3)) a T = 35°C (●); 45°C (■); 55°C (◆); 65°C (▲). Região onde ocorre a reação (*).

A Figura 12 compara os sistemas binários e ternários de solketal nas maiores e menores temperaturas estudadas: 35°C e 65°C. A pressão de transição de fase a 35°C é superior para o sistema ternário {CO₂ (1) + (0,75 solketal (2) + ácido oleico 0,25 (3))} do que para o sistema binário {CO₂ (1) + solketal (2)}, com exceção para a fração molar de CO₂ igual a 0,85. A 65°C, o sistema binário tem pressões de transição de fase ligeiramente mais elevadas do que o sistema ternário para frações molares de CO₂ inferiores a 0,75. A partir deste ponto, o sistema ternário tem pressões de transição de fase maiores do que o sistema binário. Assim, observa-se que a adição de ácido oleico no sistema binário {CO₂ (1) + solketal (2)} em uma razão molar de solketal:ácido oleico de 3:1 tem pouco efeito sobre as pressões de transição de fase.

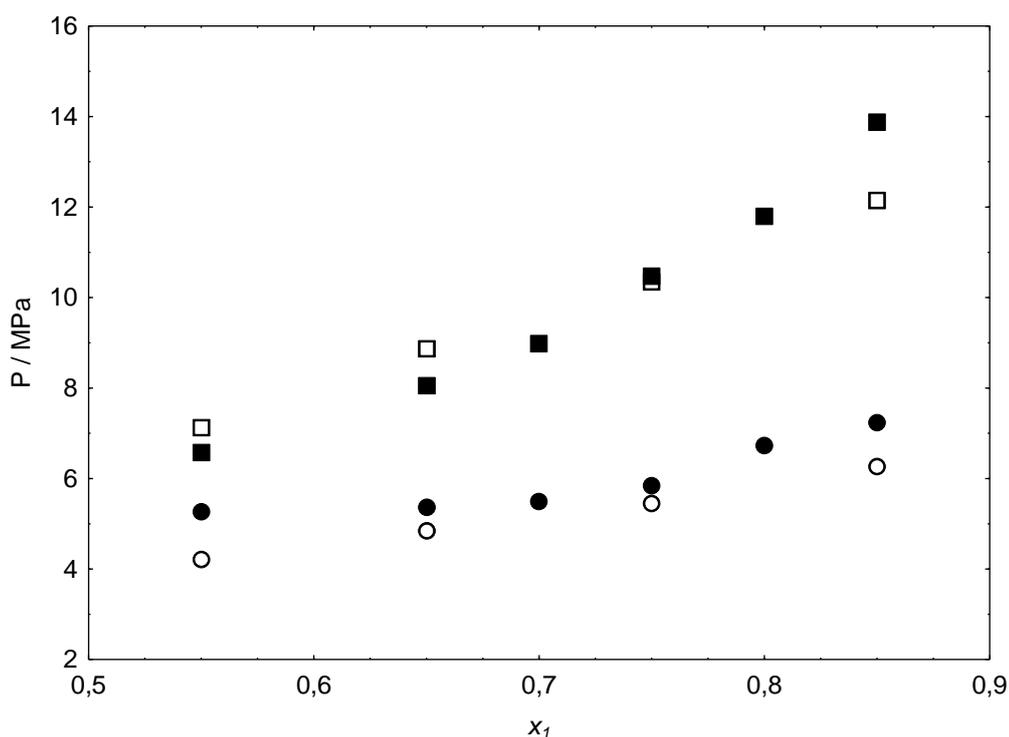


Figura 12. Comparação do diagrama pressão-composição entre os sistemas {CO₂(1) + solketal(2)} a T = 35°C (○); 65°C (□) e {CO₂(1) + (0,75 solketal(2) + 0,25 ácido oleico(3))} a T = 35°C (●); 65°C (■).

5.1.2 Modelagem

A equação de estado de Peng-Robinson com a regra mistura linear para o covolume (parâmetro b) e a regra de mistura quadrática para o parâmetro de atração (parâmetro a) foram usadas para modelar o comportamento de fase relatado neste trabalho. As temperaturas críticas, pressões críticas e fatores acêntricos do CO₂ e do ácido oleico foram obtidos a partir da base de dados DIPPR (2003). Os dados do solketal foram estimados utilizando o método de Constantinou e Gani (1994) considerando grupos de segunda ordem. A Tabela 11 apresenta as propriedades dos componentes puros e os parâmetros de interação binária ajustados conforme descrito a seguir.

Tabela 11. Temperaturas críticas, pressões críticas, fatores acêntricos e parâmetros de interação binária usados nos cálculos.

	CO ₂ (1)	Solketal (2)	Ácido oleico (3)
Temperatura crítica (°C)	31,21	362,5	508
Pressão crítica (bar)	73,83	36,18	13,9
Fator acêntrico	0,223621	0,3820	1,182
Parâmetros de interação binária	0	0,04744	0,02822
	0,04744	0	0
	0,02822	0	0

O parâmetro de interação binária para o par CO₂ – solketal foi ajustado utilizando os dados de equilíbrio de fase apresentados na Tabela 9. A equação de estado de Peng-Robinson correlaciona a pressão do sistema com um desvio relativo médio (DRM) de 3,6%, onde o DRM foi calculado como segue:

$$DRM = \sum_{j=1}^{n^{exp}} \left| \frac{p_j^{calc} - p_j^{exp}}{p_j^{exp}} \right| \cdot 100 \% \quad \text{Equação 1}$$

em que n^{exp} é o número total de pontos de dados experimentais, p é a pressão, e os sobrescritos "exp" e "calc" referem-se aos valores experimentais e calculados, respectivamente.

A Figura 13 demonstra que os maiores desvios entre os valores experimentais e calculados para o sistema binário {CO₂ (1) + solketal (2)} ocorrem na temperatura mais baixa medida (35°C). O ajuste para as outras temperaturas (45, 55 e 65°C) é substancialmente melhor.

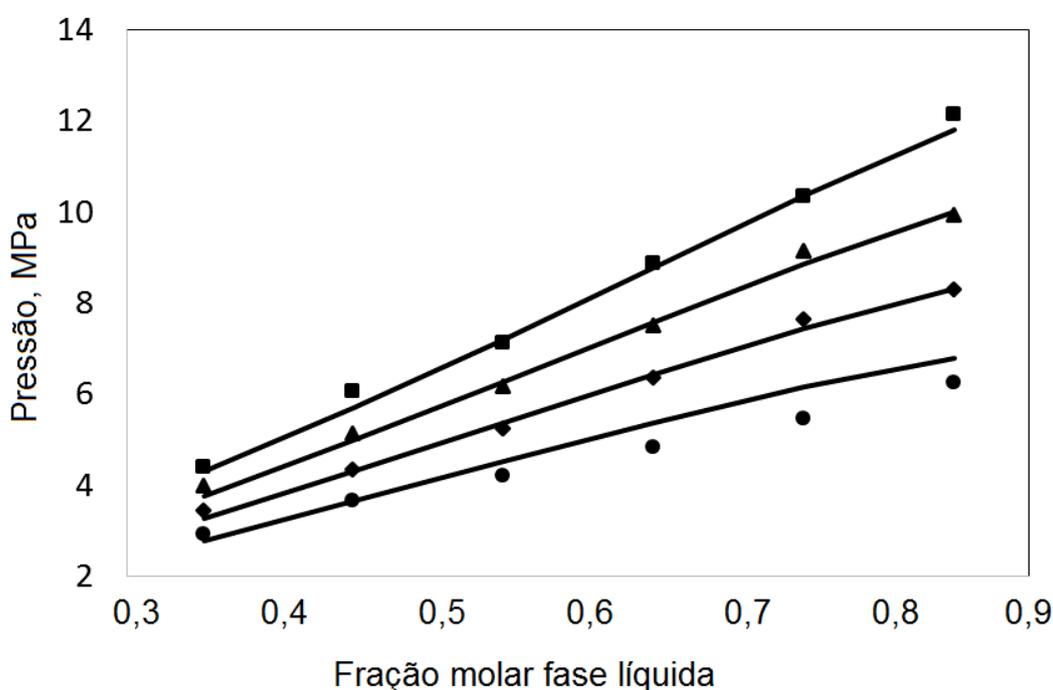


Figura 13. Pressões experimentais e calculadas no ponto de bolha para o sistema binário {CO₂(1) + solketal(2)} a diferentes temperaturas: ●, 35°C; ◆, 45°C; ▲, 55°C; ■, 65°C.

Com o parâmetro de interação CO₂-solketal fixo, os pontos de bolha para os dados ternários demonstrados na Tabela 10 foram utilizados para ajustar o parâmetro binário para a interação ácido oleico-CO₂ (Tabela 11). Uma tentativa de também ajustar o parâmetro de interação binária solketal-ácido oleico produziu pouca concordância nos resultados e um valor do parâmetro próximo a zero. Tendo

em vista seu pequeno efeito, o parâmetro de interação binário solketal-ácido oleico foi fixado em zero (Tabela 11). Os pontos de bolha do sistema ternário são correlacionada com uma DRM de 4,2%.

A Figura 14 apresenta as pressões calculadas e experimentais, com a linha diagonal como referência visual. Os valores calculados são bem alinhado com a diagonal, o que indica que eles estão bem correlacionadas, exceto por uma condição na faixa de baixa pressão e outra na faixa de alta pressão.

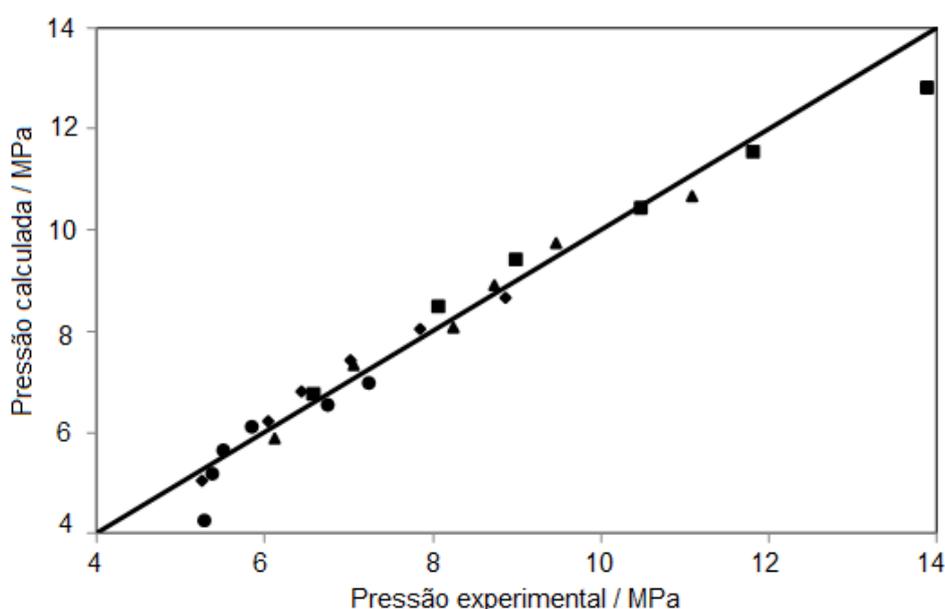


Figura 14. Pressões experimentais e calculados no ponto de bolha para o sistema ternário $\{\text{CO}_2(1) + \text{solketal}(2) + \text{ácido oleico}(3)\}$ em várias temperaturas: ●, 308 K; ◆, 318 K; ▲, 328 K; ■, 338 K.

5.1.3 Planejamento experimental

Tendo como objetivo estudar as variáveis relevantes na reação de esterificação e maximizar o seu rendimento, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo (DCCR) 2^3 , que totalizou 17 experimentos (com triplicata no ponto central) tendo a finalidade de verificar a influência de três variáveis

independentes: temperatura, razão molar ácido oleico:solketal e concentração de catalisador (enzima Lipozyme RM IM) com CO₂ supercrítico como solvente. O tempo foi mantido fixo em 3 horas de reação.

A Tabela 12 apresenta a matriz do planejamento de experimentos e as respostas em termos de rendimento em mono-oleína.

Tabela 12. Valores reais e codificados e resposta do Planejamento.

Experimento	T (°C)	[E] (m/m)	Razão Molar	Rend. (%)
1	-1 (40)	-1 (1)	-1 (1:1)	39,09
2	1 (60)	-1 (1)	-1 (1:1)	38,49
3	-1 (40)	1 (10)	-1 (1:1)	37,42
4	1 (60)	1 (10)	-1 (1:1)	37,19
5	-1 (40)	-1 (1)	1 (1:5)	53,57
6	1 (60)	-1 (1)	1 (1:5)	68,64
7	-1 (40)	1 (10)	1 (1:5)	70,56
8	1 (60)	1 (10)	1 (1:5)	75,72
9	-1,68 (33)	0 (5,5)	0 (1:3)	66,17
10	1,68 (67)	0 (5,5)	0 (1:3)	66,15
11	0 (50)	-1,68 (0,7)	0 (1:3)	56,23
12	0 (50)	1,68 (13)	0 (1:3)	69,69
13	0 (50)	0 (5,5)	-1,68 (1:0,1)	39,85
14	0 (50)	0 (5,5)	1,68 (1:6,4)	69,57
15*	0 (50)	0 (5,5)	0 (1:3)	58,74
16*	0 (50)	0 (5,5)	0 (1:3)	61,62
17*	0 (50)	0 (5,5)	0 (1:3)	61,58

* = Ponto Central

Ao analisar a Tabela 12, pode-se verificar que o rendimento mais elevado foi obtido no experimento 8 (75,72%), que corresponde à temperatura mais elevada

(60°C), razão molar entre os substratos de 1:5 e 10% (m/m) de enzima. Porém, ao observarmos o experimento 6, observa-se um rendimento de 68,64% com apenas 1% de enzima. Portanto, foi selecionado este ensaio para avaliar posteriormente a cinética da reação, visto que, em termos industriais, a quantidade de enzima usada é bem menor que para o experimento 8, reduzindo os custos de produção.

Este tipo de planejamento permitiu a obtenção de modelos matemáticos com parâmetros lineares e quadráticos (múltipla regressão) das variáveis estudadas. A partir dos resultados obtidos na Tabela 12, foram calculados os efeitos principais e de interação das variáveis, bem como os coeficientes para o modelo matemático, e a análise de variância - ANOVA para determinar a validade do modelo.

A Figura 15 apresenta a estimativa dos efeitos lineares, quadráticos e a interação das variáveis independentes, em um nível de 95% de confiança. À direita da linha vermelha são apresentados os efeitos significativos das variáveis. É possível observar que apenas o efeito linear da razão molar entre o ácido oleico e o solketal (R) foi significativo. Nenhum dos fatores de interação entre as variáveis foram estatisticamente significativos em um nível de confiança de 95%.

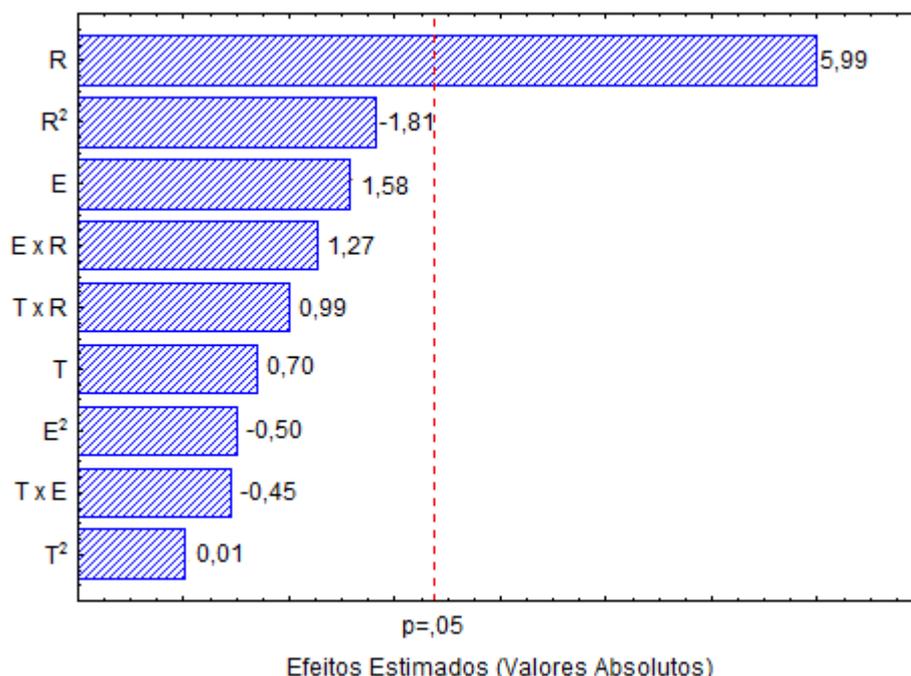


Figura 15. Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos das variáveis.

Os dados experimentais de rendimento foram ajustados pelo modelo de regressão considerando apenas as variáveis que possuem efeito significativo (Razão molar, R). A equação obtida é dada pela Equação 2:

$$y = 61,23 + 12,18 * R \quad \text{Equação 2}$$

O modelo foi ajustado pela análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 13. O valor de F calculado foi de 5,04, valor este superior ao F tabelado (3,68). Desta forma, podemos afirmar que o modelo proposto para o sistema estudo é válido com 95% de confiança. O coeficiente de determinação (R^2) de 0,87 pode explicar 87% das variações dos resultados, e pode ser utilizado para fins preditivos.

Tabela 13. Análise de Variância (ANOVA) referente à produção de mono-oleína.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadro Médio	Fcalc
Regressão	2553,63	9	283,74	5,04
Resíduos	393,96	7	56,28	
Total	2947,59	16		

$F_{\text{tab}}(9; 7; 0,05): 3,68 \quad R^2 = 0,87$

A Figura 16 ilustra as superfícies de resposta do rendimento em mono-oleína em função das variáveis. A inclinação da curva permite a avaliação do efeito da variável sobre o rendimento em produto. Os menores valores na escala correspondem aos menores níveis da variável, enquanto que os valores maiores representam os níveis mais elevados da mesma. Ao analisar as superfícies, percebe-se que os maiores rendimentos são obtidos nas seguintes condições: razão

molar AO:solketal de 1:5, quantidade de catalisador de 10% e 60°C, ou seja, maiores níveis de temperatura e menores níveis de catalisador.

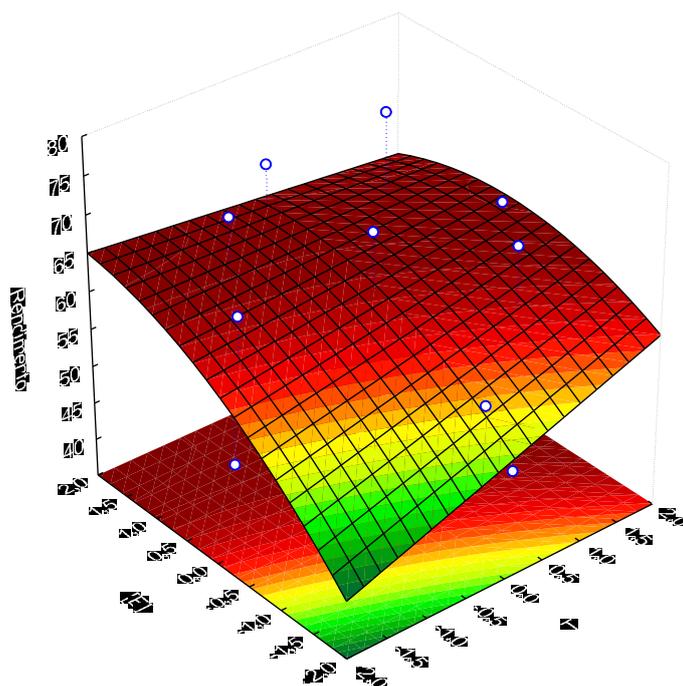
A variável que estatisticamente influenciou na reação foi a razão molar entre os substratos (ácido oleico e solketal). Na tentativa de obter maiores rendimentos em mono-oleína, novos testes foram realizados, conduzindo um aumento na razão molar entre os substratos. As condições estudadas, bem como os resultados obtidos, estão descritos na Tabela 14.

Nestes novos testes (Tabela 14) não foi verificado melhores rendimentos. Portanto, as condições reacionais encontradas como ótima para rendimento em mono-oleína são: temperatura de 60°C, 1% (m/m) de catalisador e razão molar AO:solketal de 1:5 em 3 horas de reação.

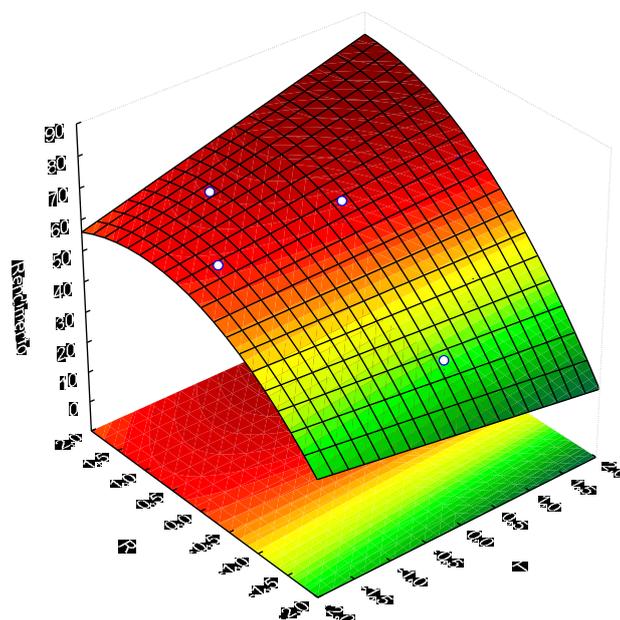
Fixadas estas condições, foi avaliada a cinética da reação. O tempo não foi selecionado como uma variável independente no planejamento porque geralmente apresenta bastante importância e influência no rendimento da reação, podendo mascarar o efeito das demais variáveis. Assim, foram avaliadas as concentrações nos níveis de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Os resultados obtidos experimentalmente podem ser observados na Figura 17.

Tabela 14. Condições avaliadas para otimizar a reação.

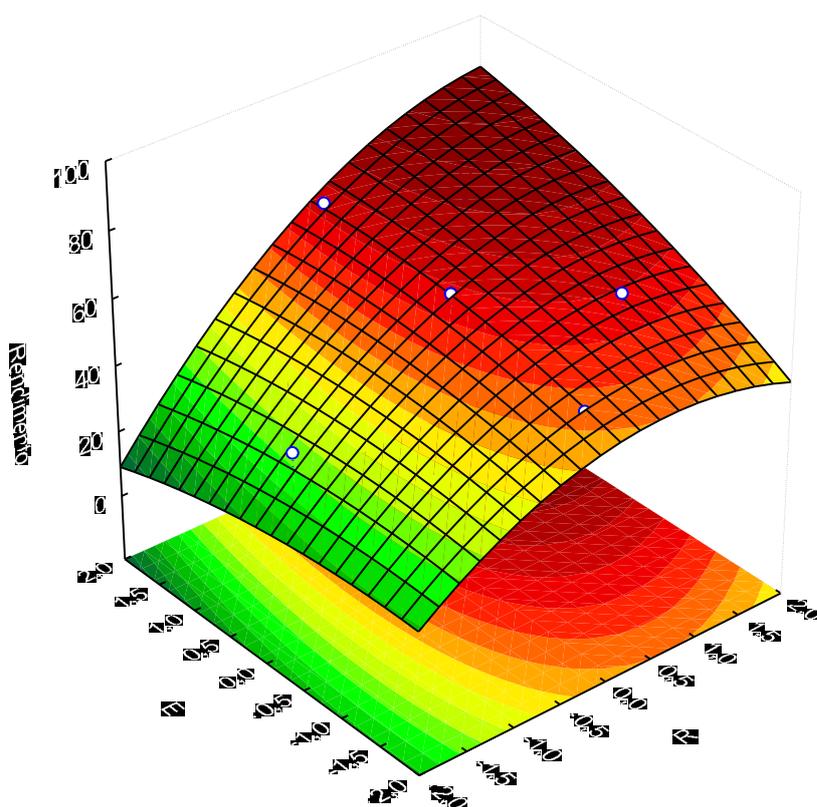
Condição	Rendimento (%)
60°C , 1:10, 10% E	66,40
60°C , 1:10, 1% E	53,85
60°C , 1:15, 10% E	60,11
40°C , 1:15, 10% E	22,87



(a) T x E



(b) R x T



(c) R x E

Figura 16. Superfícies de respostas em função do rendimento em mono-oleína para: (a) Temperatura versus Enzima; (b) Razão AO:solketal versus Temperatura; (c) Razão AO:solketal versus Enzima.

Em concordância com o verificado na literatura, onde os autores obtiveram a melhor condição experimental da reação de produção de monoestearina no tempo de 1,5 horas (ITABAIANA JR, et al., 2012), a cinética da reação foi rápida, e a reação se manteve estável em menos de 1 hora de reação. Portanto, com base nos resultados experimentais obtidos, chegou-se a um máximo no rendimento nas seguintes condições experimentais:

- Razão molar AO:solketal de 1:5;
- Quantidade de catalisador de 1% (m/m);
- Temperatura de reação de 60°C;

- Tempo de reação de 1 hora.

Nestas condições experimentais, obteve-se um teor máximo em ésteres em torno de 70 %.

As condições ótimas da reação encontradas para a reação de esterificação do ácido oleico para produção da monooleína são condizentes com o que pode ser observado na literatura. Por se utilizar um biocatalisador, a lipase, as condições reacionais de tempo e temperatura foram amenas, visto que as enzimas possuem cinética rápida e degradam em temperaturas maiores. Os métodos tradicionais de produção de monooleína utilizam solventes orgânicos. Na reação exposta, o solvente orgânico foi satisfatoriamente substituído por dióxido de carbono em condições supercríticas.

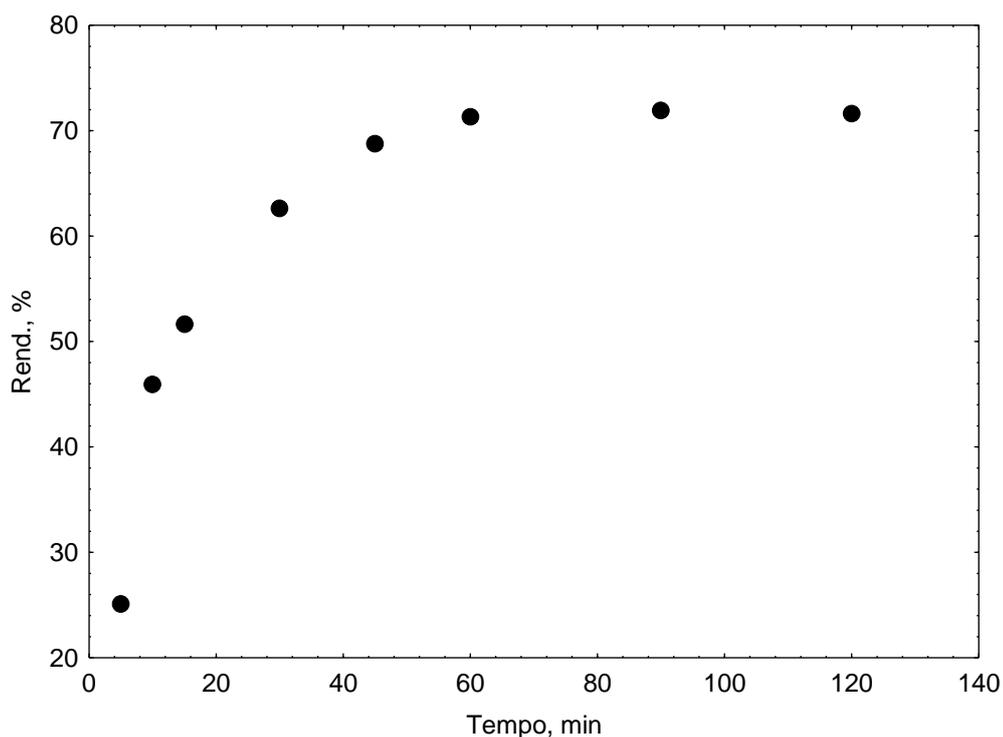


Figura 17. Curva cinética da reação de esterificação do ácido oleico catalisada pela Lipozyme em ScCO₂.

5.1.4 Análise da estrutura dos biocatalisadores em MEV

A Figura 18 apresenta as micrografias obtidas por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) da lipase Lipozyme RM IM não utilizada e utilizada na reação.

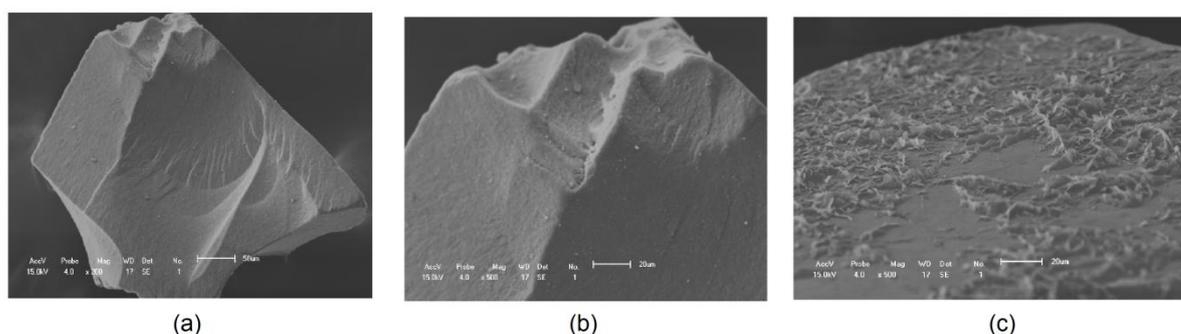


Figura 18. MEV da Lipozyme RM IM. Visão geral da lipase não usada (a), 200x; detalhe da enzima não usada (b), 500x, detalhe da enzima após uso na reação (c), 500x.

Na Figura 18 pode-se observar que, após o uso na reação de esterificação (c), a Lipozyme RM IM sofreu mudanças superficiais. Desta forma, alterações em nível estrutural podem ter ocorrido. No caso do estudo da reuso da enzima, diminuições no rendimento após o primeiro ciclo poderiam ser explicadas por estas micrografias. Batistella et al. (2012) observou, através da MEV, que o sistema reacional utilizado em seu trabalho (solvente e ultrassom) parece atacar o suporte utilizado na imobilização da enzima Novozym 435.

6. REAÇÃO DE EPOXIDAÇÃO

6.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais obtidos para a reação de epoxidação do ácido oleico a baixa pressão, em condições supercríticas e a obtenção dos dados de equilíbrio de fases para o sistema ternário CO₂ + acetato de etila + ácido oleico. A obtenção dos dados a baixa pressão teve a cooperação da National Hellenic Research Fundation, no Instituto de Biologia, Química Medicinal e Biotecnologia, em Atenas, Grécia. No laboratório do Dr. Xenakis foi desenvolvida a técnica de imobilização de enzimas em microemulsões baseadas em organogéis para uso como biocatalisador.

6.1.1 Reação de epoxidação a baixa pressão

Os dados apresentados a seguir envolvem a epoxidação de ácido oleico catalisada por lipase imobilizada em lecitina à base de microemulsão baseada em organogel (MBG). Este tipo de catalisador foi preferido para este estudo ao invés de trabalhar diretamente com micelas reversas. Esta decisão foi com base nas vantagens apresentadas pela catálise heterogênea sobre a homogênea, tal como a reutilização do catalisador e mais fácil isolamento do produto.

Vários solventes foram testados para a epoxidação de ácido oleico, ou seja, tolueno, 1-octanol, 2-octanol, n-hexano e acetato de etila. Observou-se que a reação foi realizada com sucesso em acetato de etila, enquanto que, quando os outros solventes foram utilizados, não ocorreu a formação de produtos ou apenas vestígios de produto. Parece que, de acordo para o mecanismo proposto por Klaas e Warwel (1999), o acetato de etila atua como um co-oxidante, uma vez que pode reagir com H₂O₂ para produzir ácido acético e peróxido e doar o oxigênio para o ácido oléico da ligação dupla, promovendo assim, a reação de epoxidação.

A taxa de adição de H₂O₂ foi testada. Alíquotas de H₂O₂ foram adicionadas em intervalos de tempo definidos e a reação de epoxidação foi seguida por 5 horas. Como pode ser observado na Tabela 15, o melhor rendimento foi observado para o sistema em que a quantidade total de H₂O₂ foi adicionada no início da reação.

Tabela 15. Influência da velocidade de adição de H₂O₂ no rendimento da reação.

Velocidade adição de H ₂ O ₂	10 µL/10 min	10 µL/15 min	t - 0
Rendimento, % ^a	29	25	31

^a Referente a 5 horas de reação.

O fato de que o rendimento da reação é mais elevado para o sistema em que H₂O₂ foi adicionado em única alíquota no início da reação mostra que nenhum efeito tóxico de H₂O₂ na atividade enzimática pode ser observado. Este não é o caso de muitos outros trabalhos onde enzimas imobilizadas comerciais foram utilizadas para a catálise da epoxidação [KUDANGA et al., 2010; GITIN et al., 2006; SKOURIDOU et al., 2003], e a solução de peróxido de hidrogênio foi adicionada gota a gota durante a reação devido ao efeito deletério do H₂O₂ sobre a enzima [YADAV e DEVI, 2001; BJORKLING et al., 1990]. Provavelmente, no presente caso, a enzima é bem protegida pela matriz de imobilização, ou seja, pela lecitina baseada em organogel. O fato de que a enzima é protegida quando imobilizada em MBGs lecitina-HPMC foi provado em um estudo envolvendo diferentes organogéis (usando HPMC ou ágar) com base em microemulsões de lecitina ou AOT [ZOUMPANIOTI et al., 2008].

Dados prévios obtidos pelo grupo foram aplicados para o estudo da reação de epoxidação. O sistema de formação de microemulsões foi estudado por Avramiotis et al. (1998), que obtiveram uma concentração ótima de substratos para formar a microemulsão: 3,5% (m/m) de lecitina dissolvida em iso-octano com 5% (v/v) de 1-propanol. A enzima foi então adicionada neste sistema micelar, que a mantém estável e não afeta sua estrutura. Em seguida, esta microemulsão contendo a enzima foi geleificada em HPMC para facilitar a separação do produto do meio

reacional, bem como facilitar a recuperação da enzima. A geleificação mantém também a enzima estável e não afeta a sua atividade [ZOUMPANIOTI et al., 2010].

Tendo como objetivo verificar a influência das variáveis independentes na reação de epoxidação, utilizou-se um delineamento composto central (DCC). As variáveis estudadas e sua faixa de atuação foram: temperatura (entre 35 e 55°C), quantidade de enzima (de 0,4 a 0,8 mg de E/mL de microemulsão) e concentração do ácido oleico (entre 50 e 100 mM). A faixa de cada variável foi selecionada baseada em trabalhos prévios, que demonstraram que a uma maior concentração de enzima não afeta o rendimento da reação, bem como em temperaturas mais elevadas ocorre a desnaturação da enzima [ZOUMPANIOTI et al., 2010]. A concentração de peróxido de hidrogênio foi mantido fixo em excesso em 1,2 mL. A Tabela 16 apresenta a matriz do planejamento, bem como a conversão do ácido oleico em epóxidos. O tempo de reação foi fixado em 10 horas.

Tabela 16. Valores reais e codificados e resposta do Planejamento.

Experi- Mento	Temperatura (°C)	Qtde de Enzima (mg/mL microemulsão)	Concentração Ácido Oleico (mM)	Rendimento (%)
1	35 (-1)	0,4 (-1)	50 (-1)	46,9
2	55 (+1)	0,4 (-1)	50 (-1)	32,7
3	35 (-1)	0,8 (+1)	50 (-1)	52,6
4	55 (+1)	0,8 (+1)	50 (-1)	34,4
5	35 (-1)	0,4 (-1)	100 (+1)	42,3
6	55 (+1)	0,4 (-1)	100 (+1)	34,7
7	35 (-1)	0,8 (+1)	100 (+1)	53,0
8	55 (+1)	0,8 (+1)	100 (+1)	38,8
9*	45 (0)	0,6 (0)	75 (0)	48,2
10*	45 (0)	0,6 (0)	75 (0)	46,3
11*	45 (0)	0,6 (0)	75 (0)	50,7

* = Ponto Central

O Delineamento Composto Central (DCC) totalizou 11 experimentos incluindo a triplicata no ponto central, os quais foram executados em sequência aleatória. Os primeiros oito ensaios foram usado para determinar o modelo matemático e referem-se a estatística. Os ensaios 9 a 11 representam as triplicatas dos pontos centrais para a obtenção do erro experimental. Pode-se observar que os melhores rendimentos foram obtidos nos experimentos 3 e 7. A partir dos resultados obtidos, foram calculados os efeitos principais e de interação das variáveis, os seus coeficientes para a determinação do modelo matemático, bem como a análise de variância – ANOVA, para determinar a validade do modelo.

Os efeitos estimados e os valores de p são mostrados na Tabela 17. As variáveis com valor de $p < 0,05$ são significativos no processo. A quantidade de enzima e a concentração de ácido oleico apresentam valores de $p > 0,05$, o que significa que eles não afetam significativamente o rendimento da reação. Deve ser observado que a quantidade de enzima utilizada no presente estudo (0,4-0,8 mg de enzima) correspondem a apenas 0,29-0,58% em massa de H_2O_2 e 0,2-0,9% em massa de ácido oleico, o qual é considerado baixo. Consequentemente, o organogel em lecitina contendo a lipase oferece uma vantagem em aplicações industriais, uma vez que é um processo econômico em termos de impacto ambiental e custo do biocatalisador. Mais especificamente, o biocatalisador estudado no presente trabalho apresenta melhores resultados em comparação com a produção de ácido epoxiesteárico catalisado por PSCI Amano lipase. O intervalo de quantidade de enzima por massa de ácido oleico é de 10-20%, o que é 100 vezes mais do que a carga de enzima no presente estudo [CORREA et al., 2012].

Como verificado na Tabela 17, a temperatura teve um efeito negativo (-13,55) dentro da gama escolhida de 35-55°C. Ao escolher a menor T dentro do intervalo estudado, os rendimentos mais elevados são atingidos. Ou seja, quando a temperatura aumenta 35-55°C e as outras duas variáveis (concentração de enzima e de AO) são mantidas constantes, o rendimento cai de 53% para 39% para os valores mais baixos (0,4 mg de enzima, e 50 mM de AO) e de 47% para 33% para os maiores valores (0,8 mg de enzima, 100 mM de AO), indicando, assim, a preferência do sistema a temperaturas mais baixas.

Tabela 17. Efeitos dos parâmetros estimados no DCC 2³ para a epoxidação do ácido oleico catalisado pela CalB imobilizada em HPMC MBGs.

Variáveis	Efeito	p-valor
Principal	43,69	0,0002
Temperatura	-13,55	0,0130
Enzima	5,55	0,0708
Concentração AO	0,55	0,7582
Temperatura x Enzima	-2,65	0,2316
Temperatura x Concentração AO	2,65	0,2316
Enzima x Concentração AO	1,85	0,3576

O Gráfico de Pareto (Figura 19) mostra a estimativa dos efeitos lineares e a interação das variáveis independentes, ao nível de 95% de confiança. À direita da linha tracejada os efeitos das variáveis são significativos. Verifica-se que apenas o efeito linear da temperatura de reação (T) foi significativo. Os demais fatores lineares e de interação entre as variáveis não foram significativos. Tal efeito apresentado pela temperatura foi negativo, portanto, maiores rendimentos serão obtidos nos menores valores desta variável.

Os dados experimentais foram ajustados para o modelo proposto e a adequação foi realizada pela análise de variância e parâmetros de R². O teste estatístico do modelo foi realizado pelo teste de Fischer. A Equação 3 representa o modelo matemático de rendimento de ácido oleico em epóxidos catalisado pela CalB considerando apenas as variáveis que possuem efeito significativo, onde *y* é o rendimento e *T* é a temperatura:

$$y = 43,69 - 6,77 * T$$

Equação 3

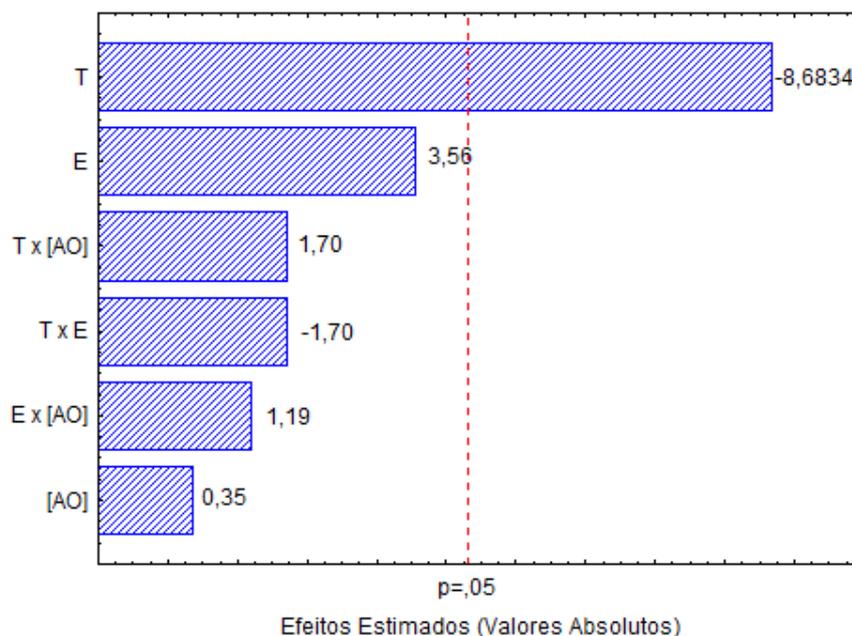


Figura 19. Estimativa dos efeitos lineares e de interação das variáveis.

A Tabela 18 mostra a análise de variância que descreve a validade do modelo de teste F e os resíduos, que demonstram a magnitude do erro experimental. O F calculado (16,59) foi maior que o F tabulado (5,12), mostrando a validade do modelo experimental. O coeficiente de determinação ($R^2 = 0,65$) sugere que a variação da amostra de 65% para a produção de epóxido é atribuída para as variáveis independentes e podem ser explicados com precisão pelo modelo.

Tabela 18. Análise de Variância para validação do modelo matemático (ANOVA).

Fator	SQ	GL	QM	F _{calc}	F _{tab}	p-valor
Regressão	367,20	1	367,20	16,59	5,12	<0,01
Resíduos	199,20	9	22,13			
Falta de Ajuste	189,46	7	-			
Erro	9,74	2	-			
Total	566,41	10	-			

Outro fator explorado para avaliar o rendimento foi a cinética da reação. Para isso, realizaram-se experimentos aumentando o tempo de reação de 10 horas até 72 horas. A temperatura foi fixada em 35°C, quantidade de catalisador em 0,8 mg/mL de microemulsão e concentração de ácido oleico de 50 mM. Os resultados obtidos experimentalmente são apresentados na Figura 20.

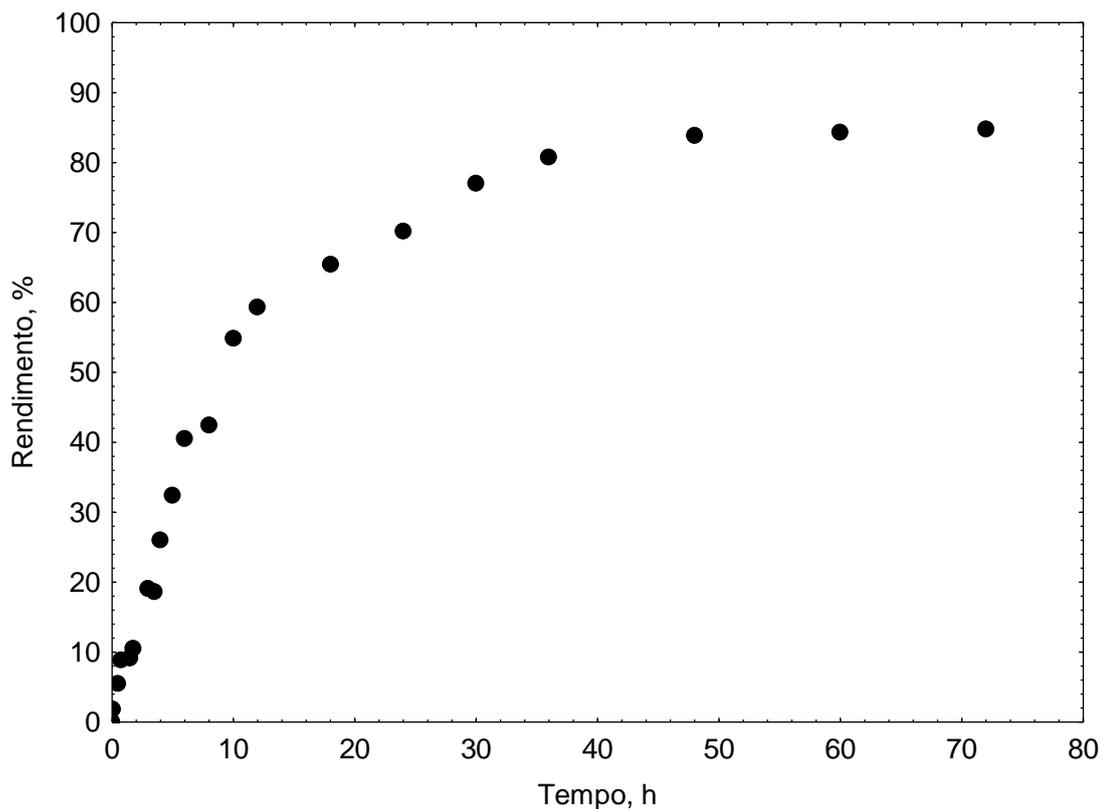


Figura 20. Análise da influência do tempo no rendimento da reação.

Através dos resultados obtidos observa-se que o aumento no tempo, fixando as demais variáveis, resulta em um aumento no rendimento de 53% em 10 horas para 84% em 48 horas.

Portando, com base nos resultados experimentais obtidos, chegou-se a um ótimo no rendimento em epóxido nas seguintes condições experimentais:

- temperatura: 35°C,
- quantidade de enzima: 0,8 mg/mL of microemulsão,

- concentração de ácido oleico: 50 mM
- concentração de H₂O₂: 1,2 mL
- tempo de reação: 48 horas

Nestas condições experimentais, obteve-se um teor máximo em epóxido de aproximadamente 84%.

6.1.1.1 Efeito da temperatura de incubação na velocidade inicial e cálculo da energia de ativação E_a

CaL B imobilizada em MBGs lecitina-HPMC foi utilizada para a epoxidação de ácido oleico com H₂O₂ e o efeito da temperatura sobre a atividade da enzima foi estudado para uma faixa de temperatura entre 18 e 55°C. Foi observado que o aumento da temperatura resulta em um aumento na velocidade da reação de 0,3 para 2,3 mM/min (Figura 21). O fato de que a velocidade da reação depende fortemente da temperatura sugere que a reação é controlada cineticamente. Uma vez que a temperatura ótima para a CaLB é 35°C, o aumento da atividade da lipase com o aumento da temperatura até 55°C pode ser atribuído por uma melhor difusão dos substratos no interior da matriz do catalisador.

Isto está de acordo com as conclusões de estudos prévios [ZOUMPANIOTI et al., 2010], onde o aumento da temperatura de incubação resultou em um aumento importante na velocidade inicial da produção de propil laurato catalisada pela lipase R. miehei imobilizada na mesma MBGs lecitina-HPMC.

Além disso, a energia de activação (E_a) foi determinada usando da equação de Arrhenius:

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

Equação 4

onde k é a velocidade constante da reação, A é o fator pré-exponencial de Arrhenius, R é a constante do gás ($8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta (K).

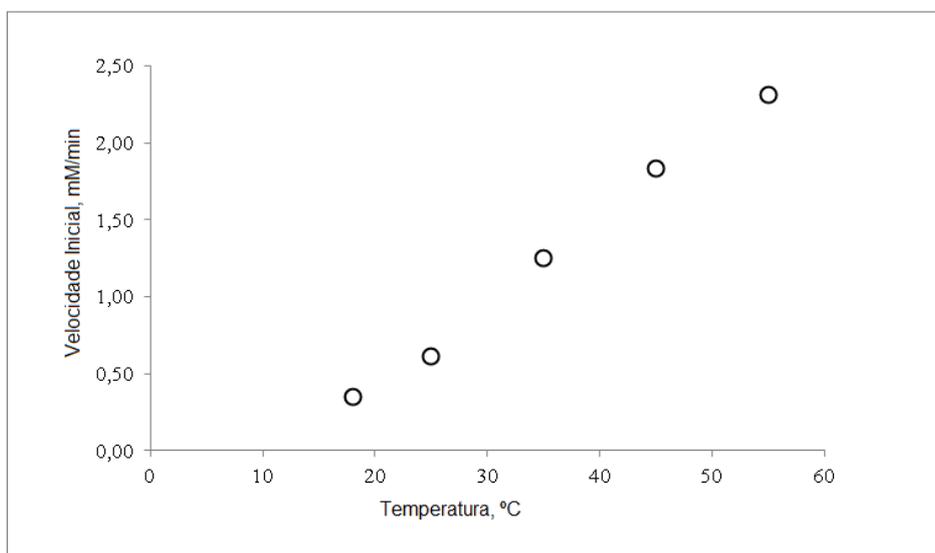


Figura 21. Efeito da temperatura na velocidade inicial da epoxidação do ácido oleico com H_2O_2 catalisado pela lipase *C. antarctica B* imobilizada em organogel HPMC/lecitina.

As enzimas são catalisadores biológicos que reduzem a energia de ativação (E_a) necessária para converter os substratos em produtos. Em soluções aquosas, a E_a é uma característica intrínseca da própria enzima. No entanto, imobilizando a enzima, a difusão pode tornar-se um limitante da velocidade e a reação pode mudar a cinética para difusão controlada resultando numa mudança da E_a aparente medida. Por isso, foi determinada a energia de ativação para a epoxidação. O gráfico de Arrhenius para a síntese do epóxido é mostrada na Figura 22.

A energia de ativação aparente calculada foi de 41 kJ mol^{-1} e pareceu ser semelhante à das energias de ativação calculadas para a síntese do propil laurato catalisada pela lipase *R. miehei* imobilizada em MBGs com HPMC ou ágar [ZOUMPANIOTI et al., 2008] e da mesma ordem de grandeza das energias calculadas por Hedström et al. (2001) para a CaL imobilizada em organogéis. Esta é

considerada uma energia baixa que permite o uso do biocatalisador para a realização da epoxidação quimioenzimática.

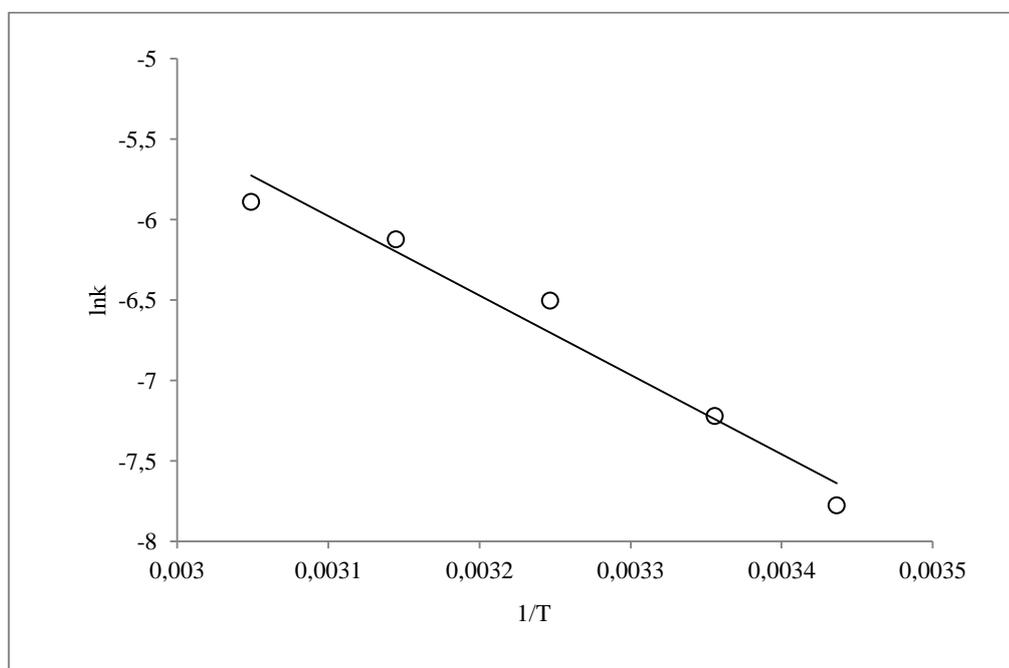


Figura 22. Arrhenius plot para a reação de epoxidação catalisada pela lipase CalB imobilizada microemulsões de lecitina com HPMC em organogel. A energia de ativação aparente calculada é de 41 kJ mol⁻¹.

6.1.1.2 Reuso da enzima

Para observar o efeito da capacidade que o biocatalisador possui em manter a sua atividade, a reação de epoxidação do ácido oleico foi testada 7 vezes consecutivas. Como pode ser observado na Figura 23, a atividade da lipase após 4 utilizações é bem conservada. O rendimento é reduzido após 4 corridas em apenas em torno de 10%. No entanto, após a corrida 5 e 6, o rendimento reduziu cerca de 40% e no sétimo ciclo, o rendimento da reação foi de 25%.

Deve destacar que, após a primeira utilização, uma hiperatividade da enzima pode ser observada. Este comportamento também foi observado para a mesma

lipase imobilizada em organogéis com HPMC utilizadas para a síntese do laurato de propila [ZOUMPANIOTI et al., 2006], mas não foi observado para lipase *R. miehei* imobilizada em organogéis com HPMC e utilizadas para a mesma reação de esterificação [DELIMITSOU et al., 2002]. Tal comportamento pode ser atribuído a interações da CaLB com a matriz de imobilização dos MBG que podem afetar a estabilidade estrutural da lipase, um fenômeno que não ocorre no caso da lipase *R. miehei*.

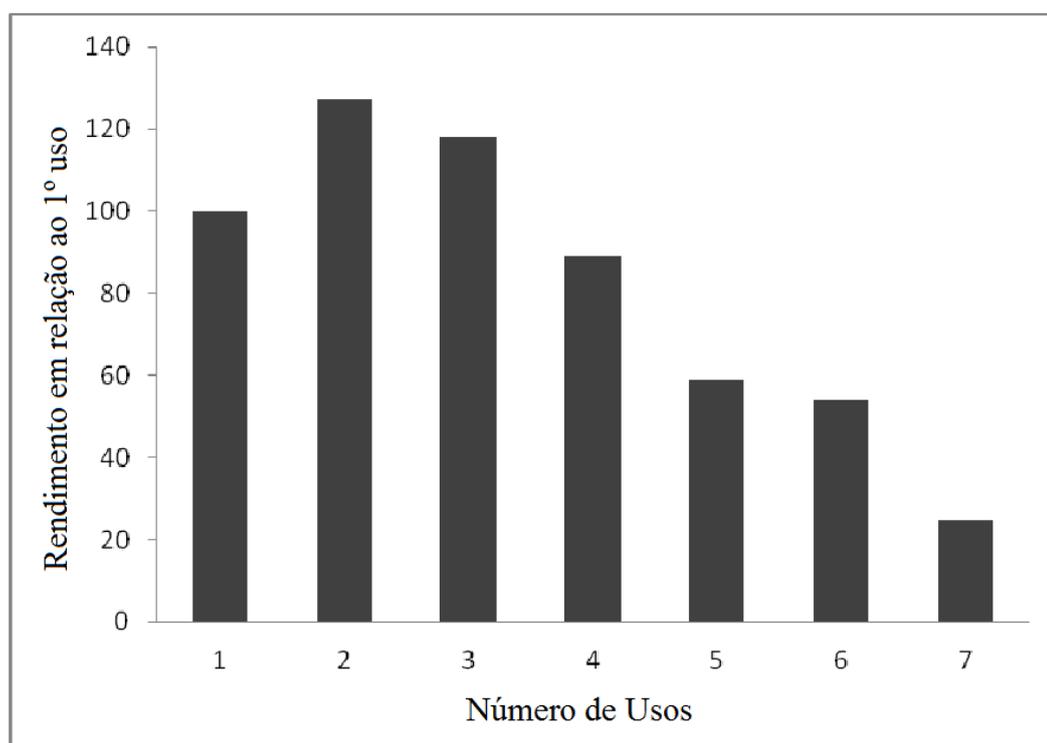


Figura 23. Resultado do reuso da lipase CaLB imobilizada em organogéis na epoxidação do ácido oleico.

6.1.2 Reação de epoxidação em condições supercríticas

A seguir são apresentados os dados de transição de fase para o sistema ternário CO₂ + acetato de etila + ácido oleico e os resultados da reação de epoxidação utilizando MBGs em sistemas pressurizados.

6.1.2.1 Dados de Equilíbrio de fases

Da mesma maneira que foi aplicado na produção da mono-oleína, para obter-se o epóxido do ácido oleico em condições supercríticas é essencial o conhecimento do comportamento do sistema a ser empregado. Assim, foi medido o comportamento de fases da mistura ternária entre o CO₂, o acetato de etila e o ácido oleico.

Seguindo o procedimento experimental descrito no Capítulo 4, foram obtidos dados experimentais de equilíbrio de fases para o seguinte sistema ternário: CO₂ + acetato de etila + ácido oleico a 35°C, 45°C, 55°C e 65°C, nas frações molares de ácido oleico:acetato de etila de 1:3, 1:9 e 1:200 (Tabela 19). Esta última fração é bastante elevada e, para fins industriais, pouco praticáveis, já que ocorre a formação de uma pequena quantidade de epóxido para um excesso muito grande de solvente. Esta fração foi estudada, pois foi a utilizada para conduzir as reações em baixa pressão. Os dados experimentais são apresentados em termos de fração molar de CO₂ (x_1), fração molar de acetato de etila (x_2), pressão de transição de fase (P) e o desvio padrão das replicatas $u(p)$.

Na fração molar de 1:3 {CO₂(1) + (0,75 acetato de etila(2) + 0,25 ácido oleico(3))} foram verificadas transições de fases líquido-vapor (ELV) do tipo ponto de bolha (PB) e, em frações de CO₂ acima de 0,9 ocorreu a formação tipo ponto de orvalho (PO).

Na fração molar de 1:9 {CO₂(1) + (0,90 acetato de etila(2) + 0,10 ácido oleico(3))} foram verificadas transições de fases líquido-vapor (ELV) do tipo PB para todas as frações.

Na fração molar de 1:200 {CO₂(1) + (0,995 acetato de etila(2) + 0,005 ácido oleico(3))} foram verificadas transições de fases líquido-vapor (ELV) do tipo PB e, em frações de CO₂ acima de 0,85 ocorreu a formação tipo PO.

Tabela 19. Dados de equilíbrio de fase para o sistema ternário.

x_1	x_2	p/MPa	$u(p)/\text{MPa}$	Tipo ^b	x_1	x_2	p/MPa	$u(p)/\text{MPa}$	Tipo ^b
Fração molar AO:acetato etila de 1:3									
$T = 35\text{ K}$					$T = 45^\circ\text{C}$				
0,50	0,37	3,44	0,02	ELV (PB)	0,50	0,37	3,24	0,01	VLE (PB)
0,60	0,30	4,00	0,03	ELV (PB)	0,60	0,30	4,06	0,01	VLE (PB)
0,70	0,22	5,06	0,03	ELV (PB)	0,70	0,22	4,98	0,02	VLE (PB)
0,80	0,15	5,20	0,02	ELV (PB)	0,80	0,15	6,24	0,03	VLE (PB)
0,90	0,075	12,62	0,01	ELV (PO)	0,90	0,075	13,55	0,02	VLE (PO)
0,95	0,038	13,16	0,01	ELV (PO)	0,95	0,038	15,50	0,01	VLE (PO)
$T = 55^\circ\text{C}$					$T = 65^\circ\text{C}$				
0,50	0,37	3,81	0,03	ELV (PB)	0,50	0,37	4,50	0,02	ELV (PB)
0,60	0,30	5,09	0,03	ELV (PB)	0,60	0,30	5,85	0,03	ELV (PB)
0,70	0,22	6,17	0,02	ELV (PB)	0,70	0,22	7,45	0,02	ELV (PB)
0,80	0,15	7,49	0,01	ELV (PB)	0,80	0,15	9,34	0,01	ELV (PB)
0,90	0,075	15,25	0,02	ELV (PO)	0,90	0,075	16,92	0,01	ELV (PO)
0,95	0,038	17,88	0,02	ELV (PO)	0,95	0,038	19,76	0,02	ELV (PO)
Fração molar AO:acetato etila de 1:9									
$T = 35^\circ\text{C}$					$T = 45^\circ\text{C}$				
0,50	0,45	3,34	0,01	ELV (PB)	0,50	0,45	4,02	0,02	ELV (PB)
0,60	0,36	4,45	0,03	ELV (PB)	0,60	0,36	4,52	0,03	ELV (PB)
0,70	0,27	4,62	0,01	ELV (PB)	0,70	0,27	5,59	0,02	ELV (PB)
0,80	0,18	5,55	0,03	ELV (PB)	0,80	0,18	6,81	0,01	ELV (PB)
0,85	0,13	6,14	0,01	ELV (PB)	0,85	0,13	7,27	0,01	ELV (PB)
0,90	0,090	6,48	0,02	ELV (PB)	0,90	0,090	8,83	0,02	ELV (PB)
0,95	0,045	13,37	0,01	ELV (PB)	0,95	0,045	15,66	0,03	ELV (PB)

Continuação da Tabela 19

$T = 55^{\circ}\text{C}$					$T = 65^{\circ}\text{C}$				
0,50	0,45	4,25	0,03	ELV (PB)	0,50	0,45	4,93	0,01	ELV (PB)
0,60	0,36	5,31	0,03	ELV (PB)	0,60	0,36	6,28	0,04	ELV (PB)
0,70	0,27	6,58	0,01	ELV (PB)	0,70	0,27	7,62	0,03	ELV (PB)
0,80	0,18	7,87	0,02	ELV (PB)	0,80	0,18	9,19	0,02	ELV (PB)
0,85	0,13	8,61	0,01	ELV (PB)	0,85	0,13	10,14	0,01	ELV (PO)
0,90	0,090	11,33	0,01	ELV (PO)	0,90	0,090	13,75	0,01	ELV (PO)
0,95	0,045	18,28	0,01	ELV (PO)	0,95	0,045	21,35	0,01	ELV (PO)

Fração molar AO:acetato etila de 1:200

$T = 35^{\circ}\text{C}$					$T = 45^{\circ}\text{C}$				
0,50	0,49	3,45	0,02	ELV (PB)	0,50	0,49	3,81	0,01	ELV (PB)
0,60	0,40	4,03	0,03	ELV (PB)	0,60	0,40	4,87	0,03	ELV (PB)
0,70	0,30	4,70	0,01	ELV (PB)	0,70	0,30	5,59	0,02	ELV (PB)
0,80	0,20	5,88	0,02	ELV (PB)	0,80	0,20	6,58	0,02	ELV (PB)
0,85	0,15	5,83	0,01	ELV (PO)	0,85	0,15	7,01	0,01	ELV (PO)
0,90	0,1	6,56	0,01	ELV (PO)	0,90	0,1	7,62	0,01	ELV (PO)
0,95	0,05	7,00	0,01	ELV (PO)	0,95	0,05	8,20	0,02	ELV (PO)
$T = 55^{\circ}\text{C}$					$T = 65^{\circ}\text{C}$				
0,50	0,49	4,43	0,01	ELV (PB)	0,50	0,49	4,96	0,01	ELV (PB)
0,60	0,40	5,34	0,01	ELV (PB)	0,60	0,40	6,12	0,02	ELV (PB)
0,70	0,30	6,47	0,01	ELV (PB)	0,70	0,30	7,41	0,01	ELV (PB)
0,80	0,20	7,53	0,02	ELV (PB)	0,80	0,20	8,67	0,02	ELV (PB)
0,85	0,15	8,13	0,01	ELV (PO)	0,85	0,15	9,42	0,02	ELV (PO)
0,90	0,1	9,03	0,03	ELV (PO)	0,90	0,1	10,15	0,01	ELV (PO)
0,95	0,05	9,47	0,01	ELV (PO)	0,95	0,05	10,68	0,01	ELV (PO)

Os dados experimentais são apresentados em termos de fração molar de CO_2 (x_1), fração molar de acetato de etila (x_2), pressão de transição de fase (P) e o desvio padrão das replicatas $u(p)$.

Nas Figuras 24 e 25 são apresentados os resultados experimentais obtidos para o sistema estudado. Nas duas projeções se observa que, ao aumentar a fração de CO₂, ocorre um aumento na pressão da transição de fase. Em frações altas de CO₂ (acima de 0,9) se observa um grande aumento nas pressões de transição de fase. Para cada uma das isotermas representadas, a região acima da curva dos pontos experimentais representa uma região com uma única fase. Abaixo da curva coexistem uma fase líquida e outra vapor. O sistema estudado, nas duas frações molares de acetato de etila e ácido oleico apresentam boa solubilidade em CO₂ em pressões relativamente baixas.

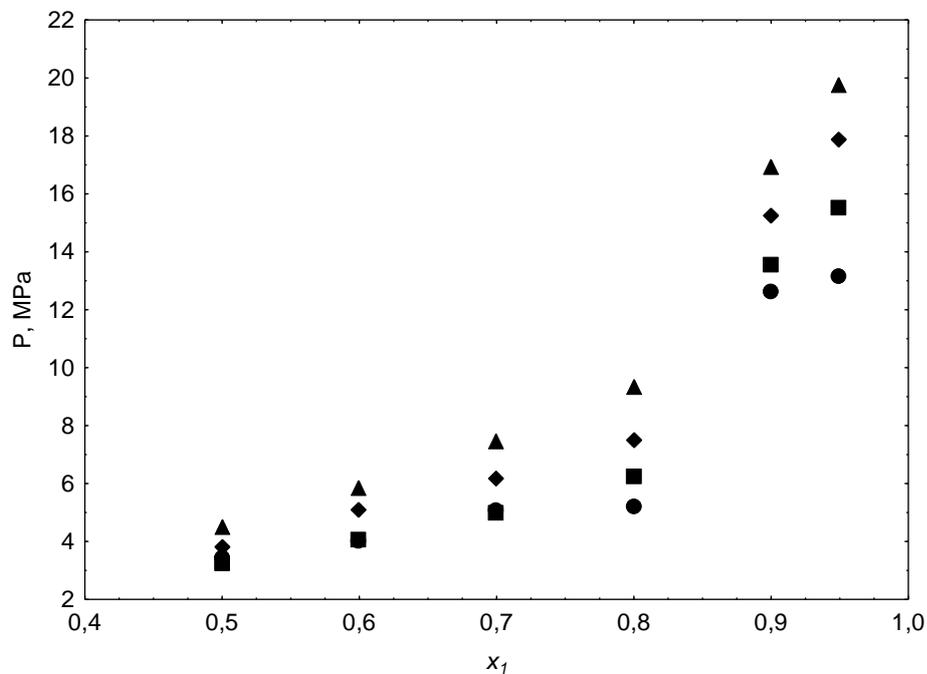


Figura 24. Diagrama pressão-composição do sistema {CO₂(1) + (0,75 acetato de etila(2) + 0,25 ácido oleico(3)) a T = 35°C (●); 45°C (■); 55°C (◆); 65°C (▲).

A Figura 26 compara os resultados experimentais de ELV do sistema ternário obtido neste trabalho {CO₂(1) + (0,995 acetato de etila(2) + 0,005 ácido oleico(3)) com dados reportados na literatura de um sistema binário {CO₂(1) + acetato de etila(2)} (SIMA et al., 2012). Como no sistema ternário a quantidade de ácido oleico é muito pequena, tal sistema se comporta como binário (CO₂ + acetato

de etila), ou seja, pequenas concentrações de ácido oleico tem pouco efeito sobre as transições de fase.

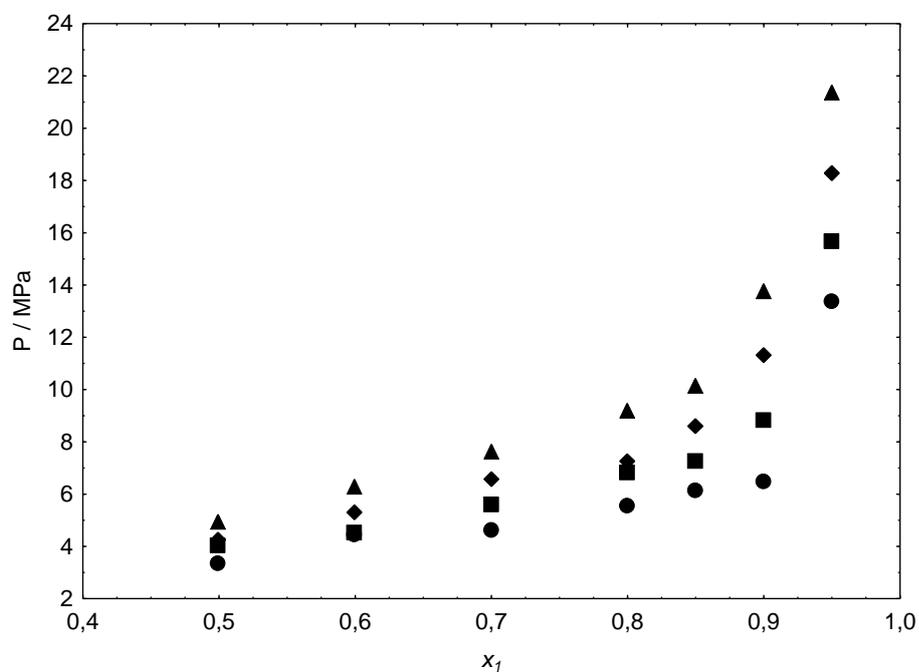


Figura 25. Diagrama pressão-composição do sistema {CO₂(1) + (0,90 acetato de etila(2) + 0,10 ácido oleico(3)) a T = 35°C (●); 45°C (■); 55°C (◆); 65°C (▲).

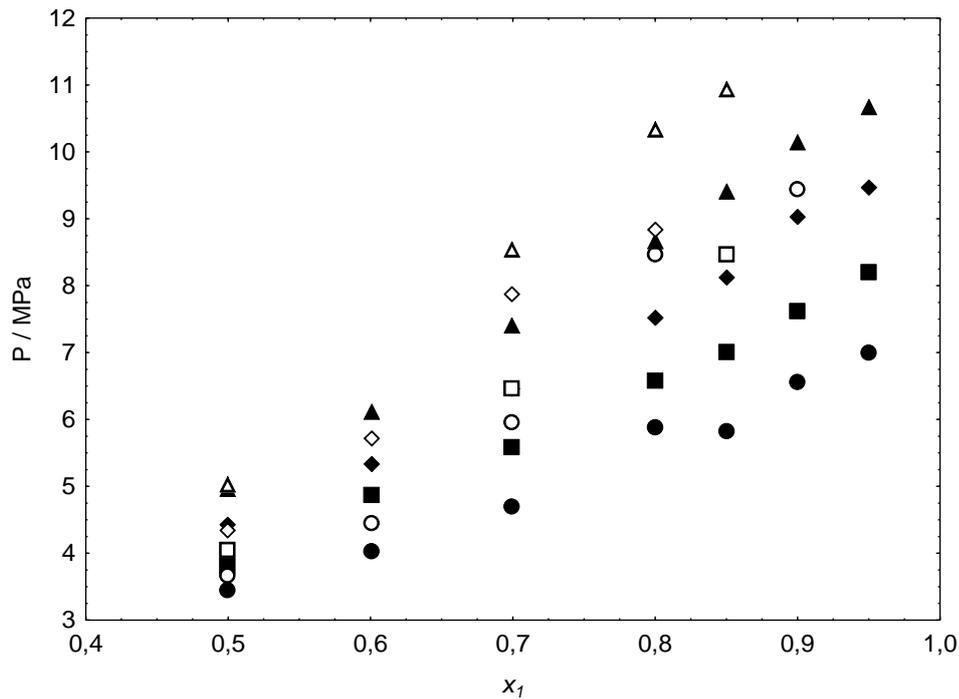


Figura 26. Diagrama pressão-composição: comparação com dados da literatura. Este trabalho, sistema ternário {CO₂(1) + (0,995 acetato de etila(2) + 0,005 ácido oleico(3))}: ●, 35°C; ■, 45°C; ◆, 55°C; ▲, 65°C. SIMA et al. (2012), sistema binário (CO₂(1) + acetato de etila(2)): ○, 50°C; □, 60°C; ◇, 70°C; △, 80°C.

6.1.2.2 Planejamento experimental

Após a análise das transições de fase e a boa solubilidade verificada entre os substratos da reação em scCO₂, foi realizada a reação de epoxidação do ácido oleico em condições supercríticas catalisado pela CalB imobilizada em microemulsões baseado em organogéis HPMC. Para isso, realizou-se um planejamento experimental com as seguintes variáveis independentes: temperatura, concentração de enzima, concentração de H₂O₂ e concentração de ácido oleico. A Tabela 20 apresenta a matriz do planejamento, bem como a conversão do ácido oleico em epóxidos. O tempo de reação foi fixado em 3 horas e a pressão em 100 bar.

Os níveis selecionados no planejamento foram baseados nos dados obtidos experimentalmente pela reação de epoxidação a baixa pressão. Foram realizados testes preliminares para delimitar a quantidade de catalisador, sendo que a faixa selecionada foi de 0,8 a 2,2 mg de E/mL de microemulsão.

O Delineamento Composto Central totalizou 11 experimentos incluindo a triplicata no ponto central, os quais foram executados em sequência aleatória.

Tabela 20. Valores reais e codificados e resposta do Planejamento.

Exp.	T(°C)	(E)(m/m)	(H ₂ O ₂) μL	(AO)μL	Média Rend. (%)
1	1 (35)	-1 (0,8)	1 (200)	1 (100)	12,37
2	1 (55)	-1 (0,8)	1 (200)	1 (900)	8,15
3	-1 (35)	1 (2,2)	1 (200)	1 (900)	7,78
4	1 (55)	1 (2,2)	1 (200)	-1 (100)	9,40
5	-1 (35)	-1 (0,8)	1 (1000)	1 (900)	6,90
6	1 (55)	-1 (0,8)	1 (1000)	-1 (100)	8,34
7	-1 (35)	1 (2,2)	1 (1000)	-1 (100)	8,31
8	1 (55)	1 (2,2)	1 (1000)	1 (900)	6,60
9*	0 (45)	0 (1,5)	0 (600)	0 (500)	6,28
10*	0 (45)	0 (1,5)	0 (600)	0 (500)	6,37
11*	0 (45)	0 (1,5)	0 (600)	0 (500)	6,40

* = Ponto Central

Ao observar a Tabela 20 verifica-se que o melhor rendimento obtido foi no experimento 1, que corresponde aos menores níveis de todas as variáveis. O rendimento obtido não foi satisfatório, se comparado à produção do mesmo produto nas mesmas condições reacionais a baixa pressão (dados apresentados no item anterior – item 6.1.1).

Na tentativa de aumentar o rendimento da reação novos testes foram realizados e outros níveis das variáveis foram avaliados. A concentração de H₂O₂ foi

diminuída e o tempo reacional foi estudado em até 10 horas de reação. Nenhum dos testes obteve respostas positivas.

Outros testes foram realizados a fim de verificar o motivo pelo qual o rendimento da reação foi baixo. Estes testes e as variáveis avaliadas estão apresentados na Tabela 21. Todos os componentes da reação foram removidos separadamente para avaliar o comportamento do sistema. Estes resultados indicam que a enzima sofre uma desativação neste sistema. Como a solubilidade do CO₂ em água é limitada, a enzima pode estar exposta ao meio reacional que faz com que perca a sua atividade. Neste sistema, a quantidade de água presente é relativamente grande. O doador de oxigênio utilizado na reação, o H₂O₂, possui bastante água em sua composição. Além disso, no preparo do gel é utilizado 1 mL de água, conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos.

Tabela 21. Testes para avaliar o rendimento da reação de epoxidação em scCO₂.

Substratos removidos	Rendimentos obtidos
Enzima	Negativo
Enzima e gel	Negativo
Microemulsão	Negativo
Peróxido	Negativo
Peróxido e gel	Negativo
Peróxido e microemulsão	Negativo
Aumento da pressão	Negativo
Solvente alternative: propano	Negativo

Na tentativa de aumentar a afinidade entre os substratos da reação e o solvente, foi substituído o scCO₂ por propano supercrítico. O propano, em condições supercríticas, apresenta boa solubilidade em água. Porém, foi verificado visualmente que a estrutura do gel foi comprometida neste sistema, desagregando pequenas partículas do gel, visíveis a olho nu.

Ao comparar a técnica de formação de epóxidos com MBGs a baixa pressão, fica evidente que o uso de scCO₂ não produziu resultados satisfatórios.

7. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

7.1 CONCLUSÕES

Reação de esterificação do ácido oleico para produção enzimática de mono-oleato de glicerila em scCO₂:

Dados de equilíbrio de transição de fases para os sistemas {CO₂(1) + solketal(2)} e {CO₂(1) + solketal(2) + ácido oleico(3)} nas temperaturas 35-65°C foram obtidos neste trabalho. O ácido oleico e solketal apresentam excelente solubilidade em CO₂, fator que favorece a reação de formação de monoacilgliceróis a partir do ácido oleico. Os dados experimentais relatados são importantes informações para o desenvolvimento de processos de esterificação sob condições supercríticas, incluindo a síntese de mono-oleína por esterificação com solketal.

No planejamento proposto, o rendimento máximo (70% em mono-oleína) foi encontrado na condição de 60°C, razão molar 1:5 (ácido oleico/solketal), 1% de enzima (p/p em relação à massa de substratos), e com um tempo de 1 hora de reação a pressões próximas a 20MPa. Apenas a razão molar apresentou efeito significativo positivo.

A produção de monoestearato de glicerila em condições supercríticas com a enzima Lipozyme RM IM como biocatalisador foi otimizada. A técnica utilizada é promissora, principalmente nos dias atuais, em que a preocupação com o meio ambiente tem se intensificado.

Reação de epoxidação do ácido oleico para produção enzimática do ácido epoxioleico a baixas e altas pressões:

As medidas de transição de fases para o sistema {CO₂(1) + acetato de etila(2) + ácido oleico(3)} nas temperaturas de 35-65°C foram apresentadas neste trabalho. Os substratos da reação, o acetato de etila e o ácido oleico, apresentaram boa solubilidade em CO₂. Este fator favorece a reação de formação de epóxidos a partir do ácido oleico.

O planejamento experimental proposto para otimizar a reação de epoxidação a baixa pressão entre o ácido oleico, acetato de etila e peróxido de hidrogênio como doador de oxigênio foi eficiente e suficiente para atingir 84% em epóxidos. Este rendimento foi atingido a 35°C, 0,8 mg de enzima *Candida antarctica B* / mL de microemulsão, concentração de ácido oleico de 50 mM, 150 rpm e 48 horas de reação.

A técnica utilizada de microemulsões baseadas em organogéis é interessante e foi eficiente na reação empregada. Os MBGs mantêm a atividade da enzima, protegendo sua estrutura e facilitam a purificação e separação do produto da reação em condições reacionais brandas.

As melhorias apresentadas pelo uso de MBGs em comparação com outros sistemas de microemulsões A/O não geleificadas são importantes economicamente, tornando estas microemulsões baseadas em organogéis um catalisador eficaz aplicado em diversas reações de síntese.

Em contrapartida, a técnica de MBGs em dióxido de carbono supercrítico para conduzir a reação de epoxidação do ácido oleico não apresentou resultados satisfatórios. Pode-se explicar tal comportamento devido à baixa solubilidade que o dióxido de carbono em água. E neste sistema, a quantidade de água é bastante elevada, pois está presente no oxidante da reação, o peróxido de hidrogênio, e também na formação do gel. Esta baixa solubilidade pode ter afetado a estrutura do gel, desprotegendo a enzima e a desativando.

A técnica de MBGs em scCO₂ não foi eficiente para este tipo de reação, mas tem um futuro promissor em outras reações de síntese, e deve ser investigada mais profundamente.

7.2 SUGESTÕES

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineadas:

- Avaliação de outras lipases para a síntese dos compostos químicos em questão, incluindo enzimas não comerciais.

- Estudar a produção de monoacilgliceróis em $scCO_2$ a partir de óleos vegetais.
- Utilização de reatores de fluxo contínuo para produção de monoacilgliceróis em $scCO_2$.
- Aprofundar o estudo de reutilização das enzimas.
- Estudar a produção de epóxidos utilizando MBG a partir de óleos vegetais.
- Estudar a produção de epóxidos utilizando MBG a partir do ácido linoleico (testes preliminares obtiveram 33% em epóxidos em 3 horas de reação a $35^\circ C$, quantidade de enzima de 0,8 mg/mL de microemulsão, concentração de ácido linoleico de 50 mM, 1,2mL de H_2O_2).
- Estudar a técnica de MBGs em diferentes reações de síntese conduzidas em condições supercríticas.
- Modelagem cinética dos dados experimentais obtidos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DARMAKI, N.; LUA, T.; AL-DURI, B.; HARRIS, J. B.; FAVRE, T. L. F.; BHAGGAN, K.; SANTOS, R. C. D. Solubility measurements and analysis of binary, ternary and quaternary systems of palm olein, squalene and oleic acid in supercritical carbon dioxide. *Separation and Purification Technology*, v. 83, p. 189-195, 2011.
- AL-ZUHAIR, S.; DOWAIDAR, A.; KAMAL, H. Dynamic Modeling of Biodiesel Production from Simulated Waste Cooking Oil Using Immobilized Lipase. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, p. 256-262, 2009.
- ARAÚJO, O. A. S.; NDIAYE, P. M.; RAMOS, L. P.; CORAZZA, M. L. Phase behavior measurement for the system CO₂ + glycerol + ethanol at high Pressures. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 62, p. 41-46, 2012.
- AVRAMIOTIS, S.; PAPADIMITRIOU, V.; CAZIANIS, C. T.; XENAKIS, A. EPR studies of proteolytic enzymes in microemulsions *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 144, p. 295-304, 1998.
- AVRAMIOTIS, S.; STAMATIS, H.; KOLISIS, F. N.; LIANOS, P.; XENAKIS, A. Structural Studies of Lecithin- and AOT-Based Water-in-Oil Microemulsions, in the Presence of Lipase. *Langmuir*, v. 12, p. 6320-6325, 1996.
- AWADALLAK, J. A.; VOLL, F.; RIBAS, M. C.; DA SILVA, C.; CARDOZO FILHO, L.; DA SILVA, E. A. Enzymatic catalyzed palm oil hydrolysis under ultrasound irradiation: Diacylglycerol synthesis. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 20, p. 1002-1007, 2013.
- BABICZ, I. A.; LEITE, S. G. F.; DE SOUZA, R. O. M. A.; ANTUNES, O. A. C. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 17, p. 4-6, 2010.

- BATISTELLA, L.; USTRA, M. K.; RICHETTI, A.; PERGHER S. B. C.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J. V. ; LERIN, L.; DE OLIVEIRA, D. Assessment of two immobilized lipases activity and stability to low temperatures in organic solvents under ultrasound-assisted irradiation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 35, p. 351-358, 2012.
- BJORKLING, F.; GODTFREDSSEN, S. E.; KIRK, O. Lipase-Mediated Formation Of Peroxycarboxylic Acids Used In Catalytic Epoxidation Of Alkenes. *Journal Of The Chemical Society-Chemical Communications*, p. 1301-1303, 1990.
- BLATTNER, C.; ZOUMPANIOTI, M.; KRONER, J.; SCHMEER, G.; XENAKIS, A.; KUNZ, W. Biocatalysis using lipase encapsulated in microemulsion-based organogels in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 36, p. 182-193, 2006.
- BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio and Stereoselective Biotransformations*. Weinheim: Wiley-VCH. p. 164-167, 1999.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial. Volume 1. Fundamentos. 1ª Edição*. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo, SP, Brasil, 2001.
- BOYLE, E.; GERMAN, J. B. Monoglycerides in membrane systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 36, p. 785-805, 1996.
- BUISSON, P.; HERNANDEZ, C.; PIERRE, M.; PIERRE, A. C. Encapsulation of lipases in aerogel. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 285, p. 295-302, 2001.
- CARKSON, J. S.; WALKER, A. J.; WOOD, M. A. Continuous Reactor Technology for Ketal Formation: an improved synthesis of Solketal, *Organic Process Research & Development*, v. 5, p. 630–635, 2001.

- CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D. A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T. & SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, v. 26(1), p. 75-80, 2003.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27(1), p. 146-156, 2004.
- CENI, G.; DA SILVA, P. C.; LERINA, L.; CHARIN, R. M.; OLIVEIRA, J. V.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; OESTREICHER, E. G.; DE OLIVEIRA, D. Enzyme-catalyzed production of 1-glycerol benzoate in compressed n-butane. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p. 513-519, 2010.
- CHEN, C. W.; YEH, C-W. Kinetic model for enzymatic hydrolysis in reverse micelles. *Biotechnology Letters*, v. 20(1), p. 49–52, 1998.
- CHEONG, L-Z.; TAN, C-P.; LONG, K.; YUSOFF, M. S. A.; ARIFIN, N.; LO, S-K.; LAI, O-M. Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalyzed partial hydrolysis: Optimization using response surface methodology. *Food Chemistry*, v. 105, p. 1614-1622, 2007.
- CONSTANTINO, L.; GANI, R. New Group Contribution Method for Estimating Properties of Pure Compounds. *AIChE J.*, v. 40, p. 1697–1710, 1994.
- CORREA, F. A.; SUTILI, F. K.; MIRANDA, L. S. M.; LEITE, S. G. F.; SOUZA, R. O. M. A.; LEAL, I. C. R. Epoxidation of oleic acid catalysed by PSCL-Amano lipase optimized by experimental design. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 81, p. 7-11, 2012.
- CÔTÉ, A.; SHARECK, F. Cloning, Purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Enzyme and Microbial Technology*, v.42, p. 381-388, 2008.

- CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1441, p. 205-214, 1999.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, p. 623-630, 2004.
- DANDEVATE, V.; JINJALA, J.; KEHARIA, H.; MADAMWAR, D. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 3374-3381, 2009.
- DELIMITSOU, C.; ZOUMPANIOTI, M.; XENAKIS, A.; STAMATIS, H. Activity and stability studies of *Mucor miehei* lipase immobilized in novel microemulsion-based organogels. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 20, p. 319-327, 2002.
- DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, S.; ROUSSOS, J.; CORDOVA, A.; ABOUSALHAM.; CARRIÈRE, F.; BARATTI, J. Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 1042-1050, 2006.
- DIPPR Project 801: Evaluated Process Design Data; Design Institute for Physical Property Data, BYU-DIPPR, Thermophysical Properties Laboratory: Provo, UT, 2003.
- DINDA, S.; GOUD, V. V.; PATWARDHAN, A. V.; PRADHAN, N. C. Selective epoxidation of natural triglycerides using acidic ion exchange resin as catalyst. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, v. 6, p. 870-878, 2011.
- EHRHARDT, M. R.; FLYNN, P. F.; WAND, A. J. Preparation of encapsulated proteins dissolved in low viscosity fluids. *Journal of Biomolecular NMR*, v. 14, p. 75-78, 1999.

- ESPINOSA, S. N.. Procesamiento Supercrítico de Productos Naturales Modelado, Análisis y Optimización. Tese de Doutorado em Engenharia Química apresentada a Universidad Nacional Del Sur, 2001.
- ESPOSITO, E.; RAVANI, L.; MARIANI, P.; CONTADO, C.; DRECHSLER, M.; PUGLIA, C.; CORTES, R. Curcumin containing monoolein aqueous dispersions: A preformulative study. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, p. 4923-4934, 2013.
- FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 4ª edição. Berlin: Springer, 2000.
- FERNANDEZ-RONCO, M. P.; CISMONDI, M.; GRACIA, I.; DE LUCAS, A.; RODRÍGUEZ, J. F. High-pressure phase equilibria of binary and ternary mixtures of carbon dioxide, triglycerides and free fatty acids: Measurement and modeling with the GC-EOS. *Fluid Phase Equilibria*, v. 295, p. 1-8, 2010.
- FERREIRA, P.; FONSECA, I. M.; RAMOS, A. M.; VITAL, J.; CASTANHEIRO, J. E. Valorisation of glycerol by condensation with acetone over silica-included heteropolyacids. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 98, p. 94-99, 2010.
- FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterification. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006.
- FRANCIS, M. F.; CRISTEA, M.; WINNIK, F. M. Polymeric micelles for oral drug delivery: Why and how. *Pure and Applied Chemistry*, v. 76(7-8), p. 1321-1335, 2004.
- FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; CASTRO, H. F. Monoglicerédeos: produção por via enzimática e algumas aplicações. *Química Nova*, v. 31, p. 1514-1521, 2008.

- FUCHS, C.; SCHWA, W. Epoxidation, hydroxylation and aromatization is catalyzed by a peroxidase from *Solanum lycopersicum* Christopher. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 96, p. 52-60, 2013.
- FULTON, J. L.; SMITH, R. D. Reverse Micelle and Microemulsion Phases in Supercritical Fluids. *J. Phys. Chem*, v. 92, p. 2903-2907, 1988.
- FUNGAL GENOMICS PROJECT. Disponível em <<http://fungalgenomics.concordia.ca/home/indappl.php>>. Acesso em junho de 2013.
- GANEM-QUINTANAR, A.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; BURI, P. Monoolein: A Review of the Pharmaceutical Applications. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 26, n. 8, p. 809–820, 2000.
- GIRELLI, A. M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Chromatography B*, v. 819, p. 3-16, 2005.
- GÎTIN, L.; HABULIN, M.; KNEZ, Z.; HOPULELE, T. The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, VI Food Technology, p. 28–32, 2006.
- GIUFRIDA, W. M.; RODRIGUEZ-REARTES, S. B.; ALONSO, C. G.; ZABALOY, M. S.; CABRAL, V. F.; TAVARES, F. W.; CARDOZO-FILHO, L. High-Pressure Experimental Data of CO₂ + Mitotane and CO₂ + Ethanol + Mitotane Mixtures. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 56, p. 4333-4341, 2011.
- GUCLU-USTUNDAG, O.; TEMELLI, F. Review: Solubility behavior of ternary systems of lipids in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 38, p. 275–288, 2006.
- HABULIN, M.; SABEDER, S.; KNEZ, Z. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in organic solvent and in supercritical carbon dioxide and their antimicrobial activity. *J. of Supercritical Fluids*, v. 45, p. 338–345, 2008a.

- HABULIN, M.; SABEDER, S.; SAMPEDRO, M. A.; KNEZ, Z. Enzymatic synthesis of citronellol laurate in organic media and in supercritical carbon dioxide. *Biochemical Engineering Journal*, v. 42, p. 6-12, 2008b.
- HAKODA, M.; SHIRAGAMI, N.; ENOMOTO, A.; NAKAMURA, K. Measurements of hydrodynamic diameter of AOT reverse micelles containing lipase in supercritical ethane and its enzymatic reaction. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 25, p. 243-247, 2003.
- HESS, R.; BORNSCHEUER, U.; CAPEWELL, A.; SCHEPER, T. Lipase-catalyzed synthesis of monostearoylglycerol in organic solvents from 1,2-O-isopropylidene glycerol. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 725-728, 1994.
- HILLS, G. A., MCCRAE, A. R., POULINA, R. R. Ester preparation, Unichema Chemie BV, 1990.
- HOLMBERG, K.; JONSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAN, B. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. 2 ed. JohnWiley and Sons, Ltd., England, 549 p.; 2003.
- HONG, S-A.; KIM, J-D.; KIM, J.; KANG, J. W.; KANG, I-J. Phase equilibria of palm oil, palm kernel oil, and oleic acid + supercritical carbon dioxide and modeling using Peng–Robinson EOS. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 16, p. 859-865, 2010.
- INSUMOS: REVISTA INSUMOS – ADITIVOS E INGREDIENTES. Disponível e [<www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/>](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/). Acesso em fevereiro de 2012.
- ISIK, S.; ALKAN, S. TOPPARE, L. CIANGA, I.; YAGGCL, Y. Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2—(3-thyeny) acetate/polypyrrole matrices. *European Polymer Journal*, v. 39, p. 2375-2381, 2003.

- ITABAIANA JR, I. ; FLORES, M. C.; SUTILI, F. K.; LEITE, S. G. F.; MIRANDA, L. S. DE M.; LEAL, I. C. R.; DE SOUZA, R. O. M. A. DoE oriented reaction optimization on the lipase-catalyzed monostearin synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 72, p. 313- 318, 2012.
- ITABAIANA JR, I. J.; FLORES, M. C.; SUTILI, F. K.; LEITE, S. G. F.; MIRANDA, L. S. M.; LEAL, I. C. R.; NAKÉDIA, M. F. C., MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A. Lipase Catalyzed Monostearin Synthesis under Continuous Flow Conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 16, p. 1098-1101, 2012.
- ITABAIANA JR, I.; GONÇALVES, K. .; CORDEIRO, Y. M. L.; ZOUMPANIOTI, M.; LEAL, I. C. R.; MIRANDA, L. S. M.; DE SOUZA, R. O. M. A.; XENAKIS, A. Kinetics and mechanism of lipase catalyzed monoacylglycerols synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 96, p. 34- 39, 2013.
- JENNINGS, D. W.; WEISPFENNIG, K. Experimental solubility data of various n-alkane waxes: effects of alkane chain length, alkane odd versus even carbon number structures, and solvent chemistry on solubility. *Fluid Phase Equilibria*, v. 227, p. 27-35, 2005.
- JIANG, X-J.; HU, Y.; JIANG, L.; ZOU, B.; SONG, P.; HUANG, H. Optimization of Enzymatic Synthesis of L-ascorbyl Palmitate by Solvent Engineering and Statistical Experimental Designs. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 18, p. 350-357, 2013.
- KAEWTHONG, W.; KITTIKUN, A. Glycerolysis of Palm Olein by Immobilized Lipase PS in Organic Solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 218-222, 2004.
- KANE, M. A.; BAKER, G. A.; PANDEY, S.; BRIGHT, F. V. Performance of Cholesterol Oxidase Sequestered within Reverse Micelles Formed in Supercritical Carbon Dioxide. *Langmuir*, v. 16, p. 4901-4905, 2000.

- KAZLAUSKAS, R. M.; BORNSCHEUR, U. T. *Biotechnology – A Comprehensive Treatise in 8 vol.* Edited by H.J.REHM and G.REED: 2nd Ed., Federal Republic of Germany, Berlin, VCH- A Wiley Company, 275p, 2008.
- KELKAR, D. S.; KUMAR, A. R.; ZINJARDE, S. S. Hydrocarbon emulsification and enhanced crude oil degradation by lauroyl glucose Ester. *Bioresource Technology*, 2006.
- KLAAS, M. R.; WARWEL, S. Chemoenzymatic epoxidation of alkenes by dimethyl carbonate and hydrogen peroxide. *Organic Letters*, v. 1, p. 1025-1026, 1999.
- KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and Potencial applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, p. 187-201, 2002.
- KOSARIC, N. *Biosurfactants. Biotechnology.* 2ª edição, 670p., 1996.
- KOTLEWSKA, A. J.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A.; ARENDS, I. W. C. E. Epoxidation and Baeyer–Villiger oxidation using hydrogen peroxide and a lipase dissolved in ionic liquids. *Green Chemistry*, v. 13, p. 2154-2160, 2011.
- KUDANGA, T.; PRASETYO, E. N.; SIPILA, J.; NYANHONGO, G. S.; GUEBITZ, G. M. Chemo-enzymatic functionalisation of lignocellulose materials using oxiranes. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1557-1562, 2010.
- KULKARNI,C.V.; WACHTER, W.; IGLESIAS-SALTO, G.; ENGELSKIRCHEN, S.; AHUALLIA, S. Monoolein: a magic lipid? *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 13, p. 3004-3021, 2011.
- KURODA, K.; UEDA, M. Cell surface engineering of yeast for applications in white biotechnology. *Biotechnology Letters*, v. 33, p. 1-9, 2011.
- LANZA, M. *Comportamento de Fases dos Óleos de Oliva, Soja e Mamona em n-butano e Propano a Altas Pressões.* Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos. URI-Campus de Erechim, 2004.

- LAY, E. N. Measurement and Correlation of Bubble Point Pressure in (CO₂ + C₆H₆), (CO₂ + CH₃C₆H₅), (CO₂ + C₆H₁₄), and (CO₂ + C₇H₁₆) at Temperatures from (293.15 to 313.15). K. Journal of Chemical & Engineering Data, v. 55, p. 223-227, 2010.
- LAUDANI, C. G.; PRIMOŽIČ, M.; KNEZ, Z.; HABULIN, M. Phase Equilibrium Measurements and Data Correlation for the Ternary System Oleic Acid + 1-Octanol + Carbon Dioxide. Croatica Chemica Acta, v. 82(4), p. 761-769, 2009.
- LEAL, M. C. M. R. Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, COOPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 111p, 2000.
- LEE, K.; FOGLIA, T. A.; CHANG, K. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. JAOCS, v. 79, p. 191-195, 2002.
- LEHNINGER, A. L. Princípios de Bioquímica. Sarvier Editora, v. 8, 725p., 1993.
- LERIN, L. A.; FEITEN, M. C.; RICHETTI, A.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; OESTREICHER, E. G.; DE OLIVEIRA, D. Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in ultrasound-assisted system: Process optimization and kinetic evaluation. Ultrasonics Sonochemistry, v. 18, p. 988-996, 2011.
- LI, W.; ZHANG, J.; ZHANG, C.; FENG, X.; HAN, B.; YANG, G. Synthesis of -chymotrypsin/polymer composites by a reverse micelle/gas antisolvent method. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 59, p. 11–15, 2007.
- LI, X.; HE, X-Y.; LI, Z-L.; WANG, Y-D.; WANG, C-Y.; SHI, H.; WANG, F. Enzymatic production of biodiesel from Pistacia chinensis bge seed oil using immobilized lipase. Fuel, v. 92, p. 89-93, 2012.

- LI, Z.; LI, X.; WANG, Y.; WANG, Y.; WANG, F.; JIANG, J. Expression and characterization of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase for enzymatic biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 9810-9813, 2011.
- LIAW, E-T.; LIU, K-J. Synthesis of terpinyl acetate by lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 3320-3324, 2010.
- LIESE, A.; SEELBACK, K.; WANDREY, C. *Industrial Biotransformations*. Ed. Wiley-VCH. Weinheim, Alemanha, 2000.
- LIN, S. C. Biosurfactants: recent advances. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 66, p. 109, 1996.
- LO, S-K.; ARIFIN, N.; CHEONG, L-Z.; TAN, C-P.; LONG, K.; YUSOFF, M. S. A. ; LAI, O-M. Response surface modeling of 1-stearoyl-3(2)-oleoyl glycerol production in a pilot packed-bed immobilized *Rhizomucor miehei* lipase reactor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 57, p. 136-144, 2009.
- LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 53, p. 470-472, 1976.
- LU, H.; SUN, S.; BI, Y.; YANG, G.; MA, R.; YANG, H. Enzymatic epoxidation of soybean oil methyl esters in the presence of free fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 112, p. 1101-1105, 2010.
- MACHADO, A. C.O.; DA SILVA, A. A. T.; BORGES, C. P.; SIMAS, A. B. C.; FREIRE, D. M. G. Kinetic resolution of (R,S)-1,2-isopropylidene glycerol (solketal) ester derivatives by lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 69, p. 42-46, 2011.
- MALAJOVICH, M.A. *Biotecnologia: Fundamentos*. Editora ORT, Rio de Janeiro, 2009.

- MAMURO, I. A.; CHENB, B.; EGUCHI, M. KUDO, T.; SUREKHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 16, p. 53-58, 2001.
- MATSUDA, T. Review: Recent progress in biocatalysis using supercritical carbon dioxide. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 115(3), p. 233-241, 2013.
- MAZZER, H. R.; SANTOS, J. C. O.; CABRAL, V. F.; DARIVA, C.; KUNITA, M. H.; RUBIRA, A. F.; AZNAR, M.; CARDOZO-FILHO, L. Phase Behavior at High Pressure of the Ternary System: CO₂, Ionic Liquid and Disperse Dye. *Journal of Thermodynamics*, v. 2012, p. 1-6, 2012.
- MEDINA-GONZALEZ, Y.; TASSAING, T.; CAMY, S.; CONDORETA, J-S. Phase equilibrium of the CO₂/glycerol system: Experimental data by in situ FT-IR spectroscopy and thermodynamic modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 73, p. 97-107, 2013.
- MENGESHA, A. E.; WYDRA, R. J.; HILT, J. Z.; BUMMER, P. M. Binary Blend of Glyceryl Monooleate and Glyceryl Monostearate for Magnetically Induced Thermo-Responsive Local Drug Delivery System. *Pharmaceutical Research*, v. 30, p. 3214-3224, 2013.
- MIYATA, K.; CHRISTIE, R. J.; KATAOKA, K. Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. *Reactive & Functional Polymers*, v. 71, p. 227–234, 2011.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. *Revista Processos Químicos*. Jan / Jun de 2009.
- MUSHTAQ, M.; TAN, I.M.; NADEEM, M.; DEVI, C.; LEE, S.Y. C.; SAGIR, M.; RASHID, U. Epoxidation of methyl esters derived from *Jatropha* oil: An optimization study. *Grasas y Aceites*, v. 64(1), p. 103-114, 2013.

- NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K. Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacology & Therapeutics*, v.112, p.630–648, 2006.
- NITSCHKE, M., PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Química Nova*,v. 25(5), p. 1-13, 2002.
- NOLEN, S. A.; LU, J.; BROWN, J. S.; POLLET, P.; EASON, B. C.; GRIFFITH, K. N.; GLASER, R.; BUSH, D.; LAMB, D. R.; LIOTTA, C. L.; ECKERT, C. A.; THIELE, G. F.; ECKERT, C. A. Olefin Epoxidations Using Supercritical Carbon Dioxide and Hydrogen Peroxide without Added Metallic Catalysts or Peroxy. *Industrial Engineering Chemistry Research*, v. 41, p. 316-323, 2002.
- OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 38(3), p. 373-382, 2006.
- ORELLANA-COCA, C.; TORNVALL, U.; ADLERCREUTZ, D.; MATTIASSON, B.; HATTI-KAUL, R. Chemo-enzymatic epoxidation of oleic acid and methyl oleate in solvent-free medium. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 23(6), p. 431-437, 2005.
- PAPADIMITRIOU, V.; TZIKA, E. D.; PISPAS, S.; SOTIROUDIS, T. G.; XENAKIS, A. Microemulsions based on virgin olive oil: A model biomimetic system for studying native oxidative enzymatic activities. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 382(1–3), p. 232-237, 2011.
- PAPADIMITRIOU, V.; PETIT, C.; CASSIN, G.; XENAKIS, A.; PILENI, M. P. Lipase catalyzed esterification in aot reverse Micelles: a structural study. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 54, p. 1-16, 1995.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Plant lipases from latex: properties and industrial applications. *Química Nova*, v. 29(1), p. 93-99, 2006, 2006.

- PAVLIDIS, I. V.; GOURNIS, D.; PAPADOPOULOS G. K.; STAMATIS, H. Lipases in water-in-ionic liquid microemulsions: structural and activity studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 60, p. 50-56, 2009.
- PENEDO, P. L.; COELHO, G. L. V.; MENDES, M. F. Phase equilibria of oleic, palmitic, Stearic, linoleic and linolenic acids in Supercritical CO₂. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 26(1), p. 137-147, 2009.
- PETROVIC, Z. S.; ZLATANIC, A.; LAVA, C. C.; SINADINOVIC-FISER, S. Epoxidation of soybean oil in toluene with peroxyacetic and peroxyformic acids-kinetics and side reactions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 104, p. 293-299, 2002.
- PINTO, L. F.; RODRIGUEZ-REARTES, S. B.; CORAZZA, M. L.; CABRAL, V. F.; ARAÚJO, P. H. H., MADUREIRA, E. H.; ZABALOY, M. S.; CARDOZO-FILHO, L. Phase behavior of carbon dioxide+medroxyprogesterone acetate system at high pressures. *Fluid Phase Equilibria*, v. 349, p. 1-11, 2013.
- PRIMO M. S.; CENI G. C.; MARCON N. S.; ANTUNES O. A. C.; OLIVEIRA D.; OLIVEIRA J. V. Effects of compressed carbon dioxide treatment on the specificity of oxidase enzymatic complexes from mate tea leaves. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 43, p. 283-290, 2007.
- REHM, H. J.; REED, G. *Biosurfactants. Biotechnology*. 2ª edição, v. 6, 660 p., 1996.
- RIOS, L. A.; WECKES, P.; SCHUSTER, H.; HOELDERICH, W. F. Mesoporous and amorphous Ti-silicas on the epoxidation of vegetable oils. *Journal of Catalysis*, v. 232, p. 19-26, 2005.
- RIZVI, S. S. H. *Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials*. Chapman & Hall, 257p., 1994.
- ROSSO, S. R. C.; BIANCHIN, E.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; FERREIRA, S.R.S. Enzymatic synthesis of poly(-caprolactone) in supercritical carbon dioxide

- medium by means of a variable-volume view reactor. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 79, p. 133-141, 2013.
- ROTHENBERG, G. *Catalysis: Concepts and Green Applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008.
- ROUMANET P-R.; LAFLÈCHE, F.; JARROUX, N.; RAOUL, Y.; CLAUDE, S.; GUÉGAN, P. Novel aliphatic polyesters from an oleic acid based monomer. Synthesis, epoxidation, cross-linking and biodegradation. *European Polymer Journal*, v. 49, p. 813-822, 2013.
- ROYON, D.; LOCATELLI, S.; GONZO, E. E. Ketalization of glycerol to solketal in supercritical acetone. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 58, p. 88- 92, 2011.
- SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.
- SAITHAI, P.; LECOMTE, J.; DUBREUCQ, E.; TANRATTANAKUL, V. Effects of different epoxidation methods of soybean oil on the characteristics of acrylated epoxidized soybean oil-co-poly(methyl methacrylate) copolymer. *Express Polymer Letters*, v.7(11), p. 910-924, 2013.
- SANTOS, J. C.; MAZZER, H. R.; MACHADO, G.D.; ANDREAUS, J.; CABRAL, V. F.; ZABALOY, M.S.; CARDOZO-FILHO, L. High-pressure phase behaviour of the system (CO₂ + C.I. Disperse Orange 30 dye). *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 48, p. 284-289, 2012.
- SCHWARZ, C. E.; KNOETZE, J. H. Phase equilibria of high molecular mass 1-alcohols in supercritical propane. *Fluid Phase Equilibria*, v. 258, p. 51-57, 2007.
- SÉVERAC, E.; GALY, O.; TURON, F.; MONSAN, P.; MARTY, A. Continuous lipase-catalyzed production of esters from crude high-oleic sunflower oil. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4954-4961, 2011.

- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.
- SILVA, INALDO CLAUDIO M. DA ; SANTOS, WILSON LINHARES DOS ; LEAL, IVANA CORREA R. ; ZOGHBI, MARIA DAS GRAÇAS B. ; FEIRHMANN, ANDRESA CARLA ; CABRAL, Vladimir Ferreira ; MACEDO, EMANUEL NEGRÃO ; Cardozo-Filho, Lucio . Extraction of essential oil from cyperus articulatus l.var. articulatus (priprioca) with pressurized CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 88, p. 134-141, 2014.
- SILVA, W. S. D.; LAPISC, A. A. M.; SUAREZA, P. A. Z.; NETO, B. A. D. Enzyme-mediated epoxidation of methyl oleate supported by imidazolium-based ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 68, p. 98-103, 2011.
- SIMA, S.; FERIOIU, V.; GEAN, D. New high pressure vapor-liquid equilibrium data and density predictions for carbon dioxide + ethyl acetate system. *Fluid Phase Equilibria*, v. 325, p. 45-52, 2012.
- SKOURIDOU, V.; STAMATIS, H.; KOLISIS, F. N. Lipase-mediated epoxidation of alpha-pinene. *Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v. 21, p. 67-69, 2003.
- SOETAERT, W.; VANDAMME, E. The impact of industrial biotechnology. *Biotechnology Journal*, v. 1, p. 756-769, 2006.
- STEPHANOPOULOS, G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science*, v. 315, p. 801-804, 2007.
- SUDHEESH, N. P.; AJITH, T. A.; RAMNATH, V.; JANARDHANAN, K. K. Therapeutic potential of *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst. against the declined antioxidant status in the mitochondria of post-mitotic tissues of aged mice. *Clinical Nutrition*, v. 29, p. 406-412, 2010.

- SUN, S.; KE, X.; CUI, L.; YANG, G.; BI, Y.; SONG, F.; XU, X. Enzymatic epoxidation of *Sapindus mukorossi* seed oil by perstearic acid optimized using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, v. 33, p. 676-682, 2011.
- SUN, Y. P.. *Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002.
- SURIYAPRAPADILOK, N.; KITIYANAN, B. Synthesis of Solketal from Glycerol and Its Reaction with Benzyl Alcohol. *Energy Procedia*, v. 9, p. 63-69, 2011.
- SUWANNARANGSEE, S.; BUNTERNGSOOK, B.; ARNTHONG, J.; PAEMANEE, A.; THAMCHAIPENET, A.; EURWILAICHITR, L.; LAOSIRIPOJANA, N.; CHAMPREDA, V. Optimisation of synergistic biomass-degrading enzyme systems for efficient rice straw hydrolysis using an experimental mixture design. *Bioresource Technology*, v. 119, p. 252-261, 2012.
- TAYLOR, L. T.. *Supercritical Fluid Extraction*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- YADAV, G. D.; DEVI, K. M. A kinetic model for the enzyme-catalyzed self-epoxidation of oleic acid. *Journal Of The American Oil Chemists Society*, v. 78, p. 347-351, 2001.
- VOLL, F. A. P. Produção e separação de diacilglicerol a partir do triacilglicerol do óleo de palma. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, PR, 2011.
- WANG, X.; JIN, Q.; WANG, T.; HUANGA, J.; WANG, X. An improved method for the synthesis of 1-monoolein. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 97, p. 130-136, 2013.
- ZAIDAN, U. H.; RAHMAN, M. B. A.; OTHMAN, S. S.; ABDULMALEK, M. B. E.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; SALLEH, A. B. Biocatalytic production of lactose ester

- catalysed by mica-based immobilised lipase. *Food Chemistry*, v. 131, p. 199-205, 2012.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 8017-8021, 1988.
- ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; Enzimas imobilizadas in: *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Said, S. & Pietro, R. C. L. R., Ed. Legis Summa. 2004.
- ZHONG, N.; LI, L.; XU, X.; CHEONG, L-Z.; ZHAO, X.; LI, B. Production of diacylglycerols through low-temperature chemical glycerolysis. *Food Chemistry*, v. 122, p. 228-232, 2010.
- ZOUMPANIOTI, M.; STAMATIS, H.; XENAKIS, A. Microemulsion-based organogels as matrices for lipase immobilization. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 395-406, 2010.
- ZOUMPANIOTI, M.; PARMAKLIS, P.; DOMINGUEZ DE MARIA, P.; STAMATIS, H.; SINISTERA, J. V.; XENAKIS, A. Esterification reactions catalyzed by lipases immobilized in organogels. Effect of temperature and substrate diffusion. *Biotechnology Letters*, v. 30, p. 1627-1631, 2008.
- ZOUMPANIOTI, M.; STAMATIS, H.; PAPADIMITRIOU, V.; XENAKIS, A. Spectroscopic and catalytic studies of lipases in ternary hexane–1-propanol–water surfactantless microemulsion systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 47, p. 1-9, 2006.