

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

JOÃO HENRIQUE DANTAS

**Produção de Ésteres Etilicos de Óleo de Nabo Forrageiro e Canola em Meio
Livre de Solvente com as Lípases de *Burkholderia cepacia* e *Thermomyces lanuginosus***

Maringá, Fevereiro de 2012

JOÃO HENRIQUE DANTAS

Produção de Ésteres Etílicos de Óleos de Nabo Forrageiro e Canola em Meio Livre de Solvente com as Lípases de *Burkholderia cepacia* e *Thermomyces lanuginosus*

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, área de Biotecnologia e Processos Bioquímicos.
Orientação: Gisella M. Zanin
Co-orientação: Pedro A. Arroyo

Maringá

2012

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

D192p Dantas, João Henrique
Produção de ésteres etílicos de óleo de nabo forrageiro e canola em meio livre de solvente com as lipases de *Burkholderia cepacia* e *Thermomyces lanuginosus* / João Henrique Dantas. -- Maringá, 2012.
149 f. : il., color., figs., tabs., fotos.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin.
Coorientador: Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia e Ciências, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2012.


1. Ésteres etílicos. 2. Nabo forrageiro. 3. Canola. 4. Livre de solvente. 5. Lipases *Burkholderia cepacia* e *Thermomyces lanuginosus*. 6. Planejamento experimental. 7. Biodiesel. I. Zanin, Gisella Maria, orient. II. Arroyo, Pedro Augusto, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia e Ciências. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.


CDD 21.ed. 660.2

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

Esta é a versão final da Dissertação de Mestrado apresentada por João Henrique Dantas perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 23 de fevereiro de 2012.


COMISSÃO JULGADORA


Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin
Orientadora / Presidente


Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo
Coordenador


Prof.^a Dr.^a Nádia Krieger
Membro


Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes
Membro


Prof. Dr. José Eduardo Olivo
Membro

Agradecimentos

Aos meus pais por terem me incentivado sempre a estudar, pelo apoio financeiro e moral, carinho, incentivo. Obrigado por tudo que vocês fizeram por mim, sempre lutando e nunca medindo esforços em me ajudar.

À minha irmã Eloisa que sempre esteve ao meu lado.

À minha namorada Kety que segue sempre segurando na minha mão.

Aos meus orientadores, Gisella M. Zanin, Pedro A. Arroyo, F

lávio F. Moraes, Maria Angélica S. de Barros, Indianara Ostroski, Cleide Mara F. Soares, Leandro de Paris, Carlos Eduardo que tanto confiaram em mim e sempre não mediram esforços para auxiliar na construção desse trabalho.

À Tia Cris por estar sempre disposta a ajudar na construção, execução e suporte desse trabalho e responsável por todos os suprimentos utilizados.

A toda a minha família, Vô Luiz e Vô Angelo, Vó Abegair e Vó Emilia, Tia Maria Alice, Tio Zé Olímpio, Minhas maravilhosas primas, Nayara e Isabela, muito obrigado.

Aos amigos: Bruno & Família, Simone & Família, Bola, Marcia, Fabiola, Adriano, Denise, Ju Bossoni & Junior, Ju Fubá, Day, Raquel, Ale, Arielly, Ninho, Rodolfo, Sara, Haislan, Barbara, Bruna, Jéssica, Douglas, Crinstian, Duda, Priscilla, Graemy, Scott, Tio Eduardo, Paulo, Natasha, Luiza, Lauro, Mauricio, Larrisa, Dudu, Tiago, Ranyere, e a tantos outros que de alguma forma contribuíram nesse trabalho.

À CAPES pelo suporte financeiro por meio do projeto Pró-Engenharia N°: 23038-028317/2008-44.

“Eu posso conquistar o mundo com uma mão,
se você estiver segurando a outra.”

Autor desconhecido

Resumo

Dantas, João Henrique. Produção de Ésteres Etílicos de Óleos de Nabo Forrageiro e Canola em Meio Livre de Solvente com as Lípases de *Burkholderia cepacia* e *Thermomyces lanuginosus*. 2012. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química – Universidade Estadual de Maringá. Maringá – PR. 16 de fevereiro de 2012.

A produção de ésteres etílicos pela transesterificação enzimática dos óleos de canola e nabo forrageiro utilizando as lípases de *Burkholderia cepacia* e *Thermomyces lanuginosus* foi estudada empregando a metodologia de superfícies de resposta, obtidas por meio de um planejamento fatorial 2^3 , com quatro repetições no ponto central. A temperatura (40, 50 e 60°C), a razão molar álcool:óleo (6:1, 9:1 e 12:1) e a quantidade de enzima em relação ao óleo (5; 7,5; 10%) foram as variáveis avaliadas e as respostas foram a atividade de consumo de triacilglicerol, a atividade de produção de éster, a conversão de triacilglicerol e o rendimento de éster. O monitoramento do andamento da reação de transesterificação foi analisado e quantificado por cromatografia em fase líquida de alta eficiência utilizando gradiente de separação aquoso/orgânico não aquoso de fase reversa. Os resultados mostraram que o óleo de canola quando comparado com o óleo de nabo forrageiro, propiciou conversões mais rápidas dos triacilglicerídeos e maiores rendimentos de éster, como também maiores valores de atividades de produção de éster e de consumo de triacilglicerol para as duas lípases utilizadas. A lípase de *Burkholderia cepacia* apresentou resistência à temperatura e a altas razões molares álcool:óleo, porém, sem alta seletividade à produção de éster. O maior rendimento observado foi de 47,08% utilizando o óleo de canola e 39,98% o de óleo de nabo forrageiro. Já a lípase de *Thermomyces lanuginosus* apresentou altos rendimentos de éster - 85,78% e 71,38%, para o óleo de canola e nabo forrageiro, respectivamente, além de rápida conversão dos triacilglicerídeos. No entanto sofreu forte inativação quando a temperatura foi superior a 50°C. As superfícies de respostas obtidas do planejamento experimental foram capazes de prever no mínimo 88% da variância total do sistema.

Abstract

Dantas, João Henrique. Production of Ethyl Esters of *Raphanus sativus* L. and Canola Oil in Solvent Free System with the Lipases from *Burkholderia cepacia* and *Thermomyces lanuginosus*, 2012. Master's Degree Dissertation in Chemical Engineering - Postgraduate Program in Chemical Engineering - State University of Maringa. Maringa - PR. 16th February 2012.

The production of ethyl esters by the enzymatic transesterification of the canola's oil and the *Raphanus sativus* L's oil using the *Burkholderia cepacia*'s lipase and *Thermomyces lanuginosus*'s lipase was studied using the methodology of response surface, obtained by a factorial design 2^3 , with four repetitions in the central point. The temperature (40, 50 and 60°C), the molar ratio alcohol:oil (6:1, 9:1, and 12:1) and the amount of enzyme in respect to the oil (5; 7,5 and 10%) were the evaluated variable and the response were the triacylglycerol's activity of consumption, the ester's activity of production, the triacylglycerol's conversion and the ester's yield. The monitoring of the transesterification's reaction course was analyzed and quantified by high performance liquid chromatography using combined linear gradient with aqueous-organic and non-aqueous. The results showed that the canola's oil when compared with the *Raphanus sativus* L's oil, propitiated faster conversions from the triacylglycerol's and bigger yield from ester, as well as bigger ester production's values of activities and the consume of triacylglycerol for the two lipase used. The *Burkholderia cepacia*'s lipase presented resistance to temperature and to high molar ratio alcohol:oil, however, with no high selectivity to the production of ester. The biggest observed yield was of 47,08% using the canola's oil and 39,98% by the *Raphanus sativus* L's oil. On the other hand the *Thermomyces lanuginosus*'s lipase presented high yield of ester - 85,78% and 71,38%, for the canola's oil and the *Raphanus sativus* L's oil respectively, and also fast conversion of the triacylglycerols. However it suffered a strong inactivation when the temperature was higher than 50°C. The response surface obtained from the experimental design were capable of foresee at least 88% of the system total variance.

Lista de Figuras

Figura 1: Reação de transesterificação enzimática do triacilglicerol produzindo ésteres e produtos intermediários de reação.	27
Figura 2: Micrografia eletrônica de varredura de <i>Burkholderia cepacia</i> . Original em: Imagem da Biblioteca de Saúde Pública - número de identificação #255 – Centro de Controle de Doenças e Prevenção 2010 – Créditos de Janice Carr.	34
Figura 3: Microfotografia de <i>Thermomyces lanuginosus</i> com ampliação de a. x1600; b. x1350; c. x5500. Original in: Hoog, G.S. de 2000, Atlas of Clinical Fungi, ed. 2: 1-1126.	35
Figura 4: Cromatograma de uma amostra intermediária da reação de transesterificação enzimática do óleo de canola evidenciando a separação entre os compostos.	68
Figura 5: Cromatograma de uma amostra intermediária da reação de transesterificação enzimática do óleo de nabo forrageiro evidenciando a separação entre os compostos.	69
Figura 6: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Canola pela lipase <i>Burkholderia cepacia</i>	71
Figura 7: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da temperatura e razão molar.	72
Figura 8: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da quantidade de enzima e temperatura.	74
Figura 9: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da razão molar e quantidade de enzima.	74
Figura 10: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a conversão do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i>	76
Figura 11: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da razão molar e temperatura	77
Figura 12: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função quantidade de enzima e temperatura ..	78
Figura 13: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da quantidade de enzima e razão molar.	78

Figura 14: Conversão dos triacilglicerídeos de óleo de canola em função do tempo utilizando lípase de <i>Burkholderia cepacia</i> para todos as condições experimentadas.	79
Figura 15: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i>	81
Figura 16: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da temperatura e razão molar.	82
Figura 17: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função temperatura e quantidade de enzima. .	82
Figura 18: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da quantidade de enzima e razão molar.	83
Figura 19: Rendimento de éster do óleo de canola em função do tempo utilizando lípase de <i>Burkholderia cepacia</i> para todas as condições experimentadas.....	84
Figura 20: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para rendimento em éster do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i>	85
Figura 21: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da razão molar e temperatura.	86
Figura 22: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função quantidade de enzima e razão molar.	87
Figura 23: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da quantidade de enzima e razão molar.	87
Figura 24: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i>	89
Figura 25: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da razão molar e temperatura.	90
Figura 26: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da quantidade de enzima e temperatura.	91
Figura 27: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da razão molar e quantidade de enzima.	92

Figura 28: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a conversão do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i>	94
Figura 29: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da razão molar e temperatura.....	94
Figura 30: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função quantidade de enzima e temperatura.....	95
Figura 31: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da quantidade de enzima e razão molar.....	95
Figura 32: Conversão dos triacilglicerídeos de óleo de canola em função do tempo, utilizando lípase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> para todos as condições experimentadas.....	96
Figura 33: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i>	97
Figura 34: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função razão molar e temperatura.	98
Figura 35: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função quantidade de enzima e temperatura.	99
Figura 36: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da quantidade de enzima e razão molar.....	99
Figura 37: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para rendimento em éster do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i>	101
Figura 38: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da razão molar e temperatura.....	102
Figura 39: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função quantidade de enzima e temperatura.....	103
Figura 40: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da quantidade de enzima e razão molar.....	104
Figura 41: Rendimento de éster do óleo de canola em função do tempo utilizando lípase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> para todas as condições experimentadas.....	104

Figura 42: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i>	107
Figura 43: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da razão molar e temperatura.	108
Figura 44: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da quantidade de enzima e temperatura.....	108
Figura 45: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da razão molar e quantidade de enzima.	109
Figura 46: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a conversão do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i>	111
Figura 47: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da razão molar e temperatura.	112
Figura 48: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função quantidade de enzima e temperatura.	113
Figura 49: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da quantidade de enzima e razão molar.....	113
Figura 50: Conversão dos triacilglicerídeos de óleo de nabo forrageiro em função do tempo, utilizando lípase de <i>Burkholderia cepacia</i> para todos as condições experimentadas	114
Figura 51: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i>	115
Figura 52: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da temperatura e razão molar.	116
Figura 53: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função temperatura e quantidade de enzima.	117
Figura 54: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da quantidade de enzima e razão molar.....	117

Figura 55: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para rendimento em éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i>	119
Figura 56: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da razão molar e temperatura.	119
Figura 57: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função quantidade de enzima e razão molar.	120
Figura 58: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i> em função da quantidade de enzima e razão molar.	120
Figura 59: Rendimento de éster do óleo de Nabo Forrageiro em função do tempo utilizando lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> para todos as condições experimentadas.	121
Figura 60: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i>	123
Figura 61: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da razão molar e temperatura.	124
Figura 62: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da quantidade de enzima e temperatura.	124
Figura 63: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da razão molar e quantidade de enzima.	126
Figura 64: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a conversão do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i>	127
Figura 65: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da razão molar e temperatura.	128
Figura 66: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função quantidade de enzima e temperatura.	129

Figura 67: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da quantidade de enzima e razão molar.	130
Figura 68: Conversão dos triacilglicerídeos de óleo de canola em função do tempo, utilizando lípase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> para todas as condições experimentadas.....	130
Figura 69: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> . .	132
Figura 70: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da temperatura e razão molar.	133
Figura 71: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função temperatura e quantidade de enzima.....	133
Figura 72: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da quantidade de enzima e razão molar.	134
Os resultados de atividade de produção de éster podem ser verificados na Figura 72 que mostra os maiores valores de atividade obtidos foram iguais a 27,52 U/g de proteína para o experimento 1 e 28,46 U/g de proteína para o experimento 7. Os valores de atividade de produção de éster do óleo de canola obtidos da lípase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> são bastante superiores, confirmando novamente que a diferença de composição glicídicas dos óleos influencia tanto no mecanismo de atuação da lípase quanto na atividade da enzima (Dizge et al., 2009; Salis et al., 2007).	134
Figura 73: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para rendimento em éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i>	135
Figura 75: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função da razão molar e temperatura.	136
Figura 76: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função quantidade de enzima e temperatura.	137
Figura 77: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função quantidade de enzima e razão molar.....	137

Figura 78: Rendimento de éster do óleo de Nabo Forrageiro em função do tempo utilizando lípase de *Thermomyces lanuginosus* para todos as condições experimentadas..... 139

Lista de Tabelas

Tabela 1: Matriz do planejamento 2^3 para os efeitos temperatura, razão molar e Quantidade de enzima.	60
Tabela 2: Perfil de ácidos graxos presentes no óleo de canola.....	63
Tabela 3: Massa molar média dos compostos presentes no óleo de canola.	63
Tabela 4: Perfil de ácidos graxos presentes no óleo de nabo forrageiro	64
Tabela 5: Massa molar média dos compostos presentes no óleo de nabo forrageiro. ..	65
Tabela 6: Atividades hidrolítica e de esterificação das lípases de <i>Burkholderia cepacia</i> e <i>Thermomyces lanuginosus</i> livre.....	66
Tabela 7: Atividade de transesterificação das lípases de <i>Burkholderia cepacia</i> e <i>Thermomyces lanuginosus</i> livres.....	66
Tabela 8: Análise de variância para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Canola pela lípase <i>Burkholderia cepacia</i>	70
Tabela 9: Resultados das Variáveis de Resposta para cada Experimento do Planejamento Fatorial.	75
Tabela 10: Análise de variância para a conversão de triacilglicerol do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i>	75
Tabela 11: Análise de variância para a atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i>	80
Tabela 12: Análise de variância para rendimento de éster do óleo de Canola pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i>	84
Tabela 13: Análise de variância para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i>	88
Tabela 14: Resultados das Variáveis de Resposta para cada Experimento do Planejamento Fatorial.	92
Tabela 15: Análise de variância para a conversão de triacilglicerol do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i>	93
Tabela 16: Análise de variância para a atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i>	97
Tabela 17: Análise de variância para rendimento de éster do óleo de Canola pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i>	101

Tabela 18: Análise de variância para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i>	106
Tabela 19: Resultados das Variáveis de Resposta para cada Experimento do Planejamento Fatorial.....	110
Tabela 20: Análise de variância para a conversão de triacilglicerol do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i>	111
Tabela 21: Análise de variância para a atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i>	115
Tabela 22: Análise de variância para rendimento de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Burkholderia cepacia</i>	118
Tabela 23: Análise de variância para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i>	122
Tabela 24: Resultados das Variáveis de Resposta para cada Experimento do Planejamento Fatorial.....	125
Tabela 25: Análise de variância para a conversão de triacilglicerol do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i>	127
Tabela 26: Análise de variância para a atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i>	131
Tabela 27: Análise de variância para rendimento de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima <i>Thermomyces lanuginosus</i>	135

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	XV
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 O Uso da Energia	23

2.2	Os Biocombustíveis	24
2.3	Reação de Transesterificação	27
2.4	Enzimas	30
2.4.1	Lípases	31
2.5	Nabo Forrageiro	36
2.6	Canola	37
2.7	Quantificação dos Ésteres Etílicos e Produtos da Reação de Transesterificação.	38
2.7.1	Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência.	39
2.7.2	Cromatografia em Fase Gasosa.....	41
2.7.3	Cromatografia em Fase Líquida x Cromatografia em Fase Gasosa	42
2.8	Análise e Quantificação dos Ésteres Metílicos e Produtos da Reação de Transesterificação por Cromatografia em Fase Líquida	44
2.9	Delineamento Fatorial	48
3	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1	Reagentes e Substratos	49
3.2	Métodos	50
3.2.1	Índice de Acidez	50
3.2.2	Índice de Peróxido.....	51
3.2.3	Índice de Saponificação.....	52
3.2.4	Teor de Umidade.....	52
3.2.5	Análise do Óleo em Cromatografia a Gás	52
3.2.6	Determinação da Massa Molar	52
3.2.7	Determinação do Teor de Proteína da Enzima	53
3.2.8	Determinação da Atividade Hidrolítica pelo Método do Azeite de Oliva	54
3.2.9	Determinação da Atividade Hidrolítica pelo Método do Butirato de Metila	55
3.2.10	Determinação da Atividade de Esterificação pelo Teor de Ácido Butírico.....	55
3.2.11	Determinação da Atividade de Transesterificação pela Produção de 2-fenetil acetato.....	56
3.2.12	Análise das Amostras de Triacilglicerídeos, Ésteres e Produtos por CLAE	56
3.2.13	Reação de Transesterificação em Reator Batelada.....	57
3.2.14	Cálculo do Rendimento em Ésteres	58
3.2.15	Cálculo da Conversão de Triacilglicerídeos	58

3.2.16	Cálculo da Atividade de Conversão de Triacilglicerídeos	58
3.2.17	Cálculo da Atividade de Rendimento em Éster	59
3.3	Planejamento Experimental	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	Caracterização dos Óleos Vegetais	61
4.1.1	Índice de Acidez	61
4.1.2	Índice de Peróxido.....	62
4.1.3	Índice de Saponificação.....	62
4.2	Determinação do Perfil de Ácidos Graxos e Massa Molar.	63
4.3	Determinação do Teor de Proteína da Enzima Livre	65
4.4	Determinação da Atividade Hidrolítica e de Esterificação da Lípase.....	66
4.5	Determinação da Atividade de Transesterificação da Lípase.....	66
4.6	Método de Análise por CLAE	67
4.7	Planejamento Experimental.....	70
4.7.1	Resultados dos Ensaio de Produção de Ésteres Etílicos com Lípase de <i>Burkholderia cepacia</i> Utilizando Óleo de Canola	70
4.7.2	Resultados dos Ensaio de Produção de Ésteres Etílicos com Lípase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> Utilizando Óleo de Canola	88
4.7.3	Resultados dos Ensaio de Produção de Ésteres Etílicos com Lípase de <i>Burkholderia cepacia</i> Utilizando Óleo em Nabo Forrageiro.....	105
4.7.4	Resultados dos Ensaio de Produção de Ésteres Etílicos com Lípase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> Utilizando Óleo de Nabo Forrageiro	122
5	CONCLUSÕES.....	139
6	REFERÊNCIAS	142

1 Introdução

Desde a descoberta do fogo a necessidade mundial de energia só tem aumentado. No século XVIII, a revolução industrial, com a mecanização do que antes era manufatura, provocou um salto no consumo de energia para movimentação das fábricas de produção dos bens de consumo. Porém, o grande marco do consumo de energia foi a apresentação do motor a combustão interna, realizada por Rudolf Diesel em 1900 (Challoner & Baylis, 2010).

Os motores do ciclo diesel, que foram desenvolvidos para melhorar o rendimento das máquinas a vapor, podiam ser alimentados com óleo de origem vegetal, animal e mineral. No entanto, as de origem vegetal e animal foram sendo negligenciadas diante a produção em larga escala de petróleo e seus derivados, principalmente o diesel, que era produzido num preço muito baixo. Isso propiciou a disseminação desses motores e seus combustíveis de maneira muito rápida (Knothe et al., 2006).

A eminência de esgotamento das fontes mundiais de petróleo, o alto consumo mundial, os altos preços do barril de petróleo, as mudanças climáticas originadas da grande concentração de gases do efeito estufa na atmosfera, a exigência do mercado consumidor de processos mais sustentáveis e ainda a grande vinculação da economia com o petróleo podem indicar um colapso quando esse se esgotar. Então esses fatores indicam a necessidade de substituição do petróleo como matriz energética mundial.

A possibilidade de substituição do óleo de origem fóssil pelo óleo de origem vegetal é possível tecnologicamente. Este, além de ser um óleo de origem renovável apresenta características menos agressivas ao meio ambiente, como por exemplo, baixo índice de enxofre, alta biodegradabilidade, redução das emissões de gases causadores do efeito estufa, diminuição de desgaste de peças do motor (Knothe et al., 2006; Rios, 2008).

Dentre os óleos vegetais, o de nabo forrageiro (*Raphanus Sativus L*) apresenta algumas vantagens, tais como grande produção de sementes por hectare, 900kg/ha.ano, altas quantidades de óleo por semente, que pode chegar a até 40%. A não concorrência com óleos alimentícios e a elevada porcentagem de triacilglicerídeos, cerca de 98%, pode ser uma boa oportunidade inserção dessa forrageira no mercado de grãos e óleos (Dambiski, 2007; Rios, 2008).

Por outro lado, o óleo de canola (*Brassica napus L.*) é considerado um alimento muito saudável, pois apresenta elevadas quantidades de ômega-3, que é muito utilizado em alimentos. No entanto, mesmo sendo valorizado comercialmente é um dos óleos mais produzido no mundo e o mais utilizado na Europa para a produção de biodiesel. Constitui padrão de referência na Europa e ainda, o biodiesel originário desse óleo, apresenta alta resistência à oxidação e o ponto de neva mais baixo entre os óleos (Bryan R, 2011; Dizge & Keskinler, 2008; Knothe et al., 2006; Moser, 2009; Xie et al., 2007)

Para produção dos mono-ésteres, os óleos devem sofrer modificações nas moléculas de triacilglicerídeos. Uma das modificações possíveis é por meio da reação de transesterificação e consiste na transformação de um éster em outro, com a troca de dois grupamentos alcóxido. Se um dos reagentes for álcool, o processo de transesterificação também poderá ser chamado de alcoólise (Schuchardt et al., 1998).

Quando os ésteres produzidos encontram-se numa fração mássica superior a 96,5 % e atendem às especificações impostas pelas normas ANP 07/2008 no Brasil, ou EN 14214 na União europeia ou ASTM D6751 nos Estados Unidos da América o produto pode ser denominado biodiesel.

A reação de transesterificação pode ser realizada utilizando tecnologias de fluidos supercríticos, reatores de ultrassom, catalisadores ácidos ou básicos, homogêneos ou heterogêneos e tecnologia enzimática, dentre outras (Dambiski, 2007; Fallot & Girard, 2006).

A tecnologia enzimática atrai a atenção devido aos apelos ambientais por uma química verde, à possibilidade de esterificar óleos com alto teor de ácidos graxos e ainda, à viabilidade de realizar a reação em condições suaves de temperatura e pH. No entanto, o elevado tempo de reação, alto custo operacional e a dificuldade de utilizar elevadas razões molares álcool:óleo e maiores temperaturas são problemas a serem resolvidos.

Dentre as enzimas utilizadas no processamento de óleo às lípases obtidas de *Burkholderia cepacia* e *Thermomyces lanuginosus* são as que atraem atenção, principalmente, por que poucos pesquisadores utilizam essas lípases e por características dos microorganismos produtores, que indicam boa resistência às condições impostas pelos meios reacionais de transesterificação (Salum et al., 2010; Verdugo et al., 2011).

Na maioria dos processos de produção de biodiesel no mundo, o álcool usado é o metanol, pois é mais reativo e diminui problemas de emulsificação, ou seja, facilita a separação e purificação dos produtos. No entanto, o etanol é mais interessante do ponto de vista de sustentabilidade da tecnologia, pois é renovável, enquanto o metanol é normalmente um derivado do petróleo. Adicionalmente, o etanol é um produto produzido em larga escala no Brasil.

Em reações que utilizam catalisadores inorgânicos, excesso de álcool é empregado para assegurar uma alta conversão e minimizar os efeitos de restrições difusionais. Entretanto, na síntese enzimática, níveis excessivos de álcool podem inibir a enzima e diminuir sua atividade catalítica ao longo da reação (Köse et al., 2002; Salis et al., 2005). Então, a razão molar álcool:óleo, principalmente, na transesterificação enzimática, deve ser muito bem investigada.

As reações de transesterificação por rota enzimática, geralmente, utilizam co-solventes. Esses compostos reduzem o efeito de inativação da enzima causada pelo álcool e glicerol, propiciam maiores velocidades de reação e atividade específica dentre outros fatores. No entanto, o uso de co-solventes propicia inconvenientes como a insalubridade do ambiente, toxicidade dos efluentes, inserção de processos de remoção de solvente e dentre outros o aumento do custo operacional (Dossat et al., 2002; Du et al., 2006; Karra-Châabouni et al., 2006; Lee et al., 2010a; Vêras et al., 2011).

As reações de transesterificação para a produção de diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos ou éster, industrialmente, são conduzidas em temperaturas elevadas. Por meio de catálise enzimática, esse processo pode ser conduzido em temperaturas mais brandas. No entanto, mudando-se a temperatura, pode-se obter rendimentos e seletividades diferentes que podem ser ou não interessantes para o processo industrial. Nesse caso, a temperatura é uma variável importante para a transesterificação enzimática.

A quantidade de biocatalisador no meio reacional também apresenta características limitantes para a aplicação da tecnologia de produção de ésteres etílicos, principalmente, por seu alto custo. No entanto, altas quantidades de enzima podem significar maiores rendimentos em menor tempo reacional (Fernandes, 2007; Fu et al., 1995).

Portanto, o objetivo principal desse trabalho foi estudar a transesterificação dos óleos de nabo forrageiro e canola por meio de catálise enzimática em meios livres de solvente, a partir de lípases obtidas de *Burkholderia cepacia* e *Thermomyces lanuginosus*.

Os objetivos secundários foram:

- Caracterizar as lípases de *Burkholderia cepacia* e *Thermomyces lanuginosus* quanto às atividades hidrolítica, de esterificação e transesterificação;
- Caracterizar os óleos de nabo forrageiro e canola em relação aos índices de acidez, de peróxido, saponificação, teor de umidade e perfil de ácido graxo;
- Implementar metodologia de análise e quantificação de ésteres de etila, monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos e triacilglicerídeos das amostras do meio reacional utilizando cromatógrafo a líquido de alta eficiência;
- Delinear um planejamento experimental para analisar a influência das variáveis temperatura, razão molar álcool:óleo, quantidade de enzima, e a interação que estas variáveis apresentam sobre, rendimento em éster, conversão dos triacilglicerídeos, atividades de produção de éster e atividade de consumo de triacilglicerídeos tanto para o óleo de canola quanto de nabo forrageiro.
- Verificar o efeito que as fontes de material graxo apresentam sobre rendimento em éster, conversão dos triacilglicerídeos, atividades de produção de éster e atividade de consumo de triacilglicerídeos.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 O Uso da Energia

A necessidade mundial de energia só tem aumentado. No princípio, o fogo foi descoberto ao acaso, devido a fatores da natureza e era usada apenas para ornamentação. Novas aplicações foram encontradas, como a proteção ao clima frio e contra o ataque de animais, preparação de alimentos, limpeza de áreas para o cultivo e, mais tarde, para a fabricação de armas, fundição dentre outras. A importância do fogo é enorme. A evolução do *Homo erectus* ao *Homo Sapiens* só foi possível devido à manipulação do fogo, pois de maneira empírica descobriu que a carne assada levava mais tempo para estragar, o que facilitava o consumo de proteína animal. Essa mudança na dieta propiciou um desenvolvimento mais rápido dos músculos e cérebro permitindo a evolução do raciocínio (Almeida, 2006; Challoner & Baylis, 2010).

No século XVIII, a revolução industrial, com a mecanização do que antes era manufatura, provocou um salto no consumo de energia para a movimentação das fábricas e produção dos bens de consumo. As fábricas precisavam de vapor para movimentação das máquinas, principalmente teares, e essa energia, gerada pela queima de lenha ou carvão mineral, foi o grande marco da primeira revolução industrial. A segunda revolução industrial, já no final do meio ao final do século XIX, foi um grande marco no consumo de energia. As empresas precisavam cada vez mais de energia para movimentar as indústrias químicas, elétricas e aço, sendo marcada pela utilização do petróleo como fonte principal de energia (Challoner e Baylis, 2010).

As descobertas cada vez maiores de petróleo pelo mundo, o pós-guerra, e mudanças na economia mundial trouxe a terceira revolução industrial. Com isso a energia deixou de ser preocupação, pois a cada momento mais campos de petróleo eram descobertos, prospecção a grandes profundidades, utilização da energia nuclear, eólica, solar o que tornava menos eminente a falta de energia no cenário mundial. Essa revolução foi marcada pela evolução tecnológica, engenharia genética e comunicação.

Pouco se pensou numa possível escassez mundial de energia. A partir de 1979, o primeiro choque do petróleo e os efeitos devastadores nos mercados, junto com a identificação dos primeiros impactos ambientais causados pela alta concentração de CO₂ na atmosfera, despertou-se a necessidade do mundo por energia.

Foi então que novas fontes de energia, ambientalmente sustentáveis começaram a ser consideradas indispensáveis para o desenvolvimento econômico e social do mundo, das quais se destaca os biocombustíveis (Fukuda et al., 2001; Shimada et al., 1999; Sonare & Rathod, 2010)

2.2 Os Biocombustíveis

Os biocombustíveis são derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia. Os dois principais biocombustíveis líquidos utilizados no Brasil são o etanol produzido a partir de cana-de-açúcar, e, em escala crescente, o biodiesel, produzido a partir de óleos vegetais ou gorduras animais.

Os biocombustíveis estão presentes no cotidiano do brasileiro há mais de 80 anos. Entretanto, foi na década de 1970, durante as crises do petróleo, que sua produção e uso ganharam grande dimensão. Na época, foi criado o Pro-Álcool, programa que introduziu o etanol de cana-de-açúcar em larga escala na matriz de combustíveis brasileira, sendo considerado esse um dos mais bem sucedidos programas de substituição dos combustíveis derivados de petróleo. (<http://www.brasil.gov.br/sobre/economia/matriz-energetica/biocombustiveis>. Acesso em 27/04/2011).

O biodiesel é definido pela editora de normas técnicas ASTM como um combustível composto de mono alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa derivado de óleos vegetais ou gorduras de animais, denominado por B100. Esse combustível tanto é registrado como combustível, como aditivo de combustível. Não há, no entanto, outro uso do biodiesel registrado no mercado. (Standard, 2011).

O biodiesel pode ser produzido por uma grande variedade de matérias-primas que incluem óleos vegetais, gorduras de origem animal, óleos de descarte, resíduos industriais e urbanos com álcool, na presença de um catalisador, para produzir mono alquil ésteres e glicerina que deve ser removida.

É possível produzir biodiesel de várias matérias graxas, como óleos vegetais, animais, de descarte, resíduos industriais e urbanos (Karmakar et al., 2010; Oliveira et al., 2008). Os óleos vegetais são os mais utilizados para a produção de biodiesel sendo que os principais são: o óleo de soja (Arai et al., 2010; da Silva et al., 2010; Di Serio et al., 2006; Dizge et al., 2009; Guan et al., 2010; Pessoa et al., 2010) o de óleo de Canola, (Bryan R, 2011; Dizge & Keskinler, 2008; Jang et al.; Kulkarni et al., 2007; Lee et al., 2010b) o óleo de nabo forrageiro (Domingos et al., 2008); (Valle et al., 2009; Ávila & Sodré, 2012) (Valle et al., 2010); o óleo de Pinhão Manso (Foidl et al., 1996; G bitz et al., 1999; Raphael M, 2011; Silitonga et al., 2011) dentre outros óleos que têm também apresentam grande potencial, mas sua aplica o está relacionada com características específicas de cada região ao qual esse   produzido.

A especificidade de cada região   um fator importante para a escolha da melhor m teria prima para a produ o de biodiesel, pois a m teria prima está intimamente ligada com o preço que o biodiesel será entregue ao mercado consumidor (Knothe et al., 2006). No Brasil uma grande variedade de óleos   utilizada para a produ o de biodiesel, como a soja, o nabo forrageiro, o girassol, canola, algodão, óleo de descarte, palma, babaçu, dentre outros. Nos

Estados Unidos da América o óleo mais utilizado é o óleo de soja (Mustafa, 2011), na Europa são os óleos de soja de descarte, canola, oliva dentre outros (Mustafa, 2011), nos países Asiáticos óleos de descarte, amendoim, pau de sebo dentre outros (Yang et al., 2007).

O álcool utilizado pode ou não ser originado de recursos renováveis (Karmakar et al., 2010; Knothe et al., 2006; Oliveira et al., 2008). O metanol é muito utilizado para a produção de biodiesel por que é geralmente o álcool de menor custo nos países nórdicos. Outros álcoois como, propanol, butanol, octanol, seus isômeros constitucionais e outros álcool podem ser empregados para produzir ésteres de qualidade superior (Dutta & Dasu, 2011).

Os produtos de transesterificação metílica são muitas vezes denominados ésteres metílicos de ácidos graxos, ao invés de biodiesel. Apesar de outros álcoois poderem gerar biodiesel, muitas das especificações hoje existentes foram definidas de forma que somente os ésteres metílicos as atendam pelo, menos nos casos em que todos os limites de especificação devam ser atendidos rigorosamente (Knothe et al., 2006).

Além de ser totalmente compatível com o diesel em praticamente todas as suas propriedades, o biodiesel apresenta várias vantagens. É derivado de fontes renováveis, é biodegradável, gera redução nas emissões de particulados presentes nos gases de exaustão, possui alto ponto de fulgor, apresenta alta lubricidade dentre outras vantagens.

Alguns problemas inerentes ao biodiesel estão relacionados ao seu alto custo, aumento de emissões de NO_x nos gases de exaustão, baixa estabilidade quando exposto ao ar e propriedades de fluxo desfavoráveis em países frios (Knothe et al., 2006).

O alto custo do biodiesel tem sido compensado em muitos países por legislações específicas, como marcos regulatórios, subsídios de isenção fiscal ou uso de matérias-primas de menor valor agregado (Knothe et al., 2006). O alto custo pode ser visto como entrave ao desenvolvimento da tecnologia, mas altas e instabilidade no preço de petróleo, necessidade de processos mais sustentável, estratégias de propaganda, conscientização, características de melhor lubricidade do biodiesel e redução de material particulado nas emissões podem superar essa adversidade.

2.3 Reação de Transesterificação

Para aplicar óleos vegetais como combustíveis é necessário primeiro que esses óleos atendam as condições mínimas de operação nos motores ao qual ele será aplicado, geralmente motores a diesel de combustão interna. Ma e Hanna, (1999) descrevem várias tecnologias que propiciam a transformação nos óleos de origem renováveis e que permitem utiliza-los como substitutos ou aditivos ao diesel. No entanto a mais eficiente e mais aplicável é a reação de transesterificação (Knothe et al., 2006).

Para evitar problemas como a degradação de óleo, proporcionar boa fluidez e atomização, além de apresentar características mínimas para aplicação nos motores de ciclo diesel, uma reação de transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais faz-se necessária. A transesterificação é largamente empregada para a redução da viscosidade dos triacilglicerídeos, melhorando as propriedades físicas dos combustíveis para o motor a diesel (Schuchardt et al., 1998).

Na transesterificação uma molécula de triacilglicerol reage com um álcool na presença de um catalisador que pode ser ácido básico, metálico ou biológico, conforme mostrado na

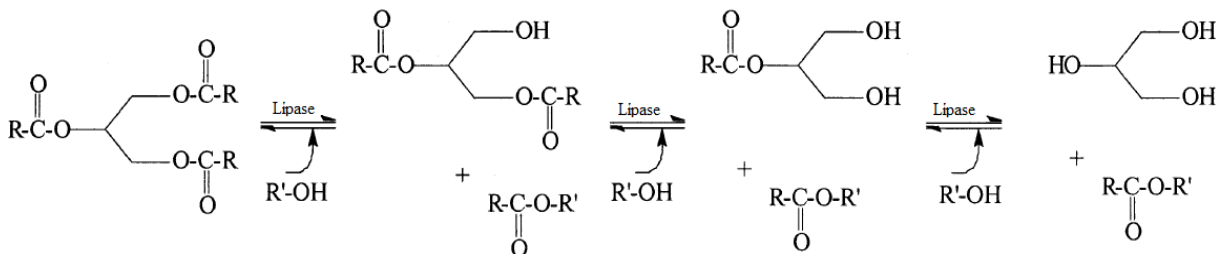


Figura 1, numa razão molar mínima de um para três, produzindo uma mistura de ésteres de ácidos graxos e glicerol e produtos intermediários de reação quando a reação não se completa (Lima et al., 2007).

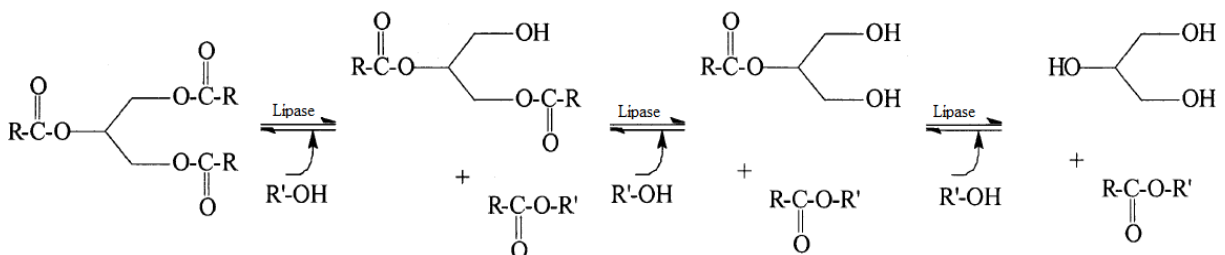


Figura 1: Reação de transesterificação enzimática do triacilglicerol produzindo ésteres e produtos intermediários de reação.

Quando a mistura de ésteres produzidos encontra-se numa fração mássica superior a 96,5% e atendem as especificações impostas pelas normas ANP 07/2008 no Brasil, ou EN 14214 na União Europeia, ou ASTM D6751 nos estados unidos, o produto pode ser denominado de biodiesel.

O processo global de síntese de biodiesel é uma sequência de três reações consecutivas e reversíveis nas quais diacilglicerol e monoacilglicerol são formados como intermediários. A estequiometria da reação requer um mol de triacilglicerol para três de álcool. No entanto, excesso de álcool é utilizado para aumentar a conversão em ésteres. A reação de transesterificação pode ser catalisada tanto por catalisadores homogêneos quanto heterogêneos – os quais podem ser ácidos ou básicos (Fogler, 2009; Ma & Hanna, 1999).

Industrialmente o processo mais empregado para a obtenção de biodiesel é a transesterificação química de óleos vegetais ou gordura animal com metanol ou etanol, na presença de catalisador alcalino (Knothe et al., 2006; Ma & Hanna, 1999; Marchetti et al., 2007; Pinto et al., 2005). Entretanto, o uso de catalisadores alcalinos apresenta alguns inconvenientes, como a dificuldade na recuperação do glicerol, a existência de reações competitivas e alta quantidade de água alcalina para ser tratada, pela necessidade de lavagem do biodiesel para remoção do catalisador (Royon et al., 2007; Zhang et al., 2003).

A reação de transesterificação pode ser realizada por rota química, supercrítica tecnologia de membranas, dentre outras, a enzimática (Atadashi et al., 2011; Cao et al., 2005; Han et al., 2005; Ma & Hanna, 1999). Na rota enzimática reações colaterais que levam à formação de produtos secundários indesejáveis raramente ocorrem, ou seja, o grau de especificidade para o substrato e formação de produto é normalmente alto. Ainda pela rota enzimática tem-se as vantagens de utilizar condições reacionais mais brandas, facilidade de recuperação do glicerol, facilidade de purificação dos ésteres obtidos, além de exigir recuperação do biocatalisador (Fallot & Girard, 2006; Knothe et al., 2006; Nie et al., 2006b; Pinto et al., 2005)

O maior problema dos processos catalisados pela rota enzimática é o alto custo das enzimas (Royon et al., 2007). Autores como, Chen e Wu, (2003), Shimada et al., (2002) Watanabe et al., (2002) dentre muitos outros afirmam que o custo das enzimas pode ser reduzido se essa for reutilizada em várias reações consecutivas sem perda da atividade. E a forma mais fácil de propiciar essa reutilização é imobilizando a enzima em matrizes que permitam a separação do biocatalisador imobilizado de forma eficiente como dentre muitas

outras a imobilização das lípases em resina acrílica (Royon et al., 2007); resina aniônica (Dossat et al., 1999; Soumanou & Bornscheuer, 2003) ou imobilizações comerciais como as Lipozyme® e Novozymes®.

A instabilidade das lípases também é apontada como uma desvantagem na aplicação dessas enzimas como catalisadores das reações de transesterificação. As lípases, como a maioria das enzimas sofrem inativação a temperaturas elevadas, no entanto é relatado na literatura reações de produção de éster com temperaturas relativamente elevadas, na faixa de 50 a 70 °C (Chen et al., 2009; Dizge & Keskinler, 2008; Verdugo et al., 2011).

Outra desvantagem das lípases é o efeito de inibição que pode ocorrer tanto pelo substrato quanto pelo produto da reação (Fernandes et al., 2007; Hama et al., 2007; Knothe et al., 2006; Royon et al., 2007; Vérias et al., 2011). A inibição ocorre por que os álcoois de cadeia curta e o gliceról tem a capacidade de formar uma camada hidrofílica na superfície da enzima que exclui o triacilgliceról do sítio ativo que pode diminuir a velocidade de reação ou até não permitir que a reação ocorra (Fu & Vasudevan, 2010; Hama et al., 2007; Tan et al., 2010; Vérias et al., 2011). A inibição da reação de produção dos ésteres etílicos por transesterificação dos triacilgliceróis de óleos vegetais pode ser evitada com a adição de cossolventes (Fernandes et al., 2007; Hama et al., 2007; Royon et al., 2007; Vérias et al., 2011). E acredita-se que o efeito do cossolvente possibilita a redução da tensão interfacial que surge na solução, principalmente pelo aumento da solubilidade do triacilgliceról e etanol (Li et al., 2006; Tan et al., 2010; Vérias et al., 2011).

A adição de cossolvente pode ser uma estratégia, mas exige que um processo para remoção desse do produto final seja incluído o que aumenta o custo do processo. Ainda o cossolvente potencializa a periculosidade do meio reacional e dos ambientes de produção o que não é nada interessante do ponto de vista operacional (Da Rós et al., 2010; Köse et al., 2002; Li et al., 2006; Liu et al., 2011).

Do ponto de vista de aplicabilidade da tecnologia é interessante utilizar razões molares o mais próxima da estequiométrica possível, enzimas imobilizadas e meios reacionais isentos de cossolvente a temperaturas próximas as do ambiente. Nessas configurações os custos do processo seria o mais reduzido possível. Mas quando se estuda o processo a fim de entender o fenômeno, meios reacionais complexos são necessários e justificáveis, pois a etapa de aplicação da tecnologia e redução de custos é uma etapa posterior ao desenvolvimento do processo.

2.4 Enzimas

Enzimas são capazes de catalisar os processos químicos mais complexos sob condições benignas experimental e ambientalmente. Desta forma, enzimas e células poderiam ser excelentes catalisadores para uma indústria química muito mais sustentável. No entanto, enzimas e células têm algumas limitações para aplicações em ambientes não biológicos (Guisan, 2006).

Como todas as proteínas, as enzimas são formadas por subunidades conhecidas como aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas. A composição dos aminoácidos e a sequência destes na cadeia geram interações intermoleculares que determinam características particulares de cada enzima e induzem a uma conformação tridimensional própria, essencial à atividade catalítica (Rosevear et al., 1987).

As enzimas são altamente específicas e apresentam elevado poder catalítico principalmente devido à presença de grupos polares, do tipo COOH, OH, NH₂, SH e CONH₂ (Vance & Vance, 2008). Essa elevada especificidade e poder catalítico são determinados pelo centro ativo, que pode ser definido como as partes da estrutura da enzima que atuam em contato direto com o substrato a ser transformado (Rosevear et al., 1987).

O centro ativo de uma enzima ou sítio ativo contém os radicais de aminoácidos, conhecidos como grupamentos catalíticos, os quais são responsáveis pela formação e ruptura de ligações. Em função da conformação tridimensional da molécula, os sítios ficam de uma forma espacial bem próxima, definindo assim uma estrutura tridimensional peculiar que confere às enzimas propriedades distintas e específicas (Forgaty & Kelly, 1990).

Uma grande vantagem das enzimas sobre os catalisadores químicos é sua alta especificidade ao substrato, o que pode levar a um rendimento maior na reação e com baixa formação de subprodutos. Ainda as vantagens da catálise enzimática para a produção de ésteres alquílicos simples incluem: a habilidade de esterificar o ácido graxo livre, bem como mono e diacilgliceróis, a produção de uma fração glicídica com teor mínimo de água e pouco ou nenhum material inorgânico contaminante.

As enzimas são biocatalisadores que apresentam diversas características que as tornam interessantes para a indústria, como a alta especificidade, a atuação em condições moderadas de temperatura e pressão, além de não causarem problemas ao meio ambiente. São

principalmente empregadas na indústria de alimentos, química, farmacêutica, detergentes e mais recentemente nas reações de transesterificação para a produção de biodiesel, com o emprego de lípases (Soares, 2004).

As desvantagens são que possuem alta sensibilidade às variações de temperatura e pH. Quando empregadas na forma livre, a separação do biocatalisador é uma das etapas mais difíceis do processo (Lima et al., 2004).

2.4.1 Lípases

Uma classe especial de enzimas são as lípases. As lípases constituem o grupo mais importante de biocatalisadores para aplicação biotecnológica, tanto pelo alto nível de produção das lípases microbianas quanto pela facilidade de melhoria das características por evolução dirigida (Jaeger & Eggert, 2002).

Além disso, aplicações biotecnológicas com sucesso de aplicação das lípases podem ser facilmente encontradas na produção de biopolímeros, biodiesel e produção de produtos farmacêuticos que exigem enantioseletividade, agroquímicos, e compostos do sabor (Jaeger & Eggert, 2002). Ainda, outra aplicação industrial em evolução das lípases está ligada à produção de diacilgliceróis para o consumo humano devido às melhores características desse composto graxo para a saúde.

Há aproximadamente um século o microbiologista C. Eijkmann relatou que várias bactérias poderiam produzir e secretar lípases (Jaeger & Eggert, 2002) e em 1980 os trabalhos comprovaram que essas enzimas eram estáveis em solventes orgânicos (Zaks & Klivanov, 1984). Deste ponto em diante as lípases tornaram-se especialmente importantes para a química orgânica, principalmente, por que normalmente apresentarem quimiosseletividade, regioseletividade e ésterosseletividade (Trevisan, 2004).

As lípases (acilglicerol acilhidrolase, EC.3.1.1.3) são classificadas como carboxilésterases, sendo que a nomenclatura sistemática ordena a classificação como hidrolases atuantes na hidrólise das ligações éster do triacilglicerol. Como apresentado pela nomenclatura sistemática, as lípases atuam na catálise da hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa, podendo atuar também em reações de esterificação em ambientes com restrição de água (Costa, 2009). Ainda, lípases não exigem cofator mesmo para a estabilização do sítio catalítico (Jaeger & Eggert, 2002).

Embora a função natural da lipase seja a de quebrar as ligações de éster de triacilglicerídeos com o consumo de moléculas de água, as lipases também são capazes de catalisar a reação reversa em condições micro - aquosa, como por exemplo, a formação de ésteres a partir de álcoois e ácidos carboxílicos. Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para efetuar reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes empregados (Paiva & Malcata, 1997; Yahya et al., 1998). Estas características ressaltaram a oportunidade de estudar a atuação dessa enzima na produção de ésteres etílicos, partindo se de triacilglicerídeos de origem vegetal.

As lipases são enzimas solúveis em água que catalisam reações hidrolíticas de triacilglicerídeos insolúveis. Elas atuam somente na interface óleo-água, não obedecendo, portanto, às equações de Michaelis-Menten para a cinética enzimática, uma vez que essas são válidas apenas para reações catalíticas que ocorrem em uma fase homogênea. Assim, as reações catalisadas por lipases são analisadas, em geral, utilizando-se o substrato lipídico sob a forma de emulsão (Jaeger et al., 1999; Oliveira, 2000).

As lipases foram definidas pelas suas características cinéticas em 1958, mas esses critérios não foram suficientes para classificar as lipases e então a classificação sistemática veio para fechar as lacunas mesmo que essa tentativa de classificação não propiciou o entendimento da atuação da enzima. Os autores utilizando como critério a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água formando uma emulsão de lipídeos e água determinaram que as lipases fossem ativadas na presença de ésteres emulsionados. Este fenômeno, chamado de ativação interfacial, foi explicado quando foram determinadas as estruturas tridimensionais de algumas lipases em que verificou, em algumas lipases. Assim verificou-se a existência de uma tampa hidrofóbica cobrindo o sítio ativo da enzima (Sarda & Desnuelle, 1958). Essa tampa hidrofóbica se move apenas quando encontra uma molécula hidrofóbica, como um lipídeo, o que expõe o sítio ativo e permite a catálise da reação (Aloulou et al., 2006). Do ponto de vista estrutural, existem evidências que a tampa hidrofóbica pode propiciar a atividade catalítica e determina a seletividade de algumas lipases (Secundo et al., 2006).

Alguns autores afirmam que a ativação interfacial ocorre após a ligação do substrato à enzima, pois existe uma alteração da conformação da enzima da forma fechada para a forma aberta, o que deixa o centro ativo acessível ao substrato. No momento em que o centro ativo

está acessível, uma grande superfície hidrofóbica fica exposta, o que facilita a ligação na interface (Fernandes, 2007; Jaeger & Eggert, 2002; Secundo et al., 2006).

As lípases de origem microbiana são muito estudadas devido à estabilidade e a ampla perspectiva de aplicação industrial, principalmente na indústria alimentícia, uma vez que permite maior controle e maior eficiência, o que é difícil de obter-se com lipases de outras fontes (Reed, 1975). Além disso, a produção de enzimas por microorganismos assegura um potencial ilimitado de suprimentos e ainda possibilita a criação de novos sistemas enzimáticos, o que não é possível obter em fontes animal e vegetal (Alves et al., 2002; Jesus et al., 1999).

Uma das limitações atuais para a utilização industrial extensiva das lípases de origem microbiana tem sido o custo para a sua obtenção, que é determinado pelo rendimento da produção, pelas condições do processo e pela estabilidade da enzima (Gonçalves, 2007).

Portanto, é interessante que se procure aumentar a produtividade dos processos fermentativos pelo emprego de novos microorganismos melhores produtores e pela otimização das condições de cultivo. Como a matéria-prima do meio de cultura contribui significativamente para o custo total da produção, a redução das quantidades de matérias-primas e o emprego de materiais mais baratos são estratégia adequada para aumentar a produtividade do processo (Dominguez et al., 2003).

Muitos microorganismos são conhecidos por produzir diferentes tipos de lipases de acordo com as condições de cultivo, tais como pH, composição do meio de cultura, temperatura e tempo de cultivo, além da ação da enzima em relação à especificidade do substrato (Hadeball, 1991).

Os fungos filamentosos são reconhecidos como sendo os melhores produtores de lipases (Cardenas et al., 2001). As espécies de fungos filamentosos maiores produtoras de lipase são pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Thermomyces* (Oliveira, 2000).

2.4.1.1 Lípase de *Burkholderia cepacia*

Burkholderia cepacia é um grupo de bactérias de pelo menos nove espécies estritamente relacionadas que despertam atenção devido ao seu grande potencial na aplicação

como biorremediadores e pela contaminação de hospitais em todo o mundo. Formalmente conhecida como *Pseudomas cepacia*, essa bactéria foi renomeada como *Burkholderia cepacia* em homenagem ao seu descobridor Walter Burkholder que em 1950 encontrou cepas dessas bactérias em cascas de cebola podre (Govan et al., 2010; Parke, 2000).

O bacilo da *Burkholderia cepacia* é um microorganismo gram-negativo que pode atingir tamanho de 1,6 a 3,2 micrometros, conforme apresentado na Figura 2. É um microorganismo aeróbico restrito e apresenta crescimento acelerado quando incubados à temperatura entre 30 e 35 °C. Pode ser encontrado no solo, na água, nas plantas e tem a capacidade de sobreviver por longos períodos em ambientes restritos de água ou mesmo secos (Govan et al., 2010; Steenhoek, 2000).

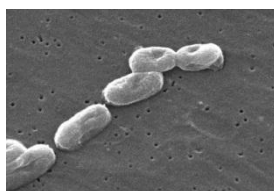


Figura 2: Micrografia eletrônica de varredura de *Burkholderia cepacia*. Original em: Imagem da Biblioteca de Saúde Pública - número de identificação #255 – Centro de Controle de Doenças e Prevenção 2010 – Créditos de Janice Carr.

Essa bactéria tem a capacidade de sofrer mutações rápidas, principalmente quando surge a necessidade de adaptar-se a um ambiente carregado de antibiótico. Algumas cepas apresentam crescimento em meio de penicilina. Essa capacidade de adaptação é proveniente principalmente de seu genoma extraordinariamente grande (Steenhoek, 2000).

Burkholderia cepacia pode apresentar-se como microorganismos patogênicos em plantas, animais e também no homem. O bacilo possui aplicação no uso para remediação biológica por apresentar a capacidade de catalisar a produção de antibióticos contra fungos patogênicos de plantas. Esses antibióticos atóxicos podem ser utilizados diretamente no solo ou na água sem danos sérios ao meio ambiente. Bacilos da família *Burkholderia cepacia* tem a capacidade de metabolizar quase tudo o que é disponível, inclusive hidrocarbonetos clorados. Assim, é possível utilizar esses bacilos para descontaminação de solos altamente contaminados por pesticidas, óleos e petróleos entre outros compostos (Steenhoek, 2000).

As enzimas geralmente reproduzem características dos microorganismos que as produzem. Dessa forma, é de se esperar que a lipase de *Burkholderia cepacia* apresente boa resistência a compostos orgânicos, pois é um ambiente favorável ao desenvolvimento do

bacilo que a produz. É importante chamar a atenção para a grande capacidade de adaptação do micro-organismo o que propicia o desenvolvimento de lípases mais seletivas ao produto de interesse utilizando a técnica de mutação dirigida (Jaeger & Eggert, 2002).

2.4.1.2 Lípase de *Thermomyces lanuginosus*

Os fungos da espécie *Thermomyces lanuginosus* crescem rapidamente em meios de ágar quando incubado a 45-50 °C. Esses fungos formam colônias com textura aveludadas, conforme pode ser vista na Figura 3. Essas colônias são inicialmente de cor branca, mas podem escurecer até cor cinza esverdeada, preta ou arroxeadada. As hifas vegetativas são septadas e podem medir de 2 a 4 micrometros de diâmetro. A temperatura ótima de crescimento do fungo de *Thermomyces lanuginosus* está entre 48 e 52°C, mas pode ser cultivado em temperaturas que variam 30-55°C. Este fungo termofílico pode tolerar exposição breve a temperaturas acima de 68°C e seus esporos podem sobreviver a fervura por até 5 minutos. Os fungos *Thermomyces lanuginosus* são frequentemente encontrados em solos orgânicos, matéria vegetal em decomposição, compostos e excrementos de animais. Não podem utilizar de celulose ou carboximetilcelulose como fonte de carbono ou nutriente, mas podem crescer em sinergia com fungos termofílicos que são capazes de degradar essas substâncias (<http://fungalgenomics.concordia.ca/fungi/Tlan.php>. Acesso em 07/12/2011).

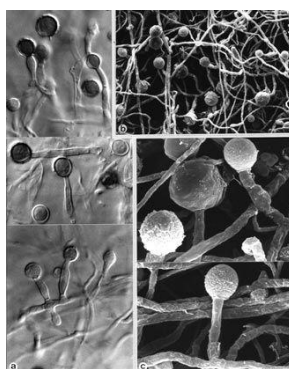


Figura 3: Microfotografia de *Thermomyces lanuginosus* com ampliação de a. x1600; b. x1350; c. x5500. Original in: Hoog, G.S. de 2000, Atlas of Clinical Fungi, ed. 2: 1-1126.

É de se esperar que a característica do micro-organismo produtor seja transferida para a enzima, como dito anteriormente, de forma que essa lípase tem potencial em apresentar características de boa resistência à temperatura e em meios orgânicos, visto que esse é um habitat propício ao crescimento desse fungo. Algumas características dessa enzima são

descritas por Fernandes et al. (2004), que descrevem que essa enzima mantém atividade em temperatura e pH elevados.

A Lípase de *Thermomyces lanuginosus*, anteriormente classificada por *Humicola lanuginosa*, é responsável pela atividade lipolítica da Lipolase® a preparação comercial da Novozymes, que apresenta importante aplicação industrial. Em meios aquosos, essa enzima é muito estável, mantendo sua atividade em uma faixa de pH de 7 a 11, que para enzimas é extensa. Essa enzima também mantém razoavelmente bem sua atividade em temperaturas de 55 a 60°C, mesmo que a temperatura recomendada de para aplicações seja entre 30 e 40°C (Fernandes et al., 2004).

2.5 Nabo Forrageiro

O nabo forrageiro, cientificamente denominado *Raphanus sativus L.* pertence à família das *Brassicaceae*, anteriormente denominada *Cruciferae*. Essa família pertencente à ordem *Brassicales*, que esta inserida na classe *Magnoliopsida* e divisão *Magnoliophyta* do reino *Plantae*.

Os indivíduos pertencentes à família das *Brassicaceae*, são de grande importância para a alimentação dos seres vivos e produção de óleos e gorduras vegetais. Esta família está entre as espécies mais antigas usadas para a produção de óleo vegetal, sendo cultivada principalmente na Ásia Oriental. Dentre os indivíduos dessa família os mais conhecidos são agrião, repolho, rabanete e mostarda. Em especial o nabo forrageiro não pode ser usado para alimentação humana (Valle et al., 2009). No entanto alguns autores indica o potencial de uso do farelo desengordurado como fonte de alimentação de ruminantes, principalmente pelo alto teor de óleo ainda presente nesse farelo depois da extração por prensagem (Silva et al., 2005).

O nabo forrageiro apresenta crescimento rápido e muito vigoroso. Aos 60 dias após o plantio, 70% do solo é encoberto por folhas e galhos densos, aos 80 dias ocorre o florescimento e aos 120 dias apresenta crescimento pleno, podendo atingir até 1,8 metros (Sementes, 2010). O caule ereto apresenta muitos galhos dotados de pelos ásperos e muitas folhas que variam de 12 a 15 centímetros de comprimento do eixo central. As flores ocorrem nos terminais dos galhos e são de cor branca ou roxa na mesma planta, às vezes de matriz branca e cor lilás ou vice versa, apresentando quatro pétalas.

Devido ao crescimento rápido, vigoroso e denso compete com ervas daninhas desde o início de germinação, que pode ser útil no controle de pragas e cobertura do solo, diminuindo assim o uso de agrotóxicos. Por apresentar tolerância a baixas temperaturas (geadas) e bom desenvolvimento em solos relativamente pobres e ácidos, esta cultura tem sido muito empregada nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, como adubo verde de inverno e planta de cobertura, para proteger o solo (Tomm et al., 2005).

O nabo forrageiro vem sendo considerado como a uma fonte de óleo interessante para a produção de biodiesel, principalmente por sua alta quantidade de óleo nas sementes e relativa facilidade de extração por prensagem a frio. A produção das sementes e quantidade de óleo é de aproximadamente 1200 kg/ha sendo que até 40 % da massa das sementes é óleo.

O valor do índice de iodo, que representa a quantidade de insaturações das cadeias carbônicas dos triacilglicerídeos, é mais baixo para o óleo de nabo forrageiro em comparação com os outros óleos. Outra vantagem apresentada pelo óleo de nabo forrageiro é o ponto de fulgor mais alto em comparação com os óleos de soja e girassol, o que indica que este óleo se torna inflamável sob uma temperatura mais elevada e, portanto, é mais seguro no transporte, armazenamento e manuseio (Dambiski, 2007).

O óleo de nabo forrageiro foi utilizado como matéria prima para a produção de biodiesel por Domingos *et al.* (2007). Os autores afirmam que esse óleo não está sendo amplamente investigado para a produção de biodiesel principalmente quando se utiliza etanol e encontraram, na condição ótima, rendimento em éster de 99%. Ávila e Sodré (2012) verificaram as propriedades físico-químicas do biodiesel originário de nabo forrageiro e identificaram características compatíveis com as características exigidas.

2.6 Canola

A canola, cientificamente denominada *Brassica napus L. var oleífera* é uma oleaginosa pertencente à família das crucíferas do gênero *Brassica*. Essa família também abriga indivíduos como o repolho e a couve, conforme apresentada anteriormente.

A canola é uma crucífera que possui de 45 a 50% de óleo no grão e de 34 a 38% de proteína no farelo. É uma planta herbácea anual, com raiz pivotante e grande número de raízes secundárias fasciculadas. A haste central da planta é ereta, ascendente e ramificada podendo alcançar altura superior a 1,5 metros. Os órgãos reprodutores são formados de um pistilo e

quatro estames longos e dois curtos, sendo estes últimos estéreis. A floração efetua-se de baixo para cima, desabrochando-se primeiro os botões florais da base que provocam um dos maiores problemas da plantação de canola, pois quando maduras, as síliquas se abrem e as sementes caem no solo provocando grande desperdício de grãos (Coedeiro et al., 1999).

O nome canola é um termo genérico internacional e não uma marca registrada industrialmente, como era antes de 1986. A descrição oficial para a canola é um óleo com menos de 2% de ácido erúico e menos de 30 micromoles de glucosinolatos por grama de matéria seca da semente (Canada, 2011). O nome canola surgiu do acrônimo Canadian Oil of Low Acid, em referência às mudanças genéticas aplicadas à colza no intuito de diminuir a concentração do ácido erucico que é prejudicial à saúde humana (Canada, 2011); Voll, 2011; TOMM, 2007).

O óleo de canola é considerado um alimento muito saudável, pois apresenta elevadas quantidades de ômega-3, que reduz triacilglicerídeos do sangue e controla a arteriosclerose, a vitamina E, gorduras mono-insaturadas e possui o menor teor de gordura saturada de todos os óleos vegetais. Médicos e nutricionistas indicam o óleo de canola como o de melhor composição em ácidos graxos (Tomm, 2007a).

O óleo de canola é o mais utilizado na Europa para produção de biodiesel e constitui padrão de referência naquele mercado. As sementes podem produzir até 38% de óleo sem dificuldade de extração, principalmente por que muitas indústrias possuem plantas de extração, mesmo que a extração possa ser realizada por prensagem helicoidal (Tomm, 2007b).

2.7 Quantificação dos Ésteres Etilícos e Produtos da Reação de Transesterificação.

Triacilglicerídeos estão presentes nos óleos vegetais e os métodos de análises vem atraindo a atenção nas últimas décadas devido às suas múltiplas aplicações. Muitos trabalhos relatam o uso de análises cromatográficas para quantificar os triacilglicerídeos (Lee et al., 2001).

A quantificação dos reagentes e produtos da reação de transesterificação pode ser realizada por uma grande quantidade de métodos. No entanto poucas delas possibilitam a separação e quantificação de todos os compostos em uma mesma análise. Nesse caso etapas de preparações laboratoriais anteriores devem ser incluídas e podem acrescentar incertezas,

imprecisões e gastos adicionais (Holčapek et al., 1999; Holčapek et al., 2003; Lee et al., 2001).

Em uma mesma amostra de óleos é possível encontrar ácidos graxos, gliceróis, tri, di, monoacilgliceróis e ésteres. Para analisar compostos separadamente as quantidades de técnicas aumentam consideravelmente. Mas o grande interesse é analisar todos os compostos e quantificá-los em uma mesma corrida. Dessa forma é possível realizar essas análises com equipamentos como cromatografia em fase líquida, Cromatografia em fase gasosa, Ressonância Magnética Nuclear, dentre algumas outras.

A cromatografia em fase líquida e ou em fase gasosa estão fundamentadas numa interação físico-química entre os compostos presentes na amostra, coluna e fase móvel. Essas interações são diferentes devido à estrutura dos compostos e propiciam a separação, que, então são quantificadas por um detector específico. Essa técnica consiste na separação dos compostos com posterior quantificação.

Nesse trabalho, as cromatografias de interesse são a cromatografia a gás e a cromatografia em fase líquida de alta eficiência. Estas, dentre todas as outras, são as mais indicadas para a caracterização e quantificação de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos (Holčapek et al., 1999; Visentainer & Franco, 2006). As duas possuem características importantes, mas também apresentam divergências que devem ser consideradas e serão contempladas nesse trabalho.

2.7.1 Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência.

A cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) ou em inglês High Performance/Pressure Liquid Chromatograph (HPLC) é uma técnica cromatográfica em que a coluna de separação dos compostos possui tamanho muito reduzido, em que a fase estacionária é formada por partículas de tamanho da ordem de micrômetros e é permeada por uma fase móvel em alta pressão e velocidade (Collins et al., 2006; Skoog et al., 2002).

O uso de pressões elevadas permite o uso de uma fase estacionária com diâmetro de partícula muito pequenos, o que resulta diretamente em maior área superficial e mais sítios de adsorção de compostos, o que promove uma separação mais eficiente dos componentes da amostra. Essa separação eficiente é denominada resolução de separação ou resolução da

coluna. Ainda, essa miniaturização das partículas permite o uso de colunas, volumes de amostras e gasto de fase móvel muito pequeno.

A miniaturização do diâmetro da coluna, na prática representa um aumento no número de pratos teóricos que esta diretamente relacionado com o aumento da altura dos picos e diminuição das bandas. A diminuição da banda significa que mais picos em um mesmo espaço de tempo possam vir a aparecer, ou seja, melhor eficiência de separação sem que a precisão ou o nível de detecção seja prejudicado. Cabe lembrar que uma banda larga pode ser desprezada num cromatograma, mas um pico fino e estreito não será desprezado (Freitas, 2011).

Um cromatógrafo em fase líquida é constituído basicamente por cinco sistemas, sendo eles, um reservatório e sistema de bombeamento de fase móvel, um sistema de introdução de amostras, um sistema analítico, um sistema de detecção e um sistema de controle, registro e tratamento de dados.

O sistema analítico é o coração do equipamento, pois nas colunas cromatográficas é que se realizam a separação eficiente dos compostos presentes na amostra. Quanto melhor a coluna cromatográfica, maior será a resolução dos cromatogramas. A coluna cromatográfica é feita de um material inerte que resiste a todas as pressões em que ela será usada. A capacidade da coluna é determinada pelo comprimento, diâmetro e pelo material de recheio. As colunas geralmente utilizadas para qualquer processo de separação são: octadecil (C18, RP18, ODS), octil (C8, RP8), CN (cianopropil) e NH₂ (amina) (Peres, 2002). As octadecil ou colunas de fase reversa são as mais utilizadas para análise de óleos e gorduras.

Os detectores mais utilizados na cromatografia em fase líquida são os fotométricos, baseados na absorbância no ultravioleta e no visível. Os detectores de fluorescência são utilizados como método de detecção específica sendo sensíveis para substâncias que fluorescem. Este tipo de detector pode detectar quantidades de ordem de picograma. Também são utilizados detectores por índice de refração, os quais acompanham continuamente a diferença no índice de refração entre a fase móvel pura e o efluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra. A resposta deste detector é moderada, geralmente, de ordem de micrograma (Peres, 2002). Existe ainda o detector evaporativo de dispersão da luz, basicamente todos os compostos que são menos voláteis do que a fase móvel podem ser detectados, sendo baseada em uma propriedade universal de todos os analitos e não requer a

presença de qualquer grupo cromóforo ou grupo eletroativo. A resposta do detector é diretamente relacionada à massa do composto eluído e por isso, fornece fatores de resposta similar para moléculas com estruturas próximas. Isso é muito conveniente para simplificar os procedimentos de quantificação ou para torná-los possíveis quando as normas não estão disponíveis comercialmente (2011).

2.7.2 Cromatografia em Fase Gasosa

A cromatografia a gás ou também chamada cromatografia de partição líquido vapor é uma técnica cromatográfica bastante parecida com a CLAE, porém, com diferenças que a tornam bastante particular. Uma delas é o mecanismo de separação que está baseado na partição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida (Visentainer & Franco, 2006).

A cromatografia em fase gasosa possui um alto poder de resolução, o que permite analisar várias substâncias em uma mesma amostra. É muito atrativa devido à possibilidade de detecção em escala de nano a pictogramas, dependendo do tipo de analito e do detector empregado. No entanto, a grande limitação deste método é a necessidade de que a amostra seja volátil ou estável a altas temperaturas, embora amostras não voláteis ou instáveis ainda possam ser derivadas quimicamente para adquirirem essas características (Collins et al., 2006).

Um cromatógrafo a gás possui os mesmo sistemas que um cromatógrafo a líquido, mas com diferenças proeminentes. A primeira e mais marcante diferença está na fase móvel, que, nesse caso, é um gás inerte em relação à amostra e é chamado mais comumente de gás de arraste. A fase estacionária da cromatografia em fase gasosa é um material, líquido ou sólido, que propicia a separação da mistura por processos físicos e químicos. A fase estacionária líquida é um líquido pouco volátil que recobre um suporte sólido, separando as substâncias presentes na amostra através das diferenças de solubilidade e volatilidade. Os gases mais comumente utilizados são helio, nitrogênio, hidrogênio ou argônio (Visentainer & Franco, 2006).

O sistema analítico ou a coluna apresenta também algumas diferenças. As colunas são tubos longos de metais como aço, cobre, níquel ou ainda de vidro ou teflon. De acordo com o aparelho, as colunas variam de formato, mas na maioria das vezes elas são espirais para

minimização de espaços. O comprimento e o diâmetro da coluna a ser usada irão depender do material a ser analisado (Skoog et al., 2002).

As colunas recheadas analíticas possuem diâmetro interno de cerca de 1,0 a 4,0 mm e comprimento de 1,0 a 3,0 m, enquanto as colunas recheadas preparativas apresentam diâmetro interno de 5,0 a 100,0 mm, possibilitando a injeção de maior volume de amostra. Já, as colunas capilares têm diâmetro variando de 0,15 a 0,75 mm e comprimento de 10,0 a 100,0 m, sendo as mais utilizadas as de sílica fundida, pois esta é altamente inerte e flexível (Freitas, 2011).

Os detectores são dispositivos que transformam as variações na composição do gás de arraste em sinais elétricos. Existem diferentes tipos de detectores como o detector de condutividade térmica, de ionização de chama, de captura de elétrons, fotométrico de chama, dentre outros.

2.7.3 Cromatografia em Fase Líquida x Cromatografia em Fase Gasosa

O principal intuito de utilização dessas técnicas, nesse trabalho, é a possibilidade de acompanhamento da conversão do óleo de canola e nabo forrageiro em ésteres. A análise, quantificação e classificação dos triacilglicerídeos presentes nos óleos dos mais variados tipos vem atraindo a atenção, tanto pela necessidade de monitoramento da produção de biodiesel (Di Nicola et al., 2008; Holčapek et al., 1999), quanto pelo interesse de detecção de adulteração de óleos comestíveis (Fasciotti & Pereira Netto, 2010; Lee et al., 2001) e ainda pelo interesse do efeito dos óleos na saúde humana (Visentainer & Franco, 2006).

A análise de triacilglicerídeos e outros produtos pode ser realizada por cromatografia, no entanto, a instabilidade à temperatura dos triacilglicerídeos saturados é o maior problema nas análises por cromatografia em fase gasosa. A maior vantagem em utilizar a cromatografia em fase líquida está na não necessidade de derivação dos triacilglicerídeos, mesmo que triacilglicerídeos de alta massa molar possam apresentar dificuldades de eluição (Lee et al., 2001).

A cromatografia em fase líquida de alta eficiência foi utilizada para identificar adulteração de óleo de Sesame com óleo de Perila. Lee *et al.* (2001) relatam que a presença de dois acilgliceróis é a chave para esse monitoramento. Em um óleo puro de Sesame, a relação de composição desses dois compostos é um valor muito baixo e pode ser quantificado, no

entanto, quando o óleo de Perila é adicionado, esse valor cresce drasticamente. Os autores ainda acrescentam que valores de mistura desse óleo, da ordem de 5%, podem ser identificados e reforçam que essa é uma técnica poderosa para identificar esse tipo de fraude.

Seguindo na mesma linha Fasciotti & Pereira (2010) caracterizaram a adulteração de óleo de oliva por óleo de soja. De acordo com os autores, foi possível identificar a adulteração do óleo de oliva por óleo de soja ou qualquer outro óleo por aplicação de um simples método de análise em cromatografia em fase líquida de alta eficiência. Isso foi possível por que alguns triacilglicerídeos presentes no óleo de soja não são encontrados no óleo de oliva. Esses trabalhos demonstram o potencial de aplicação das análises por CLAE (Fasciotti & Pereira Netto, 2010).

Já a cromatografia em fase gasosa é uma das principais e mais utilizadas técnicas de identificação de derivados de ácidos graxos. O uso de colunas capilares de sílica fundida é possível identificar um número muito grande de ácidos graxos presentes nos alimentos e, com isso saber a qualidade da gordura de certos alimentos (Visentainer & Franco, 2006).

A grande desvantagem da cromatografia em fase gasosa em relação a líquida é a necessidade de utilização de altas temperaturas para a volatilização da amostra, requisito que não é necessário em uma análise de cromatografia em fase líquida, pois nesse caso a amostra é eluída na fase móvel. A utilização de altas temperaturas exige a garantia de que o analito não seja degradado com a temperatura no decorrer da separação e análise e para que isso não ocorra, uma derivação é necessária.

A derivação consiste em reagir a molécula de interesse na análise com certos compostos a fim de formar uma molécula mais estável, evitando a degradação dessa molécula no decorrer da análise. A derivação causa um acréscimo de tempo nas análises e, ainda, necessidade de preparação de amostra em laboratório. A cromatografia em fase gasosa pode ser usada para determinação de éster metílico, mas é menos conveniente para a análise de compostos não voláteis como os acilgliceróis, a menos que esses compostos sejam derivados antes da análise por reações com o metanol ou acetato (Holčapek et al., 1999).

As reações de derivação são uma estratégia importante para a identificação dos ácidos graxos ou acilgliceróis, porém, especificamente para a determinação de tri, di, monoacilgliceróis é de suma importância que se possa quantificar exatamente a concentração

de cada um, o que não é possível com a derivação, visto que todos essas estruturas são transformadas em ésteres desses respectivos compostos (Visentainer & Franco, 2006).

É possível a determinação de acilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis por cromatografia em fase gasosa, no entanto as condições de operação são muito drásticas. A determinação dos acilgliceróis sem derivação exige que a análise ocorra em uma temperatura muito alta, em torno de 350°C e uma coluna capilar curta com grande estabilidade nessa faixa de temperatura (Holčapek et al., 1999). No entanto, essa análise ainda poderia não ser confiável, devido à instabilidade de compostos insaturados de acilgliceról a essa temperatura (Lee et al., 2001). É importante lembrar que análises de compostos a temperaturas na faixa de 350°C propiciam queda acentuada na vida útil das colunas cromatográficas.

A análise em cromatografia em fase líquida, resolve esses problemas, mas existem grandes dificuldades inerentes à potencialidade do uso dessa modalidade de análise sendo esta ligada com a diversidade de configurações que podem ser alcançadas. No cromatógrafo em fase líquida é possível variar temperatura, fase móvel, gradiente de fase móvel, comprimento e diâmetro da coluna, tipo de recheio e diâmetro de partícula, fluxo de fase móvel enquanto que na cromatografia em fase gasosa as possibilidades de configurações são reduzidas para tipo, tamanho da coluna e temperatura da análise (Ledoux et al., 2000).

Uma desvantagem que surge da alta eficiência da cromatografia em fase líquida de alta eficiência é a quantidade de informações que pode aparecer num cromatograma, visto que uma amostra de biodiesel pode conter muitos compostos, pois esse equipamento pode, dependendo do método, separar até 100 substâncias diferentes (Jin et al., 2007). O que parece ser um fator interessante pode vir a causar problemas, pois caso algumas dessas substâncias venham a coeluir, podem gerar confusão e análise errada dos resultados.

2.8 Análise e Quantificação dos Ésteres Metílicos e Produtos da Reação de Transesterificação por Cromatografia em Fase Líquida.

Os métodos de operação de um cromatógrafo a líquido são a chave para o processo de separação. Os mais comuns são os métodos gradiente ou isocráticos. O método isocrático é um método em que um solvente ou uma mistura deste é usado, no entanto, a concentração da mistura não varia durante o período de análise. Da mesma forma, as variáveis que podem ser manipulada são restritas e os fatores devem permanecer constantes por todo o período. O

método gradiente é aquele em que a concentração, vazão ou qualquer variável do processo de análise pode mudar durante a análise. Esse método é mais sensível e exige equipamentos mais completos e sofisticados. O método gradiente não aquoso de fase reversa tornou-se uma técnica importante para a separação dos triacilglicerídeos, como também o isocrático e gradiente de eluição (Holčapek et al., 1999).

Com o CLAE é possível realizar análises de todos os componentes do biodiesel sem necessidade de derivação. Isso por que a separação dos componentes da amostra é realizado por interação entre as fases sólida e líquida, não necessitando de mudanças de fase.

Mesmo que os acilgliceróis e ésteres de etila não absorvam em comprimentos de ondas maiores que 220nm. Varias técnicas de detecção vem sendo empregadas para a determinação dos triacilglicerídeos para substituir os detectores de UV (Holčapek et al., 1999).

Dois métodos de análise de CLAE foram desenvolvidos e testados com o intuito de separar triacilglicerídeos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ésteres metílicos com volume de injeção igual a 10 μ L, vazão de solvente 1 mL/min e temperatura de 40°C, o método 1, linear não aquoso de fase reversa e constituído por três solventes, metanol e uma solução de 2-propanol e hexano numa relação volumétrica de 5:4. O gradiente linear foi realizado de forma que no início da análise 100% de metanol esteja presente e com 15 minutos 50% de metanol e 50% da solução de solvente ocorram (Holčapek et al., 1999).

O método 2, constituído de 3 solventes, sendo eles a água, acetonitrila e uma mistura de 2-propanol e hexano nas mesmas proporções do método 1. O gradiente ternário de 25 minutos utilizando dois gradientes lineares foi empregado e chamado de gradiente combinado aquoso orgânico não aquoso. O método consiste em 30% de água + 70% de acetonitrila no início da análise, em 10 minutos 100% de acetonitrila e 50% de acetonitrila + 50% da solução de 2-propanol e hexano em 20 minutos, sendo que os 5 minutos restantes necessários para o restabelecimento das condições iniciais.

Holčapek et al., (1999) concluíram que o método não aquoso de fase reversa (método 1) teve a capacidade de separar e de determinar os ésteres e os triacilglicerídeos presentes na amostra de biodiesel. O método gradiente combinado aquoso orgânico não aquoso (método 2) apresentou melhor resolução e, ainda, mostrou que os ácidos graxos, ésteres de metila, mono,

di, triacilglicerídeos e glicerina são eluídos em ordem de tamanho de cadeia em uma mesma corrida. Os autores ainda afirmam que a detecção a 205nm com UV é mais eficiente que a detecção por espalhamento evaporativo da luz, pois esse método não apresenta alta faixa de linearidade entre a concentração e a unidade de medida.

Um método isocrático para a separação e análise dos triacilglicerídeos presentes em amostras de óleo de Sesame foi utilizado por Lee *et al* (2001). O método consistia em uma fase móvel de 50% de acetonitrila e 50% de acetona utilizando um fluxo de 0,5 mL/min e a coluna a 30°C. Os autores conseguiram a separação dos triacilglicerídeos com bastante eficiência e resolução, sendo possível identificar os diferentes triacilglicerídeos presentes pelo número equivalente de carbonos. Ainda é interessante relatar que o método foi utilizado para identificar a adulteração do óleo, sendo que é possível identificar uma adulteração de até 5% (Lee et al., 2001).

Um gradiente binário como método de análise de biodiesel usando fase reversa não aquosa com detecção por UV foi proposto por Di Nicola *et al.* (2008). Para desenvolver esse método os autores utilizaram de um método de análise sensitiva estatística aplicando um planejamento experimental 2^5 . Os fatores analisados foram vazão de solvente, tempo de início do gradiente linear, tempo do gradiente linear, composição da fase móvel acetonitrila/metanol (4:1,v/v) na segunda parte do método de eluição e a proporção de mistura entre hexano e isopropanol da fase móvel de eluição, variando esses fatores por dois níveis. Os efeitos observados foram o número de picos, a resolução desses picos e o tempo de retenção, sendo que o tempo das análises não poderia ser superior a 40 minutos (Di Nicola et al., 2008). Analisando os resultados, foi possível determinar que o melhor método para análise é o método de gradiente linear que consiste em operação isocrática de 100% de uma solução acetonitrila/metanol numa proporção 4:1 em volume até 2,2 minutos, seguida por um gradiente linear de 34% de solução acetonitrila/metanol numa proporção 4:1 em volume e 66% de solução de Isopropanol/hexano numa razão 8:5 em volume e seguindo com essa eluição isocrática até 30 minutos. Os autores concluem que esse método é bastante eficiente para a separação dos compostos de uma amostra de biodiesel e reforçam que o planejamento experimental foi uma ferramenta muito importante para a otimização desse método.

A quantificação dos produtos da reação pode ser realizada por uma variedade de métodos, dentre eles se destaca, o método de normatização, o de normatização corrigida, padronização externa e padronização interna.

Os métodos de normatização e normatização corrigida usam as áreas de resposta do detector para quantificar a quantidade de material graxo na amostra. Esses métodos baseiam-se na porcentagem de área relativa de um determinado ácido graxo em relação à área total de todos os ácidos graxos que foram detectado. Para a normatização corrigida, um fator de correção é usado, principalmente, devido às diferentes respostas do detector para compostos graxos de cadeias diferentes (Visentainer & Franco, 2006).

Nos últimos anos o uso de padrão interno tem sido empregado na análise de ácidos graxos, pois desta forma é possível expressar os resultados em massa, diferentemente da técnica de normalização, que ainda é muito utilizada, mas que apresenta sérias restrições. Dentre elas é possível destacar a necessidade de eluição e detecção de todos os componentes da amostra (Visentainer & Franco, 2006).

O método da adição de padrão interno apresenta como principais vantagens para a análise quantitativa de ácidos graxos, a possibilidade da utilização de fatores de correção, o que possibilita a expressão dos resultados em massa e não em porcentagem de ésteres metílicos de ácidos graxos. Somando-se a isso este método é menos sensível a erros e variações de equipamento, uma vez que a amostra e o padrão são injetados juntos (Ackman & Sipos, 1964).

Para que o padrão interno possa ser empregado é necessário que cumpra alguns requisitos básicos como não estar presente na amostra, apresentar alto grau de pureza, ser acessível e de baixo custo, além de não coeluir com componentes da amostra, mas ao mesmo tempo eluir próximos a eles (Visentainer & Franco, 2006).

A padronização externa é baseada na construção de uma curva que servirá de base para determinação da quantidade do composto presente na amostra. Para essa curva é dado o nome de curva de calibração, que consiste na preparação de diversas soluções padrões de concentrações diferentes de um determinado composto. Essas soluções padrão são, então, submetidas a análise no cromatógrafo. Dessa forma é construído um gráfico da área respondida pelo cromatógrafo em função da concentração da amostra submetida á análise. Essa a curva de calibração faz a ligação entre a quantidade de analito na amostra em função da área do pico referente a essa amostra. Esse método de padronização é bastante confiável, desde que alguns cuidados sejam tomados, como por exemplo, o uso de válvulas de injeção,

utilização de padrões extremamente puros e constante verificação da curva, além de certificar-se de que a mesma quantidade de amostra seja sempre injetada (Visentainer & Franco, 2006).

2.9 Delineamento Fatorial

O planejamento experimental ou delineamento fatorial é uma das ferramentas importantes a serem empregadas para otimizar processos, sendo esta uma tarefa que deve preceder a execução dos experimentos. Considerada muito importante na atividade estatística, pode ser usada no desenvolvimento de uma pesquisa experimental, num trabalho em que pouca ou nenhuma informação sobre o sistema em estudo é conhecido e até na otimização de variáveis de um processo bastante consolidado. Essas respostas podem ser obtidas por meio de sucessivas aplicações dessa técnica (Montgomery, 2005; Neto et al., 2003).

Experimentos delineados em esquemas fatoriais são aqueles que envolvem combinações experimentais entre níveis pré-determinados de dois ou mais fatores, sendo que os fatores são variáveis independentes que devem ser escolhidas e priorizadas como as mais importantes para o processo ao qual se deseja investigar, aperfeiçoar.

O propósito do delineamento fatorial é determinar efeitos das variáveis de processo ou interações dessas variáveis, o que torna o processo de otimização mais eficiente. Montgomery (2005), afirma ser possível por que o planejamento fatorial cobre uma ampla faixa dos resultados, pois o planejamento explora a interação das variáveis, já na execução dos experimentos, o que é difícil de obter quando se manipula uma variável por vez, mantendo-se as outras envolvidas no processo fixas.

Num delineamento inteiramente casualizado, com dois fatores, cada qual com dois níveis, o superior representado por (+1) e outro inferior representado por (-1) obtém-se quatro combinações de tratamentos ou ensaios. Então se k for o número de fatores e n os níveis dos fatores investigados, para um fatorial completo tem-se N^k ensaios (Rodrigues, 2009).

O conhecimento técnico do processo é necessário devido à necessidade de determinar as variáveis mais importantes antes mesmo de planejar o delineamento, visto que uma investigação completa de todas as variáveis envolvidas torna o planejamento demasiadamente longo, trabalhoso, cansativo e não conclusivo. Um delineamento completo, sem conhecimento prévio, é inapropriado porque o crescimento da quantidade de experimentos em função dos

fatores (variáveis) é exponencial tornando essa ferramenta desmotivadora para estudos de processos com mais de cinco fatores de interesse (Rodrigues, 2009).

Para esses casos recomendasse um delineamento fatorial fracionário, em que o número de experimentos pode ser reduzido consideravelmente. Nesse caso, a precisão é comprometida, no entanto, é possível eliminar uma boa quantidade de variáveis que não apresentam qualquer influência significativa. Então um delineamento completo pode ser investigado para obter respostas mais apropriadas.

A superfície de resposta é importante por que descreve de forma clara e objetiva os resultados obtidos no planejamento, os efeitos da interação das variáveis e ainda apresentam a possibilidade de prever resultados de condições difíceis ou impossíveis de serem executadas na prática.

A metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta é uma ferramenta eficaz e indispensável tanto para o desenvolvimento de processos e produtos como para o melhoramento dos já existentes. (Rodrigues, 2009) afirma que a técnicas de tentativa e erro são consideradas ultrapassadas principalmente por que exigirem gasto excessivo de tempo e material e nem sempre ser possível alcançar as condições otimizadas com confiabilidade nas respostas obtidas. (Costa Neto 2002; Neto et al., 2003) completam afirmando que o desenvolvimento de pesquisas experimentais com muitas variáveis pode ser obtido através de sucessivas aplicações de técnicas estatísticas de planejamento fatorial, planejamento experimental e superfície de respostas.

3 Materiais e Métodos

3.1 Reagentes e Substratos

A enzima lipase de *Burkholderia cepacia* e *Thermomyces lanuginosus* foram adquiridas da Sigma Co, St. Louis, MO, EUA. O azeite de oliva utilizado foi o comercial da marca Carbonell. O butirato de metila, ácido butírico, álcool 2-fenético, acetato de vinila, 2-fenetil acetato, peneira molecular tipo 13 X-BHD, éster diisopropílico e a etalonamina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical. O etanol absoluto P.A. empregado foi da marca Cinética, Brasil. O ácido clorídrico, o hidróxido de amônio, a goma arábica e o ácido o-

fosfórico foram adquiridos da Synth, Brasil. O cetil-trimetil-amonio-bromido (CTMABr) utilizado foi da Acros Organics. Os reagentes utilizados em CLAE foram o n-hexano, o álcool n-propílico (Mallinckrodt Chemicals) e a acetonitrila (J.T. Baker). Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

O óleo de nabo forrageiro extraído por prensagem mecânica foi gentilmente cedido pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAPAR) por intermédio do pesquisador Paulo Roberto Abreu de Figueiredo em Londrina e o óleo de canola foi comprado em um mercado local com características de óleo refinado.

3.2 Métodos

3.2.1 Índice de Acidez

A determinação da acidez pode fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons hidrogênio. As reações de oxidação dos glicerídeos são aceleradas por aquecimento e presença de luz. A rancidez, por exemplo é amplamente conhecida como uma característica dos óleos e quase sempre é acompanhada pela formação de ácidos graxos livres (Adolfo Lutz, 2008).

O índice de acidez dos óleos foi determinado de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Para esta determinação, em um Erlenmeyer pesaram 2,0g da amostra, seguida da adição de 25mL de uma mistura de éter etílico e álcool etílico na proporção 2:1 em volume. Em seguida, titulou-se com solução de hidróxido de potássio (KOH) de concentração 0,01mol/L previamente padronizada, utilizando-se fenolftaleína como indicador. O resultado foi calculado pela relação entre a massa em miligramas de hidróxido de potássio consumidos por grama de amostra analisada, conforme (Adolfo Lutz, 2008).

$$I.A. = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times MM_{base} \times C_{base}}{m_{amostra}} \quad (1)$$

$$\%AGL = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times MM_{ácido\ graxo} \times C_{base} \times 100}{m_{amostra}} \quad (2)$$

em que:

%AGL = ácido graxos livre

C_{base} = Concentração molar da solução de KOH (mol/L);

I.A. – Índice de acidez

$m_{amostra}$ = Massa de amostra (g).

$MM_{\text{ácido graxo}}$ = Massa Molar do ácido oléico (282 g/mol);

MM_{base} = Massa Molar do KOH (56,1g/mol);

$V_{amostra}$ = Volume de solução de KOH gasto na titulação da amostra (mL);

V_{branco} = Volume de solução de KOH gasto na titulação do branco (mL);

3.2.2 Índice de Peróxido

Este índice determina todas as substâncias, em termos de mili - equivalentes de peróxido por 1000 g de amostra, que oxidam o iodeto de potássio nas condições do teste. Estas substâncias são geralmente consideradas como peróxidos ou outros produtos similares resultantes da oxidação da gordura. (Adolfo Lutz, 2008).

O índice de peróxido nunca deve ser analisado sozinho, visto que os peróxidos são compostos muito reativos e são facilmente degradados. Dessa forma, esse índice deve sempre ser confrontado com o índice de acidez. Quando os dois valores apresentam baixos valores significa que o óleo apresenta boa qualidade, mas quando um deles apresenta alto valor, mesmo que outro apresente valor baixo é indicio de degradação do óleo. O índice de peróxidos não deve ultrapassar 10 meq kg⁻¹ de amostra, pois valores abaixo desse indicam uma baixa possibilidade de deterioração oxidativa (Malacrida, 2003).

O índice de peróxido (I.P.) foi determinado utilizando-se, 5g de amostra submetida à reação com solução saturada de iodeto de potássio por 1 min. O excesso de iodeto de potássio foi então titulado com tiosulfato de sódio 0,01eq/L. O resultado foi calculado pela relação entre a quantidade em mili-equivalentes de peróxido por 1000g de amostra. O cálculo do índice de peróxido foi realizado de acordo com (Adolfo Lutz, 2008).

$$I.P. = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times C_{\text{Tiosulfato}} \times 1000}{m_{amostra}} \quad (3)$$

Em que:

$C_{\text{tiosulfato}}$ = Concentração molar da solução de tiosulfato de sódio (mol/L);

$m_{amostra}$ = Massa de amostra (g).

$V_{amostra}$ = Volume de solução de tiosulfato de sódio empregada na titulação da amostra (mL);

V_{branco} = Volume de solução de tiosulfato de sódio empregado na titulação do branco (mL);

3.2.3 Índice de Saponificação

A amostra completamente líquida e livre de traços de umidade foi pesada, de forma que a massa não ultrapassasse 5 gramas. A solução de hidróxido de potássio foi adicionada e a solução ficou sobre refluxo por aproximadamente uma hora, quando o tubo de refluxo foi lavado com água. Uma titulação com solução de ácido clorídrico 0,5mol/L e com indicador ácido-base foi realizada para medir a quantidade restante de KOH (Adolfo Lutz, 2008).

3.2.4 Teor de Umidade

As medidas para a determinação do teor de umidade foram realizadas em estufa. As amostras foram colocadas em recipientes por 24 horas em estufa a 105°C. Depois as amostras permaneceram na estufa até massa constate, sempre a 105°C (Adolfo Lutz, 2008).

3.2.5 Análise do Óleo em Cromatografia a Gás

A composição em ácidos graxos dos óleos estudada foi determinada por análise por cromatografia de fase gasosa, em um Cromatógrafo Varian CP – 3800, com coluna BP – X70 – SGE, de 30 m x 0,25 mm, para a separação dos compostos e análise.

As amostras de óleo foram submetidas à preparação proposta por Hartman e Lago (1973). Pesaram-se 100mg de amostra e adicionaram-se 4mL da solução 0,5mol/L de NaOH em metanol e manteve-se em banho de água em ebulição até a solução ficar totalmente transparente. Depois adicionaram-se 5mL do reagente esterificante (metanol). Após, 4mL da solução saturada de cloreto de sódio foi adicionado, agitando por 30 segundos, e adicionaram-se 5mL do solvente (n-heptano) misturando-se vigorosamente. Deixou-se em repouso por aproximadamente 1,5 horas na geladeira. O sobrenadante foi utilizado para a injeção no cromatógrafo (Hartman & Lago, 1973; Visentainer & Franco, 2006).

3.2.6 Determinação da Massa Molar

O cálculo das porcentagens dos ácidos graxos presentes na amostra de óleo foi por meio dos cromatogramas e propiciou o cálculo da massa molar (Geogorgianni *et al.* 2007).

$$\%_{Ac.graxo} = \frac{A_{ac.graxo}}{A_{total}} * 100 \quad (4)$$

$$MM_{triacilglicerídeos} = 3.(\%_{Ac.graxo} \cdot MM_{ác.graxo}) + MM_{glicerol} - 3.MM_{agua} \quad (5)$$

$$MM_{diacilglicerídeos} = 2.(\%_{Ac.graxo} \cdot MM_{ác.graxo}) + MM_{glicerol} - 2.MM_{agua} \quad (6)$$

$$MM_{monocilglicerídeos} = 1.(\%_{Ac.graxo} \cdot MM_{ác.graxo}) + MM_{glicerol} - 1.MM_{agua} \quad (7)$$

em que:

$A_{ac.graxo}$ = Área do pico correspondente ao ácido graxo (uA/min);

A_{total} = Área total considerando o pico de todos os ácidos graxos presentes na amostra (uA/min);

$MM_{ácido\ graxo}$ = Massa molar média dos ácidos graxos correspondente ao óleo (g/mol);

MM_{agua} = Massa molar da Água (18,01 g/mol).

$MM_{diacilglicerídeos}$ = Massa molar média dos diacilglicerídeos do óleo (g/mol);

$MM_{glicerol}$ = Massa molar do glicerol (92,07 g/mol);

$MM_{monocilglicerídeos}$ = Massa molar média dos monocilglicerídeos do óleo (g/mol);

$MM_{triacilglicerídeos}$ = Massa molar média dos triacilglicerídeos do óleo (g/mol);

De posse da massa molar média dos ésteres metílicos determinadas por cromatografia em fase gasosa é possível calcular a massa molar médias dos ésteres metílicos, monocilglicerídeos, diacilglicerídeos e triacilglicerídeos.

3.2.7 Determinação do Teor de Proteína da Enzima

Geralmente as enzimas apresentam baixa estabilidade quando isoladas, ou seja, em ambiente diferente aos dos organismos vivos que as produzem ou que não tenha o substrato a qual elas atuam, mesmo que essas sejam enzimas extracelulares. Essa característica não permitiria que essa fosse comercializada e muito menos que as enzimas fossem aplicadas em processos biotecnológicos.

Para contornar essa adversidade os fornecedores geralmente disponibilizam enzimas no mercado como uma solução enzimática que pode tanto ser sólida, como também líquida. Nessa solução enzimática pode estar presente uma ampla variedade de compostos não divulgados pelo fornecedor, devido a fatores de propriedade industrial. Geralmente, estão presentes substrato utilizados pelo micro-organismo para produção dessas enzimas, partes do micro-organismo, o substrato de atuação da enzima e ou substâncias capazes de manter as propriedades da enzima. Geralmente essas substâncias têm a capacidade de ligar-se ao sítio ativo da enzima protegendo ele de degradação e conferindo estabilidade à enzima.

O teor de proteína da enzima livre foi determinado pelo método colorimétrico adaptado de Bradford (1976). O reagente de Bradford foi preparado dissolvendo-se 0,1g de azul brilhante de Coomassie em 50mL de etanol 95%, em seguida acrescentando-se 100mL de ácido orto-fosfórico 85% e completando-se com água destilada, para um volume final de 1L. Em tubos de ensaio adicionou-se 0,3mL de solução enzimática (10mg/mL) e 3mL do reagente. Após agitação e repouso por 5 minutos, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595nm, em cubetas de plástico de 1cm de caminho óptico. O teste foi conduzido à temperatura ambiente. O controle foi preparado nas mesmas condições, substituindo a solução enzimática por água destilada. A concentração de proteína foi calculada a partir de uma curva de calibração obtida pela determinação das absorbâncias de uma série de 10 diferentes concentrações de padrão BSA (albumina de soro bovino), na faixa de 0,1 a 1,0g/L. O complexo formado (proteína-corante) permanece disperso em solução por, aproximadamente, 1 hora. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.2.8 Determinação da Atividade Hidrolítica pelo Método do Azeite de Oliva

A atividade enzimática da lipase foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia adaptada de Soares *et al.*, (2004). Em erlenmeyers foram adicionados 5mL de substrato (emulsão formada por 50mL de azeite de oliva, 50mL de água e 3,5g de goma arábica), 4mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1Mol/L, pH 7,0). Os recipientes foram incubados a 37°C. Após 10 minutos adicionou-se 0,5mL da solução de enzima livre (5mg/mL). Os erlenmeyers foram mantidos a 37°C sob agitação constante, em diferentes tempos de reação (5, 10, 15 e 20min). Decorrido cada intervalo de tempo selecionado, interrompeu-se a reação com a adição de 10mL de uma mistura de acetona, etanol e água destilada (1:1:1). Para o controle adicionaram-se 5mL do substrato, 4mL da solução tampão fosfato de sódio (0,1Mol/L, pH 7,0) e 1,0mL de água. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,02 mol/L, utilizando-se fenolftaleína como indicador. A atividade da enzima livre foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}$ (U). O cálculo da atividade foi realizado de acordo com:

$$\text{Atividade} = \frac{(V_A - V_B) * N * 10^3}{t * m} \quad (8)$$

em que:

m = é a massa de enzima livre ou imobilizada (mg);

N = é concentração da solução de KOH (mol/L);

t = é o tempo de reação (min);

V_A = é o volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL);

V_B = é o volume do KOH gasto na titulação do controle (mL).

3.2.9 Determinação da Atividade Hidrolítica pelo Método do Butirato de Metila

Nesta análise, a determinação da atividade de hidrólise da enzima foi determinada empregando-se o butirato de metila como substrato. Para cada tempo de reação (5, 10, 15 e 20min), em erlenmeyers, foram adicionados 10mL de substrato (mistura de 1% de butirato de metila em tampão fosfato $20 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7). Após o substrato atingir a temperatura desejada de 37°C adicionou-se 1mL da solução enzimática (5mg/mL). Os erlenmeyers foram mantidos a 37°C sob agitação constante por todo o período do teste. Ao final de cada tempo, interrompeu-se a reação com a adição de 10mL da mistura de acetona, etanol e água destilada (1:1:1). O controle foi preparado nas mesmas condições, substituindo a enzima por água.

Uma unidade (U) de atividade enzimática é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de butirato de metila por minuto, em pH 7,0 a 37°C . O produto liberado (ácido butírico) foi titulado com solução de KOH 0,02 mol/L, utilizando fenolftaleína como indicador. A atividade da enzima livre foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}$ (U).

3.2.10 Determinação da Atividade de Esterificação pelo Teor de Ácido Butírico

A atividade de esterificação da enzima livre foi determinada pela reação de formação do butirato de butila na reação de n-butanol (0,6mol/L) com ácido butírico (0,6mol/L) e heptano a 37°C por 2 horas, empregando peneiras moleculares (10% em massa, em relação ao substrato) e 1,0g da enzima. O teor de ácido butírico foi determinado por titulação de 1,0mL de amostra, empregando solução alcoólica de KOH 0,02mol/L e fenolftaleína como indicador. As amostras foram retiradas do meio reacional nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120min.

Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de ácido butírico por minuto, a 37°C . O consumo de reagente foi verificado por titulação do ácido butírico com solução de KOH 0,02mol/L, utilizando fenolftaleína como indicador. A atividade da enzima livre foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}$ (U).

3.2.11 Determinação da Atividade de Transesterificação pela Produção de 2-fenetil acetato

A atividade de transesterificação, de acordo com Amano (2007), na reação de álcool 2-fenetílico com acetato de vinila foi medida em cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE, Varian 920-LC) utilizando coluna ODS-C18, detector UV-VIS a 254nm e fase móvel de mistura de acetonitrila e água (42:58), temperatura ambiente, injeção de 20 μ L e vazão de 0,5mL.min⁻¹. A mistura reacional foi preparada adicionando-se 0,6mL de álcool 2-fenetílico, 2,4mL de acetato de vinila e 20mg de enzima e mantida em agitação por 20 minutos a 37°C. Após, pipetou-se 0,1mL da mistura e adicionaram-se 6,9mL de éster isopropílico para a dosagem dos produtos em CLAE. Para quantificação do produto formado, foi construída uma curva padrão, utilizando os reagentes e produto da reação. Inicialmente preparou-se uma mistura com 0,5mL de 2-fenetil acetato, 0,5mL de álcool 2-fenetílico e 2,0mL de acetato de vinila. Completou-se o volume desta mistura para 100mL com fase móvel acetonitrila:água (42:58). Em seguida, foram feitas diluições (1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5). Estas amostras foram analisadas nas mesmas condições das amostras reacionais.

As atividades foram expressas em U/g, (em que U= μ mol/min). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que irá produzir 1 μ mol de 2-fenetil acetato por minuto a 37°C. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Os reagentes empregados na cromatografia em fase líquida de alta eficiência apresentaram grau de pureza superior a 99%.

3.2.12 Análise das Amostras de Triacilglicerídeos, Ésteres e Produtos por CLAE

O método de análise gradiente de fase reversa não aquosa para cromatografia em fase líquida de alta eficiência vem sendo usado largamente para separação de misturas complexas de amostra de óleos de origem vegetais (Holčapek et al., 2003).

Para identificação dos triacilglicerídeos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ésteres em CLAE foi utilizado o método de gradiente combinado linear aquoso-orgânico/não aquoso, adaptado de Holcapek *et al.* (1999). Este método consiste na construção de um gradiente ternário com tempo total de 42 minutos, dividido em duas etapas, uma de separação (aquosa/orgânica) e outra de eluição (não aquosa), composto por água ultra pura (A), acetonitrila (B) e uma solução 5:4 (v/v) de iso-propanol/hexano (C).

A condição inicial foi de 30% de A + 70% de B, 100% de B em 15 min, 50% de B + 50% de C em 24min, seguida por 12 min de eluição isocrática de 50% de B e 50% de C. Nos últimos 6min foi retomado o gradiente inicial (30% de A + 70% de B), para restabelecer as condições iniciais de operação da coluna. A coluna foi operada a 40°C, com detecção UV-VIS a 210nm, com injeção de 20µL e vazão de 1mL.min⁻¹.

A coluna foi operada a 40°C, mesmo que alguns métodos indiquem a operação a 30°C, escolheu-se essa temperatura por dificuldades operacionais, principalmente devido ao aumento da temperatura ambiente e que pode impossibilitar a amostra.

O detector UV-VIS a 210nm foi utilizado, mesmo que no comprimento de onda de 205nm, a absorbância dos compostos são mais efetivas e apresentam maior sensibilidade. No entanto utilizou-se o comprimento de 210nm porque apresentou melhor e mais rápida estabilidade do equipamento que possibilitou menos ruído na leitura das amostras.

As curvas de calibração foram construídas a partir de diluições consecutivas das misturas de padrões de trioleína, 1,2-dioleína, 1-monooleína e oleato de etila e a quantificação foi realizada somando as áreas relativas das espécies químicas comuns, submetidas à curva de calibração. Os grupos de espécies químicas comuns foram selecionados a partir de estudos de revisão bibliográfica dos trabalhos de Holcapek *et al.* (1999), Di Nicola *et al.* (2008) e com base na análise dos cromatogramas obtidos dos padrões de trioleína, 1,2-dioleína, 1-monooleína e oleato de etila. A quantificação dos compostos da amostra foram realizadas por meio das somas das áreas relativas das espécies químicas comuns, submetidas à curva de calibração.

Os grupos de espécies químicas foram selecionados a partir de estudos de revisão bibliográfica dos trabalhos de Holcapek *et al.* (1999), Turkan *et al.* (2006), Nicola *et al.* (2008), também em análise dos cromatogramas obtidos dos padrões de acilgliceróis e de amostras. e utilizando-se da ordem de eluição encontrada pelo número equivalente de carbonos.

3.2.13 Reação de Transesterificação em Reator Batelada

Os ensaios para a síntese de ésteres etílicos, em batelada, foram conduzidos em reatores de 30 e 50 mL, acoplados a condensadores, para evitar a evaporação do álcool presente na reação. Os reatores e condensadores foram mantidos em temperatura e agitação

constantes, com o emprego de banhos termostatzados com controle de temperatura e agitadores magnéticos. A temperatura de reação (40, 50 e 60°C), quantidade de enzima (5; 7,5 e 10%) razão molar óleo:álcool (1:6; 1:9 e 1:12) e tempo de reação (0 - 72 horas) e as amostras foram retiradas em tempos pré-determinados.

3.2.14 Cálculo do Rendimento em Ésteres

O rendimento em éster nas amostras foi calculado como descrito pela equação (9), Em que mol de componentes *i* formados é o número de mol de éster formados no meio reacional até o momento da retirada da amostra e mol de componente *i* possíveis de serem formados é a quantidade máxima possível de ser obtida, calculada partindo da quantidade de triacilglicerídeos presente no meio reacional no início do ensaio (Fogler, 2009).

$$\% \text{Rendimento} = \frac{\text{mol de componentes } i \text{ formados}}{\text{mol de componente } i \text{ possíveis de serem formados}} \times 100 \quad (9)$$

3.2.15 Cálculo da Conversão de Triacilglicerídeos

A conversão dos triacilglicerídeos foi calculada como descrito na equação (10). A conversão dos triacilglicerídeos é determinada pela quantidade de triacilglicerídeos consumidos do meio reacional até o momento da retirada da amostra dividido pela quantidade de triacilglicerídeos presentes no início da reação (Fogler, 2009).

$$\% \text{Conversão} = \left[1 - \left(\frac{\text{mol de triacilgliceróis consumidos}}{\text{mol de triacilgliceróis alimentados}} \right) \right] \times 100 \quad (10)$$

3.2.16 Cálculo da Atividade de Conversão de Triacilglicerídeos

A atividade de conversão dos triacilglicerídeos foi calculada pelo método das velocidades iniciais, como descrito na equação (11)

$$\text{Ativ. conv} = \frac{\alpha * 10^{-6}}{60 * M_{enzima} * Q_{enzima}} \quad (11)$$

em que:

Ativ.conv = Atividade de conversão de triacilglicerídeos (U/g de enzima);
 α = Inclinação da reta de ajuste dos dados de conversão de triacilgliceról na parte linear dos dados em função do tempo de reação (min^{-1});
 M_{enzima} = Quantidade de enzima utilizada no ensaio (g);
 Q_{enzima} = Teor de proteína da enzima (mg/g de enzima);

3.2.17 Cálculo da Atividade de Rendimento em Éster

A atividade de conversão dos triacilglicerídeos foi calculada pelo método das velocidades iniciais, como descrito na equação (12).

$$Ativ. rend. ester = \frac{\alpha * 10^{-6}}{60 * M_{enzima} * Q_{enzima}} \quad (12)$$

em que:

Ativ. rend. ester = Atividade de rendimento em éster (U/g de enzima)

α = Inclinação da reta de ajuste dos dados de rendimento de éster na parte linear dos dados em função do tempo de reação. (mol*min⁻¹).

M_{enzima} = Quantidade de enzima utilizada no ensaio. (g)

Q_{enzima} = Teor de proteína da enzima (mg/g de enzima)

3.3 Planejamento Experimental

O planejamento experimental foi delineado para o estudo da produção de éster etílico por catálise enzimática. As variáveis analisadas foram, temperatura, quantidade de enzima e razão molar álcool/óleo foram estudadas em dois níveis, sendo esses determinados por estudos prévios realizados por esse grupo e trabalhos publicados anteriormente ao início desse delineamento.

A matriz do planejamento 2³ com repetição do ponto central esta descrita na Tabela 1 e demonstram todas as configurações de experimentos realizados para determinação dos efeitos importantes para a atividade de produção de éster, atividade de consumo de triacilglicerídeos, rendimento em éster e conversão de triacilglicerídeos.

O rendimento em éster foi determinado como sendo o máximo rendimento alcançado nas 72 horas de reação. A conversão de triacilglicerídeos é determinada como a máxima conversão de triacilglicerídeos alcançada em 72 horas de reação. As atividades de consumo de triacilglicerídeos e produção de éster foram determinadas por meio das velocidades iniciais de reação. E os dados foram analisados utilizando a ferramenta de análise de delineamentos fatoriais do software *Statistica 6.0*[®].

Os resultados de planejamento experimental foram interpretados por meio da análise de variância, gráfico de Pareto e as superfícies de resposta. A análise de variância utiliza testes de hipótese para definir se as variáveis de estudo e suas interações possuem ou não influência sobre as resposta de interesse que podem ser verificadas pelo *p*-valor. O diagrama de Pareto descreve o valor dos contrastes de cada efeito e mostra de forma clara e objetiva

quais as variáveis que, estatisticamente, para um intervalo de confiança de 95%, apresentam influência sobre a variável de resposta. As superfícies de resposta descrevem um modelo estatístico de regressão que descreve os resultados experimentais alcançados e prevê os resultados não alcançados.

A melhoria de processos pode ser realizada por meio de estudos de superfície de resposta, sendo que a maior vantagem em utilizar essa ferramenta é a redução no número de experimentos sem que as prerrogativas estatísticas sejam prejudicadas o que permite estudos mais rápidos e menos onerosos.

As superfícies de respostas surgem como mais uma ferramenta para análise do processo e descrição das tendências das variáveis sobre a resposta estudada. A superfície também tem a função de prever o comportamento da variável de resposta em condições que não foram testadas experimentalmente, ou por desinteresse do autor nessa faixa de análise ou por impedimento experimental. Ainda outra função dessa ferramenta gráfica é demonstrar claramente as condições ótimas para maximização da variável de resposta e se ter uma previsão do comportamento em faixas intermediárias dos testes.

Tabela 1: Matriz do planejamento 2^3 para os efeitos temperatura, razão molar e Quantidade de enzima.

Experimento	Temperatura (°C)	Razão Molar (alcoól:óleo)	Quantidade de Enzima (%)
Exp 1	40 (-1)	1 : 6 (-1)	5% (-1)
Exp 2	60 (+1)	1 : 6 (-1)	5% (-1)
Exp 3	40 (-1)	1 : 12 (+1)	5% (-1)
Exp 4	60 (+1)	1 : 12 (+1)	5% (-1)
Exp 5	40 (-1)	1 : 6 (-1)	10% (+1)
Exp 6	60 (+1)	1 : 6 (-1)	10% (+1)
Exp 7	40 (-1)	1 : 12 (+1)	10% (+1)
Exp 8	60 (+1)	1 : 12 (+1)	10% (+1)
Exp 9	50 0	1 : 9 0	7,5% 0
Exp 10	50 0	1 : 9 0	7,5% 0
Exp 11	50 0	1 : 9 0	7,5% 0
Exp 12	50 0	1 : 9 0	7,5% 0

A tabela de análise de variância descreve e quantifica a influência que os efeitos e suas interações provocam na variável de resposta. Essa quantificação é realizada por meio de um

teste de hipótese que estatisticamente, dentro do intervalo de confiança adotado indica o quão importante esses efeitos são para a construção do modelo de regressão dos dados experimentais que são usados para a construção da superfície de resposta.

O diagrama de Pareto em alguns trabalhos pode até não ser exibido, pois as conclusões mostradas por ele podem ser obtidas de forma indireta pelo p -valor da tabela de análise de variância. No entanto nesse trabalho, o diagrama de Pareto foi demonstrado e discutido para formalizar e quantificar, pelo valor dos contrastes, a influência de cada efeito e suas interações nas variáveis de respostas analisada. Devido a clara e fácil interpretação o diagrama de Pareto ainda permite elencar quais as variáveis que apresentam maior importância no modelo de regressão da variável de resposta que estamos estudando.

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização dos Óleos Vegetais

As determinações feitas na análise de óleos e gorduras são geralmente chamadas de índices. Esses são uma expressão de suas propriedades físicas ou químicas e não as porcentagens dos seus constituintes. Assim, são determinados os índices de iodo, saponificação, peróxidos e as constantes físicas como o ponto de fusão e o índice de refração. São estes índices que, juntamente com as reações características, servem para identificação e avaliação da maioria dos óleos e gorduras. (Adolfo Lutz, 2008).

4.1.1 Índice de Acidez

O índice de acidez determinado para o óleo de nabo forrageiro foi de 4,505 mg de KOH/g de óleo. Em em acidez relativa ao ácido oléico representa 2,26%. Para o óleo de canola refinado comercial, esse valor deve obrigatoriamente ser inferior a 0,5%. De fato, os valores determinados para o índice de acidez desse óleo e índice de acidez relativa ao ácido oleico foi 0,19 mg de KOH/g e 0,16% respectivamente.

Os valores de índice de acidez, tanto para o óleo de canola quanto para o óleo de nabo forrageiro, foram bastante baixos. Isso indica que os óleos apresentaram boa qualidade para aplicação nos experimentos, principalmente, por se tratar de produção de ésteres por catálise enzimática. Essa rota de produção pode converter a ésteres além dos triacilglicerídeos também os ácidos graxos.

O índice de acidez do óleo de nabo forrageiro também foi determinado por Domingos, et. al. (2008). Esses autores encontraram 0,12 mg de KOH/g de óleo de nabo forrageiro extraído de sementes frescas por extração mecânica (Domingos et al., 2008). Também para o óleo de nabo forrageiro extraído por prensagem a frio Valle et al. (2009) encontrou índice de acidez de 0,71 mg de KOH/g de óleo (Valle et al., 2009). Já Dambiski, L (2007), analisando a extração de óleo de nabo forrageiro em extrusora e armazenado por um longo período encontrou índice de acidez de 10,3 mg/ g de óleo (Dambiski, 2007).

Deve-se considerar que o óleo de nabo forrageiro cedido pelo IAPAR foi extraído pelo menos oito meses antes a essa caracterização. Então, de acordo com Dambiski, L (2007) é de esperar que o índice de acidez fosse bastante elevado devido ao longo armazenamento. No entanto, mesmo sendo acondicionado de forma não ideal, ainda assim, apresentou característica de índice de acidez que permitam ser usadas para os experimentos.

4.1.2 Índice de Peróxido

O valor de índice de peróxido determinado para o óleo de nabo forrageiro foi de 8,34 meq/1000 g de amostra e o índice para o óleo de canola foi 5,65 meq/1000 g de amostra. Comparando com os resultados de Ferrari et al. (2005), que determinou para o óleo de nabo forrageiro, um índice de acidez de 12,40 meq/1000 g de amostra bem superior ao encontrado nesse trabalho. Esses autores relatam que esses níveis, mesmo que altos, não influenciariam significativamente na produção de biodiesel (Ferrari et al., 2005).

Tanto o índice de acidez quanto o índice de peróxido mostraram valores baixos. Isso indica que os óleos possuem características de baixa deterioração oxidativa e pequenas quantidades de ácidos graxos livres.

4.1.3 Índice de Saponificação

O índice de saponificação para o óleo de nabo forrageiro foi de 230,28 mg de KOH/ g de óleo enquanto que para o óleo de canola foi de 187,35 mg de KOH/g de óleo. Estes valores estão de acordo com aqueles relatados na literatura. De fato, Dambiski, (2007) determinou o índice de saponificação do óleo de nabo forrageiro, extraído por prensagem mecânica das sementes, obtendo o valor de 185,90 mg de KOH/ g de óleo. Ainda, para o óleo de nabo forrageiro, obtido por extração Soxhlet, foi determinado um índice de saponificação igual a 187,2 mgKOH/g (Biaggi & Silva, 2011).

4.2 Determinação do Perfil de Ácidos Graxos e Massa Molar.

Pela Tabela 2 é possível verificar a composição de ácidos graxos derivados do óleo de canola. Os resultados mostraram que existe uma predominância de ácido oléico e ácido linoléico na amostra derivatizada do óleo de canola. Esses dois ácidos graxos, juntos representam 83% de todos os ácidos graxos presentes nesse óleo. Então é de se esperar que nesse óleo uma grande quantidade de trioleína e trilinoleína sejam encontrada.

Tabela 2: Perfil de ácidos graxos presentes no óleo de canola.

Perfil de ácido graxos	Tempo de retenção (min)	Nº de carb.	% de Ácido graxo	Massa molar do ácido graxo (g/mol)
Acido Butírico	3,618	C 4:0	0,222	88
Acido Palmítico	15,053	C 16:0	4,830	256
Acido Palmitoléico	15,648	C 16:1	0,257	254
Acido Esteárico	18,192	C 18:0	2,663	284
Acido Oléico	18,831	C 18:1 trans	61,486	282
Acido Linoléico	20,000	C 18:3 n-6	23,235	280
Acido γ -Linoléico	20,557	C 18:3 n-6	0,353	278
Acido linolénico	20,866	C 18:3 n-3	5,750	278
Outros		> C 20:0	1,300	> 310

Na Tabela 3: Massa molar média dos compostos presentes no óleo de canola. está descrita a massa molar média do óleo de canola calculados utilizando as Equações (5), (6) e (7) por meios do perfil de ácidos graxos presentes neste óleo. A massa molar media do óleo é importante pela necessidade de determinar a quantidade mínima de álcool a ser usada no meio reacional e ainda determinar parâmetros como atividade de produção de éster, consumo de triacilglicerídeos, rendimento de éster e conversão de triacilglicerídeos.

Tabela 3: Massa molar média dos compostos presentes no óleo de canola.

Composto	Massa molar (g/mol)
Ester-Etila	316,94
Monoacilgliceróis	345,70
Diacilgliceróis	633,33
Triacilgliceróis	904,82

Pela Tabela 4 é possível verificar a composição de ácidos graxos derivados do óleo de nabo forrageiro. Os resultados mostram que existe uma grande quantidade de ácido oléico e ácido linoleico. No entanto esses valores são muito inferiores aos presentes no óleo de canola,

indicando que os dois óleos apresentam diferenças bastante consideráveis em sua composição. Um fato importante na composição desse óleo é a presença do ácido erucico que é característico de plantas da família das crucíferas, a qual pertence o nabo forrageiro (Ferrari et al., 2005).

Tabela 4: Perfil de ácidos graxos presentes no óleo de nabo forrageiro

Perfil de ácidos graxos	Tempo de retenção (min)	Nº de carb.	% de Ácido graxo	Massa do molar do ácido graxo
Ácido Butírico	3,5065	C 4:0	11,79	88
Ácido Capróico	3,775	C 6:0	0,33	116
Ácido Palmítico	15,0605	C 16:0	5,36	256
Ácido Palmitoleico	15,641	C 16:1	0,16	254
Ácido Estearico	18,145	C 18:0	1,98	284
Ácido Oleico	18,77	C 18:1 cis	32,00	282
Ácido Linoleico	19,7095	C 18:2 n-6c	16,10	280
Ácido γ - Linoleico	20,883	C 18:3 n-3	9,06	278
Ácido Aradico	21,212	C 20:0	0,72	312
Acido cis-11-Eicoseinoico	21,8445	C 20:1	7,29	310
Ácido Erucico	25,016	C22:1n9	12,89	302
Outros			2,13	

Pela análise da Tabela 4 é de se esperar, para o óleo de nabo forrageiro, uma maior riqueza de triacilgliceróis diferentes, pois há, em comparação a matéria graxa obtida do óleo de canola, uma maior distribuição de ácidos graxos na sua composição. Essa suposição será verificada nas análises por CLAE.

A composição em ácidos graxos do óleo de nabo forrageiro também foi verificada por Domingos et al. (2008) que identificou a presença de 5,67% do ácido graxo palmítico, 2,23% do ácido esteárico, 34,53% de ácido oleico, 17,78% do ácido linoleico, 12,46% do ácido linolênico, 0,97% do ácido aradico, 9,99% do ácido gadoleico (20:1) e do ácido erucico 16,37% (Domingos et al., 2008). Também Valle et al. (2009) mostrou a composição de ácidos graxos do óleo de nabo forrageiro como 7,0% do ácido graxo palmítico, 3,6% do ácido esteárico, 27,9% de ácido oleico, 7,6% do ácido linoleico, 4,6% do ácido linolênico, 2,2% do ácido aradico, 11,2% do ácido gadoleico (20:1) e do ácido erucico (22:1) a quantidade de 33,3% (Valle et al., 2010; Valle et al., 2009). As composições apresentam algumas diferenças que são atribuídas a efeitos climáticos, de solo e manejo, mas é possível identificar semelhança de composição e constituição dos óleos estudados pelos autores e nesse trabalho.

Na Tabela 5 é possível verificar a massa molar média dos compostos presentes no óleo nabo forrageiro calculado por meios do perfil de ácido graxo. Foi possível perceber que a massa molar média do óleo de nabo é menor que a massa do óleo de canola. Isso mostra que o perfil de ácidos graxos do nabo forrageiro possui composição considerável de ácidos graxos de baixa massa molecular. Essa característica poderia influenciar no rendimento de éster das lípases principalmente pela diferença de densidade eletrônica na ligação éster dos triacilglicerídeos.

Tabela 5: Massa molar média dos compostos presentes no óleo de nabo forrageiro.

Composto	Massa molar (mol)
Ester-Etila	294,00
Monoacilgliceróis	338,00
Diacilgliceróis	584,00
Triacilgliceróis	894,12

De fato, Valle et al. (2009) encontrou uma massa molar de 900,32 g/mol, mas esta diferença pode ser atribuída ao fato que esses autores encontraram uma porção maior de ácido erucico e compostos de cadeias carbônicas superiores, assim como Domingos et al. (2008) que encontrou massa molar média de 911,53 g/mol. A massa molar encontrada para esse trabalho foi de 894,12 g/mol, essa grande diferença é atribuída ao fato de ter encontrado 11,79% de ácido butílico.

A seletividade da enzima pelo tamanho da cadeia do ácido graxo geralmente depende das propriedades nativas da enzima. No caso especial das lípases, a formação do intermediário acil-enzima é o responsável por essa seletividade, mostrando que a dependência do comprimento da cadeia de ácidos graxos na sua maioria, esta ligado á afinidade da enzima com ácidos graxos. Estudo da reação de esterificação de ácidos graxos de tamanho de cadeias diferentes mostrou que a cutinase obtida de *Burkholderia cepacia* apresenta melhores resultados de conversão utilizando ácidos graxos de cadeia curta. Os autores atribuem esses resultados a um impedimento espacial que restringe o acesso do álcool ao sitio ativo da enzima quando cadeia carbônicas longas são utilizadas (de Barros et al., 2009; Dutta & Dasu, 2011).

4.3 Determinação do Teor de Proteína da Enzima Livre

Os teores de proteína observados para as lípases de *Burkholderia cepacia* e *Thermomyces lanuginosus* foram de 7,5 mg de proteína /g de enzima e 27,3 mg proteína /g de enzima, respectivamente.

Valores altos teor de proteína não necessariamente indicam alta concentração da enzima de interesse, sendo então que esses valores junto com a atividade característica da enzima para a reação de interesse devem ser discutidos juntos. No caso das lípases a reação que caracteriza essa enzima é a hidrólise, então para caracterizar o potencial reacional dessa enzima, a atividade hidrolítica devem ser usados.

No entanto, a atividade hidrolítica não tem muita aplicabilidade no escopo desse trabalho, visto que o intuito foi estudar o potencial de aplicação das lípases de *Burkholderia cepacia* e de *Thermomyces lanuginosus* na reação de transesterificação. Então as atividades de esterificação e transesterificação foram utilizadas

4.4 Determinação da Atividade Hidrolítica e de Esterificação da Lípase

Como pode ser verificado na Tabela 6, os valores de atividade são sempre maiores para a lípase de *Thermomyces lanuginosus*. Vale ressaltar que essas atividades são apenas valores que indicam o potencial, visto que o meio reacional ao qual elas serão submetidas na produção de ésteres etílicos possuem características diferentes dos usados nesses testes.

Tabela 6: Atividades hidrolítica e de esterificação das lípases de *Burkholderia cepacia* e *Thermomyces lanuginosus* livre.

Atividades	Substrato	<i>Burkholderia cepacia</i> (U/mg de proteína)	<i>Thermomyces lanuginosus</i> (U/mg de proteína)
Hidrolítica	Azeite de oliva	1865	2844
Hidrolítica	Butirato de Metila	0,6000	7,200
Esterificação	Ácido Butírico	1,47	5200

4.5 Determinação da Atividade de Transesterificação da Lípase

A medida da atividade de transesterificação do biocatalisador livre foi realizada de acordo com a metodologia proposta pelo boletim técnico da empresa fornecedora (Amano., 2007) pela produção de 2-fenetil acetato. Os ensaios foram conduzidos em duplicata, e os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Atividade de transesterificação das lípases de *Burkholderia cepacia* e *Thermomyces lanuginosus* livres

Lípase	Atividade de Transesterificação (U/g de enzima)
<i>Burkholderia cepacia</i>	2131,26
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	56607,8

Este método de medir atividade proposto pelo fornecedor de uma das enzimas apresenta a característica de ser mais preciso, reprodutivo e ainda fácil e rápido de ser realizado. Quando comparados os valores obtidos pelo método proposto por Amano (2007) e os obtidos pelos métodos de esterificação do ácido butírico é possível observar um comportamento semelhante dos resultados.

4.6 Método de Análise por CLAE

O método de separação gradiente combinado linear aquoso-orgânico/não aquoso mostrou-se muito eficiente na separação dos grupos de compostos de correspondentes aos monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilglicerídeos e ésteres. Pelas Figura 4 e Figura 5 é possível observar a separação desses compostos para as duas diferentes amostras de óleos. Na faixa de tempo de 5 a 14 minutos foram identificados os picos referentes aos monoacilgliceróis, entre 15 e 22 minutos os picos referentes aos ésteres de etila. Os diacilgliceróis e os triacilglicerídeos são identificados nas faixas de tempo de 22,5 a 28,5 e 28,5 a 36 minutos, respectivamente.

O cromatograma dos produtos de reação do óleo de canola, Figura 4 mostrou uma boa separação entre os compostos, com diferença mínima de tempo do tempo de retenção entre os grupos de 2 minutos. Por esse cromatograma é claramente visível a separação entre os monoacilgliceróis e os ésteres que apresentam faixa de tempo de eluição entre 5 e 14 minutos e entre 15 e 22 minutos respectivamente. No entanto, o primeiro pico expressivo de éster somente é eluído aos 19 minutos. Antes dos 5 minutos de análise é de se esperar a presença de picos de ácidos graxos livres, embora, em todas as amostras testadas não houve a presença desses compostos. De fato, o meio reacional isento de água, juntamente com a possibilidade de esterificação de qualquer ácidos graxos livres presente no óleo já indicavam essa conclusão.

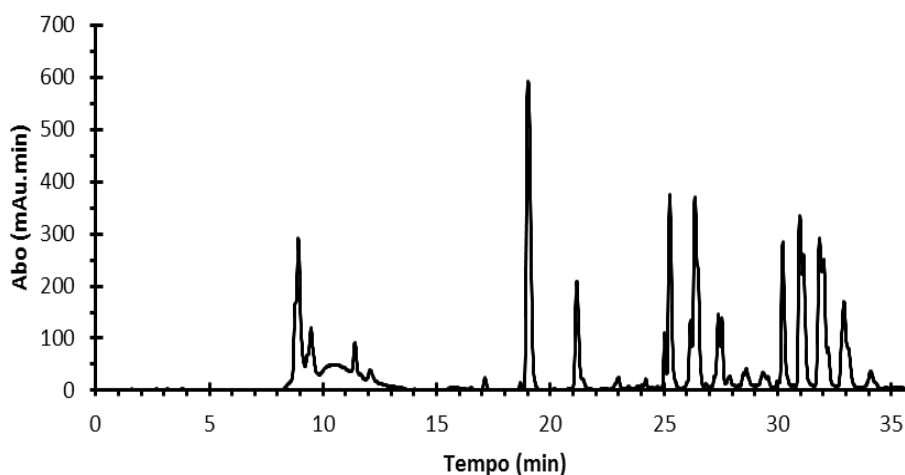


Figura 4: Cromatograma de uma amostra intermediária da reação de transesterificação enzimática do óleo de canola evidenciando a separação entre os compostos.

A princípio pensou-se que esses compostos eram removidos das amostras no processo de lavagem, o que poderia trazer incertezas e acrescentar erros analíticos. Sempre se deve ponderar haver reações tanto de hidrólise quanto a transesterificação o concorrendo ao mesmo tempo. No entanto, testes em que o processo de lavagem da amostra foi suprimido demonstraram não existir essa incerteza. Então, o desaparecimento dos ácidos graxos foi atribuído ao potencial das lípases em converter esses compostos em ésteres nos meios reacionais isentos de água, assim como visto na Tabela 6.

Na Figura 5, um cromatograma escolhido ao acaso de uma amostra do período intermediário a reação foi mostrado a fim de exemplificar a boa separação entre os grupos de compostos. Novamente, como observado para a amostra de óleo de canola, existe boa separação entre os compostos de monoacilgliceróis e ésteres e entre ésteres e diacilgliceróis. No entanto quanto à separação entre os grupos de diacilgliceróis e triacilglicerídeos, essa não se apresenta tão clara.

Essa preocupação está associada a quantificação da concentração dos compostos. Já que essa foi realizada por soma das áreas relativas aos grupos semelhantes. Então é primordial que se identifique as faixas de eluição de cada grupo de compostos, evitando assim quantificar um composto erroneamente em outro grupo a qual ele não pertence. Para descartar essa possibilidade, utilizando uma amostra de óleo bruto, identificou-se claramente o momento de eluição do primeiro pico de triacilglicerol, exatamente aos 28,7 minutos. O que é dois décimos de minuto após o limite que havia sido determinado, ou seja, 12 segundos após a eluição do último pico de diacilglicerol.

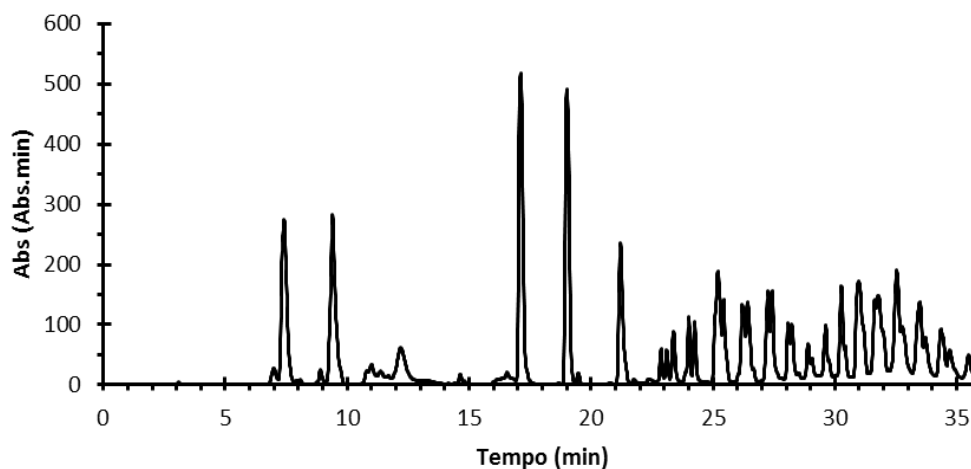


Figura 5: Cromatograma de uma amostra intermediária da reação de transesterificação enzimática do óleo de nabo forrageiro evidenciando a separação entre os compostos.

Uma análise mais criteriosa dos cromatogramas chama a atenção para os picos de pequena intensidade que se observa entre os grupos de picos mais proeminentes. Esses não apresentaram representatividade nas amostras realizadas, pois seus valores são muito inferiores aos picos maiores e mesmo em amostras mais concentração de óleo, suas intensidades não foram representativas.

Fazendo uma análise pico a pico mais detalhada do cromatograma, percebe-se uma diferença entre os óleos de nabo forrageiro e canola. Na Figura 5, a faixa de eluição dos diacilgliceróis do óleo de nabo forrageiro, há claros indícios de coeluição de diferentes diacilgliceróis. Esse fenômeno pode estar ligado ou com a presença de isômeros de cadeia, ou seja, presença de 1,2 e 1,3 diacilgliceróis com mesmo radical de ácido graxo ligado, ou ainda com ácidos graxos diferentes ligados no glicerol, que dificulta a separação na coluna cromatográfica.

Ainda é interessante discutir que nos cromatogramas obtidos por CLAE para o nabo forrageiro existe maior quantidade de coeluição de picos, sugerindo que em um mesmo glicerol podem estar ligados diferentes radicais de ácido graxos como previsto nas análise por cromatografia em fase gasosa.

4.7 Planejamento Experimental

4.7.1 Resultados dos Ensaios de Produção de Ésteres Etilicos com Lípase de *Burkholderia cepacia* Utilizando Óleo de Canola

Os resultados do planejamento experimental delineado 2^3 para a lípase de *Burkholderia cepacia* estão descritos a seguir.

4.7.1.1 Atividade de Consumo de Triacilglicerol

Na Tabela 8 foi mostrada a análise de variância dos ensaios de atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de canola pela lípase de *Burkholderia cepacia*. Para essa, com intervalo de confiança de 95%, todos os efeitos são significativos e também as interações desses efeitos.

É interessante notar que os efeitos principais, temperatura, razão molar óleo:álcool e quantidade de enzima, junto com a interação dos efeitos razão molar óleo:álcool e temperatura são os fatores que apresentam influência forte na atividade de consumo de triacilgliceróis, pois esses fatores apresentam p -valor igual ou inferior a 0,01. Os outros efeitos também são considerados importantes na variável de resposta atividade de consumo de triacilgliceról, pois seus p -valores são inferiores a 0.05. No entanto, sua contribuição na atividade foi menor que a contribuição verificada pelos outros efeitos com p -valor inferior a 0.01.

Tabela 8: Análise de variância para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Canola pela lípase *Burkholderia cepacia*.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	p-valor
Temperatura (°C)	2041,03	1	2041,03	21,74	0,01
Razão Molar (alcool:óleo)	7397,29	1	7397,29	78,80	0,00
Quantidade de Enzima (%)	1831,39	1	1831,39	19,51	0,01
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo)	905,85	1	905,85	9,65	0,04
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	1728,69	1	1728,69	18,42	0,01
Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	946,85	1	946,85	10,09	0,03
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	678,38	1	678,38	7,23	0,05
Erro	375,49	4	93,87		
Total SS	15904,96	11			

O diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos é representado na Figura 6. É possível identificar pela estimativa dos efeitos padronizados que a razão molar foi o efeito com maior influência na atividade de consumo de triacilglicerol. Essa variável apresenta um efeito quase duas vezes superior ao efeito da variável temperatura, que foi o segundo mais importante.

Esse fato já era esperado, diante da análise de variância, pois o efeito razão molar álcool:óleo apresenta p -valor muito próximo de zero.

O efeito de interação entre as três variáveis estatisticamente não apresenta influência na atividade de consumo de éster, pois seu p -valor é superior a 0,05. Se o intervalo de confiança for aumentado, por exemplo, para 90%, essa interação torna-se importante. Intervalos de confiança da ordem de 85%, em condições muito específicas, e que apresentem justificativa muito bem fundamentada e sistemas altamente complexos em que não é possível ou difícil ter controle de algumas variáveis, podem ser discutidos como resultados válidos. No entanto, intervalos de confiança de 95% são melhores aceitos na comunidade científica (Rodrigues, 2009).

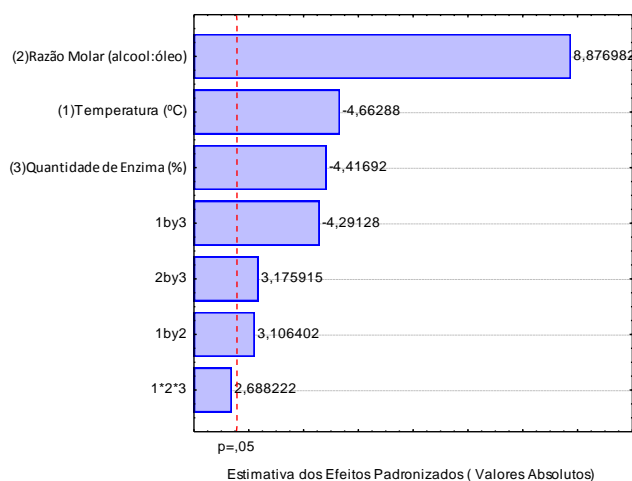


Figura 6: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Canola pela lipase *Burkholderia cepacia*

A normalidade dos resultados é utilizada para demonstrar que as condições de normalidade exigidas pelo modelo foram satisfeitas. O modelo estatístico para análise de variância exige que os erros do ajuste sejam independentes e normalmente distribuídos. Por essa análise foi possível determinar 3 pontos ligeiramente afastados da reta de regressão dos pontos experimentais que coincide com a reta de normalidade. No entanto, esse afastamento não foi preocupante e não há evidências de ausência de normalidade dos resíduos.

O gráfico de resíduos, mesmo não sendo, nesse trabalho, demonstrado, apresentou distribuição praticamente aleatória, sugerindo resíduos independentes. Diante dessas análises foi possível afirmar que as pressuposições do modelo estatístico foram satisfeita. O valor do R^2 apresentado pelo modelo estatístico foi de 0,9763 indicando que o modelo apresenta boa confiabilidade com os dados experimentais. O erro dos dados ajustados foram inferiores a

1,19% e o modelo de regressão dos dados de atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* é descrito pela Equação 13.

$$\begin{aligned} \text{Ativ. cons} = & -39,33 - 15,97 * T + 30,40 * R + 10,64 * T * R - 14,70 * Q * T \\ & + 10,88 * Q * R + 9,21 * T * R * Q \end{aligned} \quad (13)$$

Na Figura 7 apresenta-se a superfície de resposta da variável de atividade de consumo de triacilglicerol em função da temperatura e razão molar. Excepcionalmente, para o caso da atividade de consumo de triacilglicerol os valores mais negativos são os mais interessantes do ponto de vista de maximização da atividade, isso por que a atividade é medida pelo método das velocidades iniciais, e por definição a velocidade de consumo de um reagente é sempre negativa.

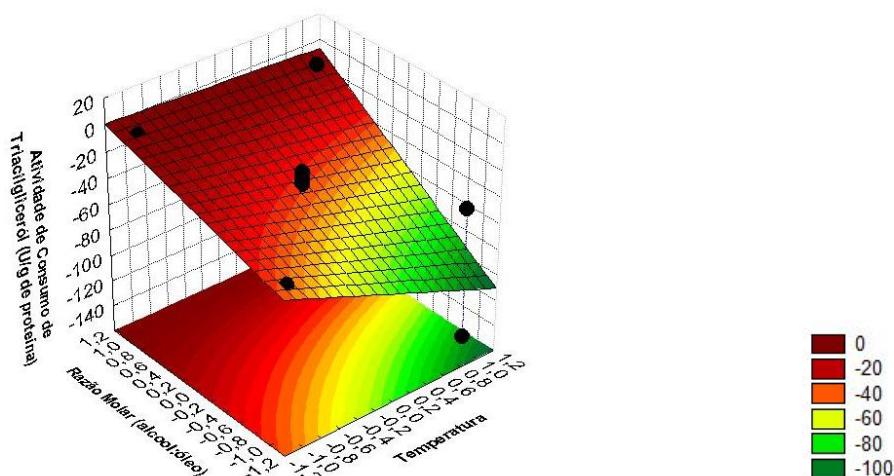


Figura 7: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da temperatura e razão molar.

Pela análise da Figura 7 é possível identificar que um aumento na razão molar provocou um efeito negativo na atividade de consumo, ou seja, reduz à atividade da enzima levando a um valor próximo a zero quando a razão molar foi elevada ao valor mais alto dos testes. A atividade da enzima indica a velocidade da enzima em converter o substrato em produto, sendo os maiores valores de velocidade a qual a enzima poderá realizar essa reação. A velocidade mais alta possível na reação é indicada pela atividade. Pois nos primeiros instantes de reação os efeito deletério do meio reacional ainda não atuaram proeminentemente sobre a enzima. Então, se permite manter grande parte das interações responsáveis pela formação do sítio ativo, lugar em que as reações ocorrem. Então se nos instantes iniciais a velocidade de conversão for pequena, há uma indicação forte de que a enzima esta sofrendo um efeito inativador forte que reduz a velocidade de consumo ao longo da reação.

Quanto as variáveis estudadas, a maior quantidade de álcool no meio reacional indica melhor solvatação do óleo, mas a quantidade de álcool pode dificultar o acoplamento da lipase ao substrato, visto que essa enzima apresenta melhores velocidades de reação quando atuante na interface de mistura dos substratos álcool e óleo.

De acordo com os autores Nie et al., 2006a, Royon et al. 2007 e Bousquet-Dobouch et al. 2001 o álcool pode causar três efeitos sobre a reação de transesterificação enzimática. Sendo eles: o deslocamento do equilíbrio em favor da formação de produtos, o aumento das taxas de desnaturação da enzima (Nie et al., 2006a; Royon et al., 2007) e aumento na inibição competitiva pelo substrato (Bousquet-Dubouch et al., 2001).

A transesterificação enzimática do óleo de soja pela lipase de *Burkholderia cepacia* investigada por Salum *et al.* (2010) indicou que a enzima sofreu inibição pelo etanol, pois sua velocidade diminuía quando se aumentava a relação álcool:óleo, mas os autores relatam que o efeito de desnaturação não foi verificado visto que essa lipase foi reciclada varias vezes sem perdas graves na sua eficácia de reação (Salum et al., 2010).

Quando se analisa a variável temperatura, verifica-se que a enzima apresentou maior atividade quando esses valores foram maximizados. Um cauteloso aumento da temperatura esta ligado com a redução das interações entre os aminoácidos constituidores da molécula enzimática o que pode induzir tanto a desativação por perda da estrutura terciária como pode causar um efeito de maior mobilidade e exposição do sítio ativo.

O efeito ativador da temperatura foi verificado quando um aumento de 37°C para 46°C propiciou que o rendimento de produção de éster etílico saltasse de 20 para 40% em 72 horas de reação. Utilizando óleo de soja e fermentado liofilizado contendo lipase de *Burkholderia cepacia* como catalisador Salum et. al, (2010) verificou que quando a temperatura do meio reacional foi elevada para 50°C o rendimento em 72 horas foi ainda maior, de 77% (Salum et al., 2010). Isso confirma que o aumento da atividade por estar ligado com o aumento no rendimento de produtos.

A atividade de consumo de triacilglicerol em função da temperatura e quantidade de enzima é descrita na Figura 8. O mesmo comportamento discutido anteriormente foi verificado para a temperatura. Também o aumento da quantidade de enzima propiciou um aumento na atividade de consumo de triacilgliceról, indicando à possibilidade de se aumentar

o rendimento de produto quando se utiliza uma quantidade maior de enzima no meio reacional.

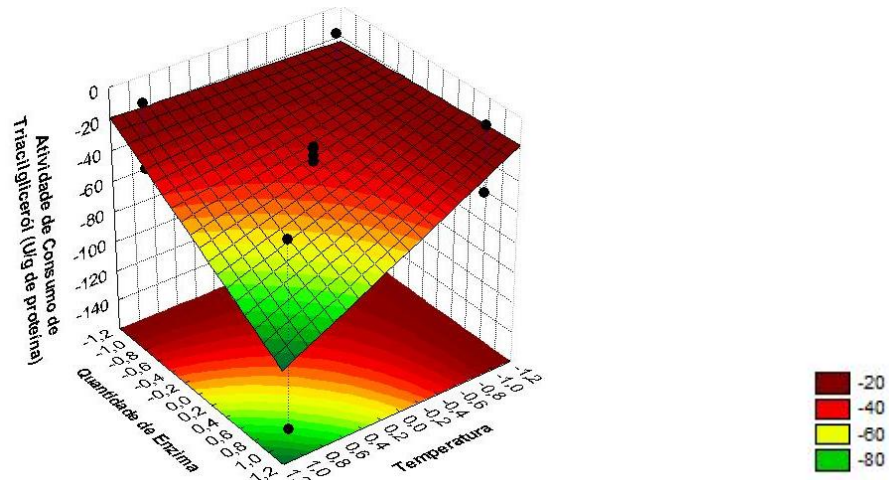


Figura 8: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da quantidade de enzima e temperatura.

A Figura 9 demonstra a superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerol em função da razão molar e quantidade de enzima. Como se pode verificar, nenhuma informação nova pode ser obtida dessa figura. Isso ocorre por que a interação entre os efeitos razão molar e quantidade de enzima, quando comparada com os efeitos individuais, não apresentam forte influência sobre a atividade de consumo de triacilglicerídeos.

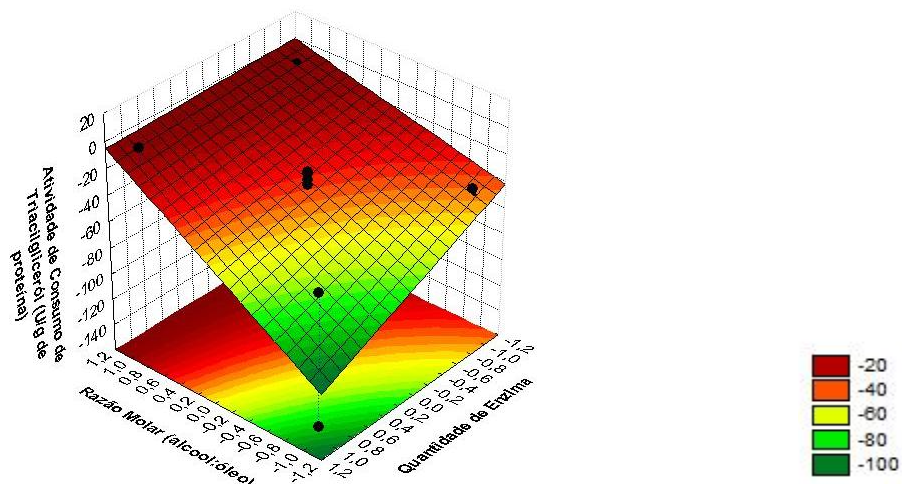


Figura 9: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da razão molar e quantidade de enzima.

O maior valor de atividade de consumo de triacilglicerol encontrado foi de -149,90 U/g de proteína, que foi obtido nas condições do experimento 6, temperatura de 60°C, razão molar de álcool:óleo de 6:1 e quantidade de enzima de 10%. O menor valor de atividade -5,98 foi encontrado para o experimento 7, temperatura de 40°C, razão molar álcool:óleo de 1:12 e

quantidade de enzima de 10%. Os outros valores de atividade de consumo de triacilglicerol obtidos são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados das Variáveis de Resposta para cada Experimento do Planejamento Fatorial.

Experimento	Atividade de Consumo de Triglicerídeos (U/g proteína)	Conversão de Triacilgliceról (%)	Atividade de Produção de Ester (U/g proteína)	Rendimento em Ester (%)
Exp1	-44,65	99,31	53,27	36,49
Exp2	-50,06	89,00	49,18	21,33
Exp3	-8,46	94,47	28,29	33,08
Exp4	-8,14	92,24	33,06	33,35
Exp5	-48,86	87,65	36,04	33,35
Exp6	-149,90	98,81	31,71	40,03
Exp7	-5,98	94,47	18,45	33,06
Exp8	-27,63	97,00	28,13	46,19
Exp9	-27,72	99,17	37,34	47,08
Exp10	-29,44	100,05	33,71	42,98
Exp11	-37,74	98,89	34,25	36,48
Exp12	-33,42	99,37	35,10	42,18

4.7.1.2 Conversão dos Triacilglicerídeos

A análise de variância para a conversão de triacilglicerol é representado na Tabela 10. Para o caso de conversão dos triacilglicerídeos em produtos nenhum efeito se mostrou significativo com fator de confiança de 95%.

Tabela 10: Análise de variância para a conversão de triacilglicerol do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia*.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	p-valor
Temperatura (°C)	0,1685	1	0,169	0,009	0,929
Razão Molar (alcool:óleo)	1,4487	1	1,449	0,078	0,794
Quantidade de Enzima (%)	1,0558	1	1,056	0,057	0,823
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo)	0,0363	1	0,036	0,002	0,967
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	85,9067	1	85,907	4,627	0,098
Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	5,4415	1	5,442	0,293	0,617
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	34,9081	1	34,908	1,880	0,242
Erro	74,2636	4	18,566		
Total SS	203,2292	11			

Se a confiabilidade do teste for reduzida, ou seja, o intervalo de confiança aumentado para 90%, a interação dos efeitos temperatura e quantidade de enzima tornam-se significantes. Na análise da atividade de consumo de triacilglicerol a interação das variáveis temperatura e quantidade de enzima apresentaram ter forte influência, com p-valor igual a 0,01, assim como os efeitos principais. Isso indica que essas variáveis, temperatura e quantidade de enzima, são as mais importantes para a conversão dos triacilglicerídeos e seus efeitos devem ser priorizadas quando se tem interesse no aumento da conversão.

O diagrama de Pareto das estimativas dos efeitos padronizados é mostrado na Figura 10. O gráfico reforça as informações já comentadas anteriormente na tabela de análise de variância em que nenhum efeito apresenta influência na conversão de triacilglicerídeos para o intervalo de confiança de 95%. Pela Figura 10 ainda é possível verificar que a interação de efeitos foram as variáveis que apresentam as maiores influência na conversão.

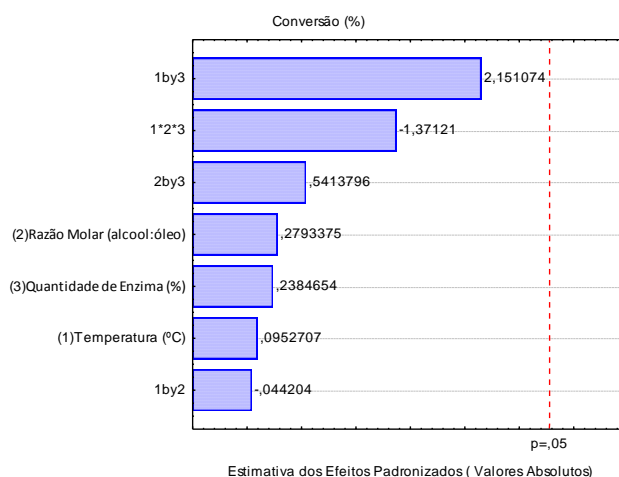


Figura 10: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a conversão do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia*

A normalidade dos efeitos foi satisfeita. Mesmo que a análise mostra quatro pontos fora da normalidade em relação aos dados experimentais e provocam a impressão de não normalidade dos dados. No entanto maioria dos pontos apresenta indícios de relação com os dados experimentais indicando então, normalidade. O gráfico dos resíduos indicam resíduos independentes, a não ser pelos 4 pontos já mencionados.

A princípio pode-se concluir que as prerrogativas do modelo não foram satisfeitas. Mas o conjunto de dados de conversão a qual estamos analisando apresentam uma variação entre a maior e a menor de apenas 11%, como por ser visto na Tabela 9. Ou seja, para todas as condições analisadas, num período de 72 horas, pelo menos 89% dos triacilglicerídeos foram consumidos. Indicando que não importa a condição empregada, a enzima catalisou a reação de transesterificação dos triacilglicerídeos eficientemente em todos os experimentos analisados.

O modelo de regressão dos dados de conversão de triacilglicerídeos do óleo de canola utilizando lípase de *Burkholderia cepacia* é mostrado pela Equação (14).

$$\text{Conv} = 95,86 + 0,14 * T + 0,42 * R - 0,067 * T * R + 3,27 * Q * T + 0,82 * Q * R - 2,08 * T * R * Q \quad (14)$$

O valor do R^2 apresentado pelo modelo estatístico foi de 0,64% indicando que o modelo apresenta razoável confiabilidade com os dados experimentais e o erro é 20%.

A superfície de resposta demonstrada na Figura 11 completa as informações já comentadas. Por nela é possível perceber que mesmo variações entre os limites de máximo e mínimo das variáveis razão molar e temperatura a conversão dos triacilglicerídeos ainda permaneceram praticamente constante, variando em apenas 0,5%.

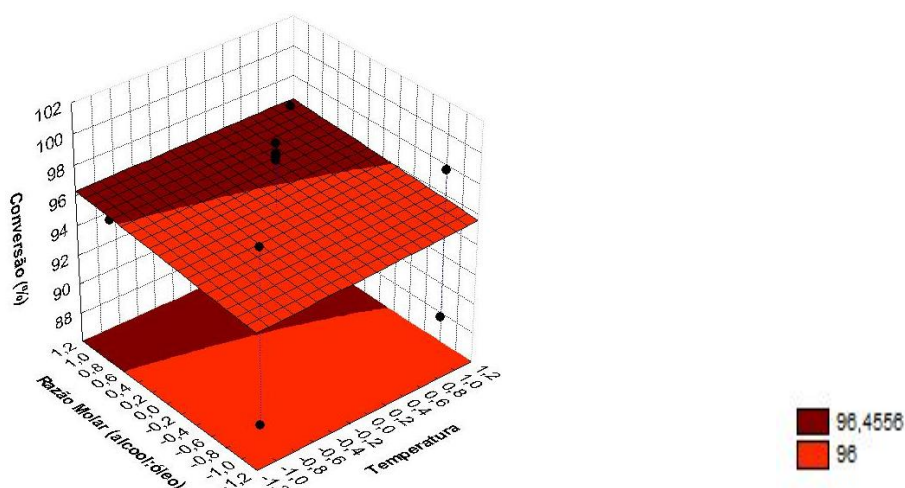


Figura 11: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da razão molar e temperatura

A Figura 12 mostra a superfície de resposta da conversão de triacilglicerol em função da quantidade de enzima e temperatura. Como verificado pela Figura 10 e Tabela 10 que descrevem respectivamente o diagrama de Pareto e a análise de variância, a interação dos efeitos indicam maior influência sob a conversão. Como a temperatura e quantidade de enzima apresentam uma contribuição sinérgica, então é de se esperar uma superfície de resposta com características diferentes das já mostradas anteriormente. O que chama atenção para essa curva de resposta foi o fato de que ela apresenta dois pontos de máximo.

Um ponto de máximo, localizado em uma região em que se tem temperatura e a quantidade de enzima são mais altas e outro em uma região totalmente oposta, ou seja, com reduzida quantidade de lipase disponível no meio reacional e temperaturas baixas. Ainda vale chamar atenção que os dois pontos de máximo apresentam conversões equivalentes e da ordem de 98%.

Do ponto de vista de aplicabilidade da tecnologia, é interessante operar o sistema de transesterificação enzimática nas condições de menor gasto energético e menor consumo de catalisador visando manter a conversão e diminuir os gastos operacionais.

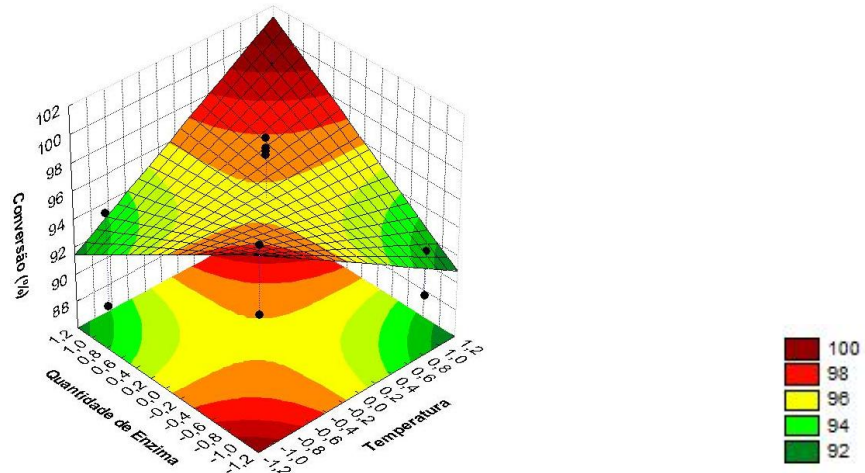


Figura 12: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da quantidade de enzima e temperatura

A superfície de resposta da conversão de triacilglicerol em função da quantidade de enzima e razão molar é mostrada na Figura 13. Novamente variando os níveis entre o máximo e o mínimo poucas mudanças na conversão foram verificadas, havendo uma variação do ponto mais baixo para o mais alto de apenas 3%. No entanto analisando as Figura 13 e Figura 11 simultaneamente verifica-se não haver necessidade de operar o sistema a altas razões molares, pois pouco se mudará no rendimento.

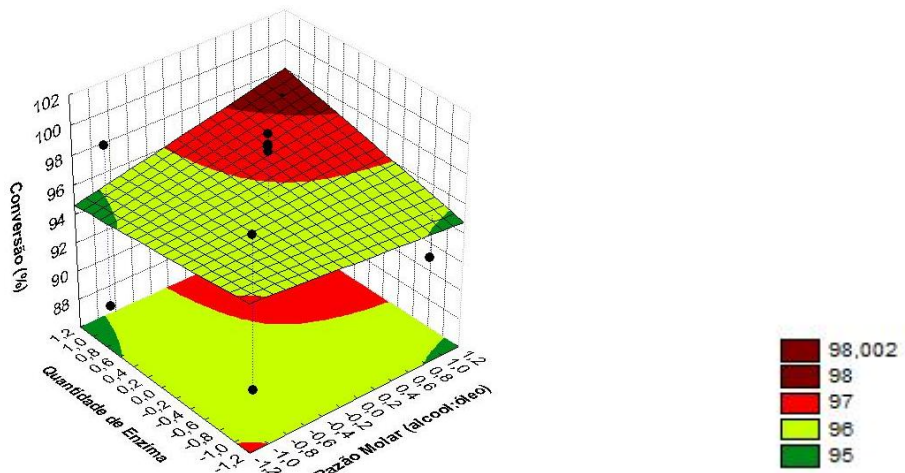


Figura 13: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da quantidade de enzima e razão molar.

Altas razões molares prejudicavam a atividade de conversão de triacilglicerol o que reflete diretamente no potencial reacional da enzima. Possivelmente o efeito de altas razões molares propiciando maior conversão dos triacilglicerídeos seja justificado pelo deslocamento do equilíbrio químico em direção à formação de produtos. Ou seja, esse efeito está superando uma possível inibição competitiva da enzima pelo etanol. Ainda é interessante operar o sistema com condições menos drásticas e propiciar rendimentos equivalentes, pois condições elevadas de razão álcool:óleo e temperatura podem tornar o sistema instável e qualquer variação por mínima que seja pode inativar completamente a enzima.

Para uma melhor compreensão do efeito das variáveis analisadas sobre a conversão de triacilglicerídeos a Figura 14 descreve a conversão em função do tempo de reação para cada experimento analisado no planejamento experimental.

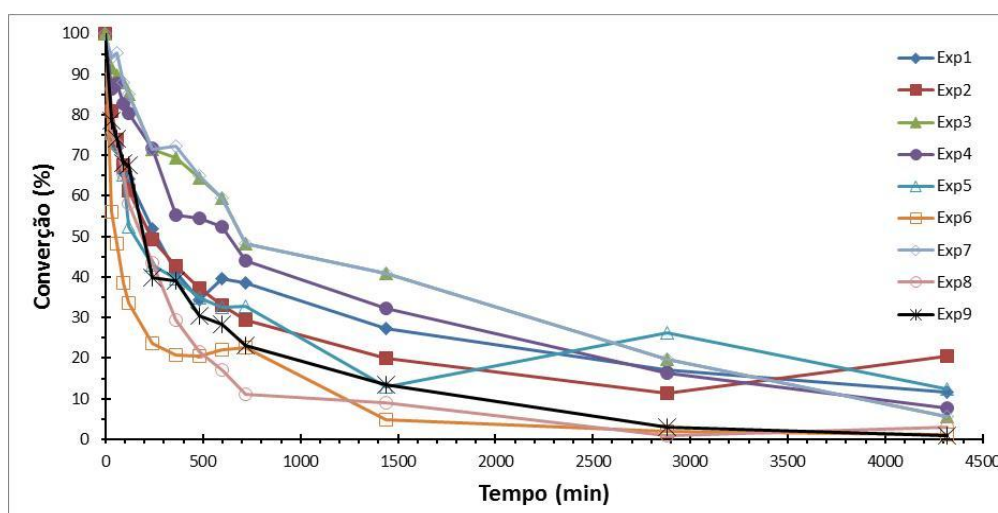


Figura 14: Conversão dos triacilglicerídeos de óleo de canola em função do tempo utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* para todas as condições experimentadas.

O consumo dos triacilglicerídeos pelas lipase de *Burkholderia cepacia* é verificado pela Figura 14 e mostra que aos 4200 minutos grande maioria dos triacilglicerídeos já foram consumido. Uma interpretação mais efetiva dos efeitos importante para o consumo a análise deveria ter sido realizada aos 1500 minutos quando no experimento 6, o nível de 95% de conversão já havia sido atingido. O nosso interesse foi analisar a conversão total e não parcial dos triacilglicerídeos e essa análise já é contemplada quando a variável atividade é estudada. Os resultados da conversão dos triacilglicerídeos podem ser mais precisamente verificados na Tabela 9 que descreve as conversões dos triacilglicerídeos em função dos experimentos delineados no planejamento experimental.

4.7.1.3 Atividade de Produção de Éster

Na Tabela 11 é descrito a tabela de análise de variância para atividade de produção de éster do óleo de canola pela enzima *Burkholderia cepacia*. Para o caso de atividade de produção de éster foi possível verificar que todos os efeitos, com intervalo de confiança de 90%, são significativos, com exceção do efeito de interação das três variáveis que apresentou *p*-valor muito superior a 0,1.

É interessante notar que os efeitos quantidade de enzima e razão molar apresentam *p*-valor muito pequeno, o que demonstra forte influência na variável de resposta atividade de produção de éster.

Tabela 11: Análise de variância para a atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia*.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	<i>p</i> -valor
Temperatura (°C)	34,265	1	34,26	9,18	0,04
Razão Molar (alcool:óleo)	334,721	1	334,72	89,71	0,00
Quantidade de Enzima (%)	449,958	1	449,96	120,60	0,00
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo)	19,082	1	19,08	5,11	0,09
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	28,934	1	28,93	7,75	0,05
Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	116,080	1	116,08	31,11	0,01
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	3,622	1	3,62	0,97	0,38
Erro	14,924	4	3,73		
Total SS	1001,586	11			

Na Figura 15 é descrito o diagrama de Pareto com a estimativa dos efeitos padronizados. Os efeitos quantidade de enzima e razão molar apresentam alto impacto na atividade de conversão em éster, como também a interação desses fatores. É interessante notar aqui que os efeitos que apresentam maior contribuição na atividade de produção de éster possuem valores muito próximos. Isso não foi verificado na atividade de consumo de triacilgliceról, que o efeito razão molar apresentou influência forte e valor do contraste muito superior.

Note também que para o caso da atividade de produção de éster, assim com atividade de consumo de triacilglicerol a razão molar apresenta forte influência nessas duas variáveis de estudo.

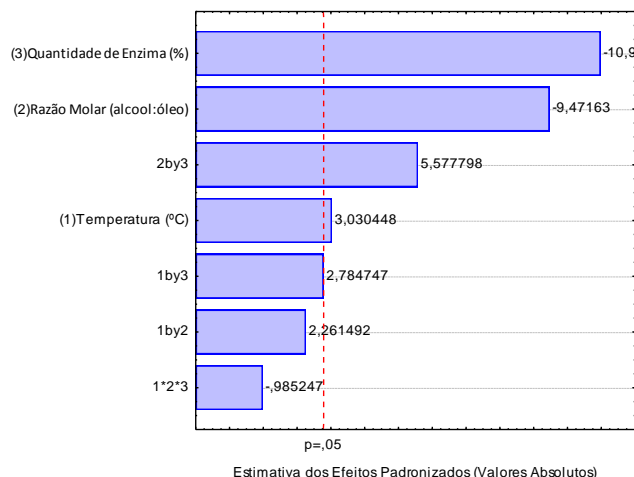


Figura 15: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia*.

A normalidade dos dados é novamente discutida apenas para indicar que as prerrogativas do modelo foram satisfeitas. Por um caráter somente ilustrativo foi possível perceber que um ponto está relativamente afastado da reta de normalidade, no entanto esse afastamento não é preocupante e não há evidências de ausência de normalidade dos resíduos. Os resíduos mostraram distribuição praticamente aleatória, sugerindo resíduos independentes.

Diante dessas análises é possível afirmar que as pressuposições do modelo estatístico estão todas satisfeitas. O valor do R^2 apresentado pelo modelo estatístico foi de 0,9851 indicando que o modelo apresenta boa confiabilidade com os dados experimentais e o erro é inferior a 0,74%. O modelo de regressão dos dados de atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* é descrito pela equação (15).

$$\begin{aligned} \text{Ativ. éster} = & 34,00 + 2,07 * T - 7,50 * Q + 1,54 * R * x + 1,90 * T * Q + 3,80 * R * Q \\ & + 0,88 * T * Q * R \end{aligned} \quad (15)$$

Analisando a Figura 16 em que é mostrado a superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de canola pela *Burkholderia cepacia* em relação a temperatura e razão molar. Por essa foi possível identificar que quanto maior a temperatura maior foi a atividade associada. Quanto a razão molar, quando mais alta a relação álcool e óleo no meio reacional, menor foi a atividade, ou seja, razões mais baixas são interessante quando se pretende maximizar a atividade.

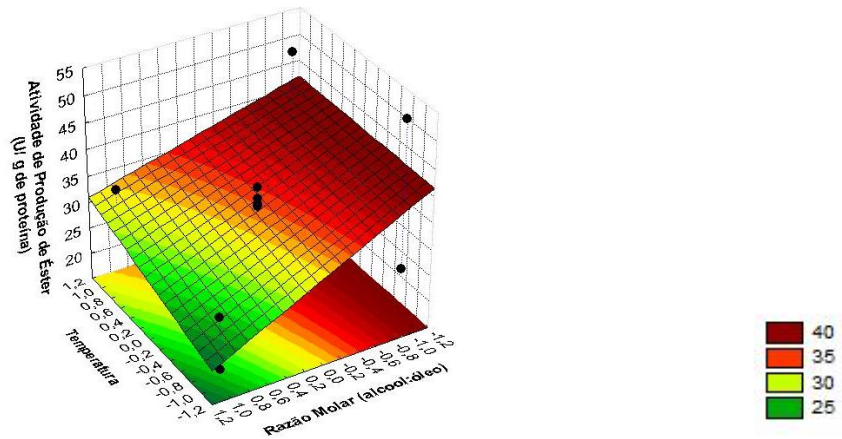


Figura 16: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da temperatura e razão molar.

Na Figura 17 mostra-se a superfície de resposta da atividade de produção de éster em função da temperatura e quantidade de enzima. Foi possível verificar que quantidades elevadas de enzima provocaram um efeito de redução da atividade. O que é bastante intrigante, já que a atividade de consumo de triacilgliceról, a quantidade de enzima apresenta um efeito ativador da enzima.

O efeito de diminuição da atividade também foi verificado nos estudos de atividade hidrolítica utilizando lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Fernandes et al., 2004). E foi explicado pela possível ocorrência de um efeito agregador das moléculas enzimáticas quando essas estão submetidas a um ambiente carregado de enzimas. Esse fenômeno dificulta a catálise e diminui a atividade catalítica da enzima (Prazeres et al., 1992).

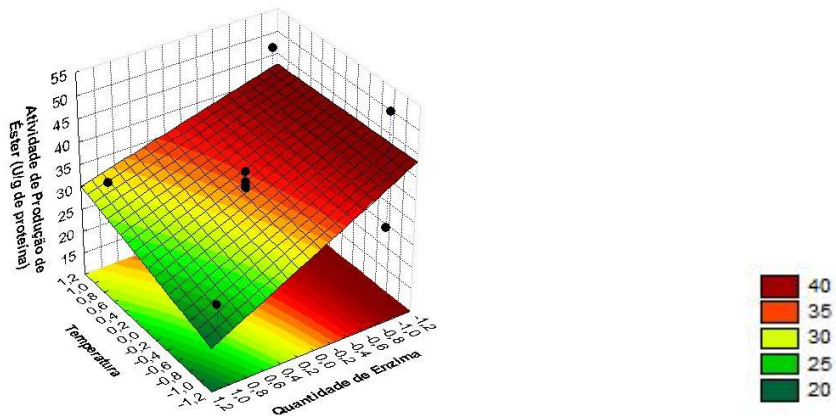


Figura 17: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* em função temperatura e quantidade de enzima.

Na Figura 18 a atividade de produção de éster é mostrada em função da quantidade de enzima e razão molar. Foi possível identificar o forte efeito sinérgico entre essas duas variáveis. Isso somada com a forte influência que as variáveis absolutas têm sob a atividade

de produção de éster é evidenciado pela região mais alta de atividade, que foi duas vezes mais alta que o ponto de menor atividade.

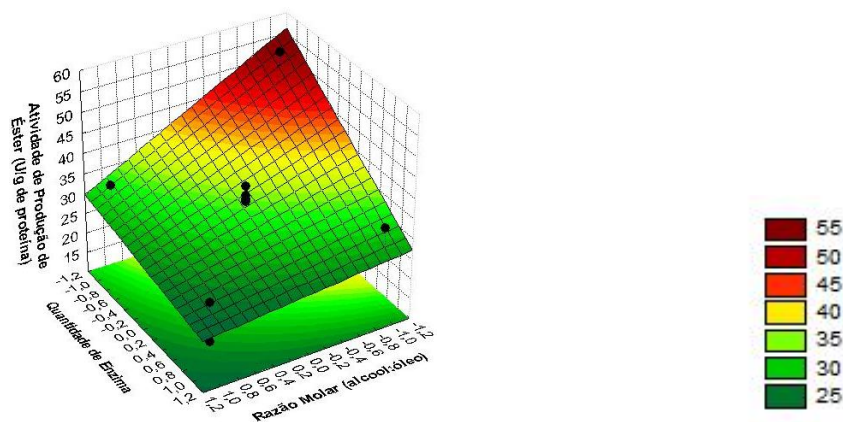


Figura 18: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da quantidade de enzima e razão molar.

Para maximizar a atividade de produção de éster, tanto a razão molar, quanto a quantidade de enzima devem ser minimizadas. Interessante foi verificar que razões mais elevadas deveriam deslocar a reação em direção à formação de produtos como relatado por (Nie et al., 2006a; Royon et al., 2007) o que tornaria a reação mais rápida e conseqüentemente aumentaria a atividade da enzima, no entanto não foi verificado na superfície de resposta acima. Esses resultados indicam que fenômenos de inibição competitiva pelo substrato possam estar ocorrendo como também verificado nos trabalhos de (Bousquet-Dubouch et al., 2001). Essas conclusões também foram obtidas por Salum *et al.* (2010) que verificaram diminuição na velocidade de formação de produtos da reação de transesterificação do óleo de soja quando altas razão álcool:óleo foram usadas.

Os valores das atividades de produção de éster em função dos experimentos do delineamento fatorial estão descritos na Tabela 9. O maior valor de atividade de produção de éster, 53,27 U/g de proteína, foi obtido nas configurações descritas pelo experimento 1 em que a temperatura do meio reacional utilizada foi de 40°C, a razão molar óleo:álcool de 1:6 e 5% de quantidade de enzima. O menor valor de atividade de produção de éster 18,45 U/g de proteína foi encontrada pelo experimento 7, em que a temperatura utilizada foi de 40°C, razão molar 1:12 e 10% de quantidade de enzima em relação ao meio reacional.

4.7.1.4 Rendimento em Éster

Na Tabela 12 esta descrito á análise de variância para o rendimento de éster do óleo de canola pela enzima *Burkholderia cepacia*. Pela análise do p -valor nenhum efeito se mostrou significativo, mesmo quando o intervalo de confiança de 85% foi utilizado. A interação de variáveis temperatura e quantidade de enzima foi o único efeito que, para um intervalo de 80%, apresentou significância.

Tabela 12: Análise de variância para rendimento de éster do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia*.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	p -valor
Temperatura (°C)	3,01	1	3,01	0,06	0,82
Razão Molar (alcoool:óleo)	26,23	1	26,23	0,50	0,52
Quantidade de Enzima (%)	100,68	1	100,68	1,92	0,24
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcoool:óleo)	59,84	1	59,84	1,14	0,35
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	150,56	1	150,56	2,87	0,17
Razão Molar (alcoool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	0,93	1	0,93	0,02	0,90
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcoool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	10,10	1	10,10	0,19	0,68
Erro	209,99	4	52,50		
Total SS	561,34	11			

O rendimento da produção de éster foi calculado com 72 horas de reação. Nesse período a produção de éster pela lípase já havia tornado estável não havendo mudanças significativas por longos períodos de reação como pode ser visto na Figura 19.

É possível verificar rápida produção de éster nos primeiros minutos de reação e depois esses valores vão alcançando estado de equilíbrio. Esse equilíbrio pode ser mais pronunciado em alguns experimentos e menos em outros.

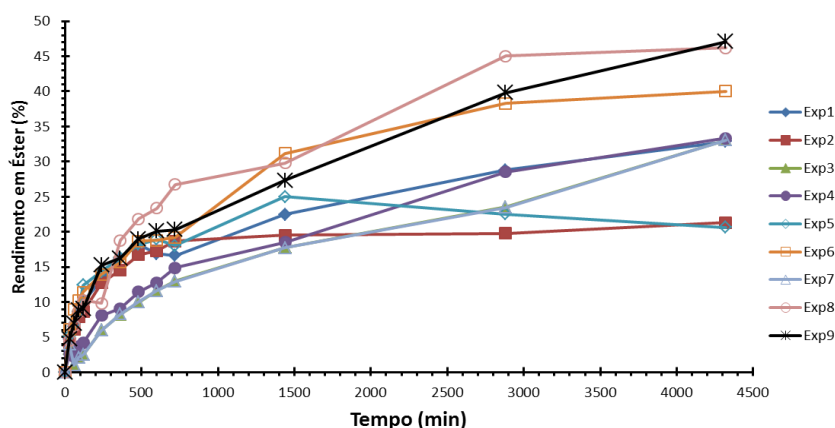


Figura 19: Rendimento de éster do óleo de canola em função do tempo utilizando lípase de *Burkholderia cepacia* para todas as condições experimentadas.

O diagrama de Pareto descrito na Figura 20 mostra as estimativas dos efeitos padronizados. Foi possível identificar uma tendência dos efeitos que apresentariam maior interação em relação ao rendimento em éster. A estatística descritiva da análise de variância indicou que nenhum efeito apresenta significância para essa variável de resposta. Mesmo o modelo descritivo mostrando que nenhuma variável apresenta qualquer influência sobre a variável de resposta ainda foi possível que os resultados indiquem as condições para alcançar os rendimentos mais elevados possíveis.

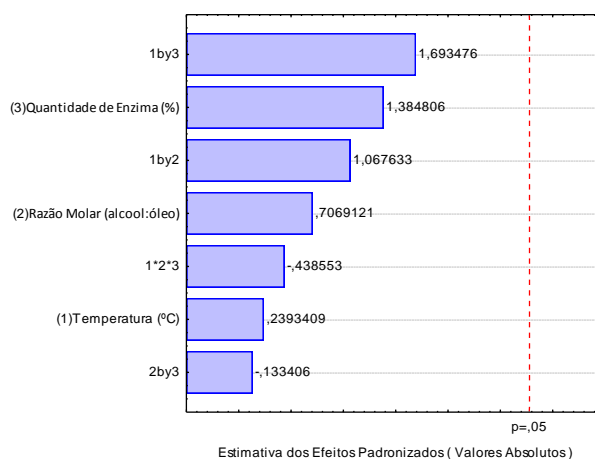


Figura 20: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para rendimento em éster do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia*.

A análise do gráfico de normalidade foi possível identificar que os valores preditos pelo modelo de regressão usado para construção das superfícies de resposta estão distribuídos ao longo da reta de normalidade. O de alguns pontos estarem afastados sugere que o modelo de regressão usado para a construção das superfícies de respostas não foi tão preciso quanto esperávamos, mas apresenta considerável relação aos dados observados experimentalmente.

O valor do R^2 apresentado pelo modelo estatístico de regressão foi de 0,6259, o erro é experimental associado aos dados foi de 21%. O modelo de regressão dos dados utilizado para construção das superfícies de resposta é descrito pela Equação (16)

$$\text{Rend} = 37,13 + 0,61 * T + 1,81 * R + 4,33 * Q + 2,73 * T * R + 4,33 * Q * T - 0,34 * Q * R - 1,12 * T * R * Q \quad (16)$$

A superfície de resposta para o rendimento de éster mostrada na Figura 21. Ela demonstra claramente um ponto de máximo de rendimento quando a razão molar e a temperatura são maximizadas. Observa-se que um crescimento acentuado no rendimento em

ésteres pode ser alcançado se as variáveis temperatura e razão molar forem aumentadas. Evidenciando um efeito sinérgico entre as duas variáveis no aumento do rendimento.

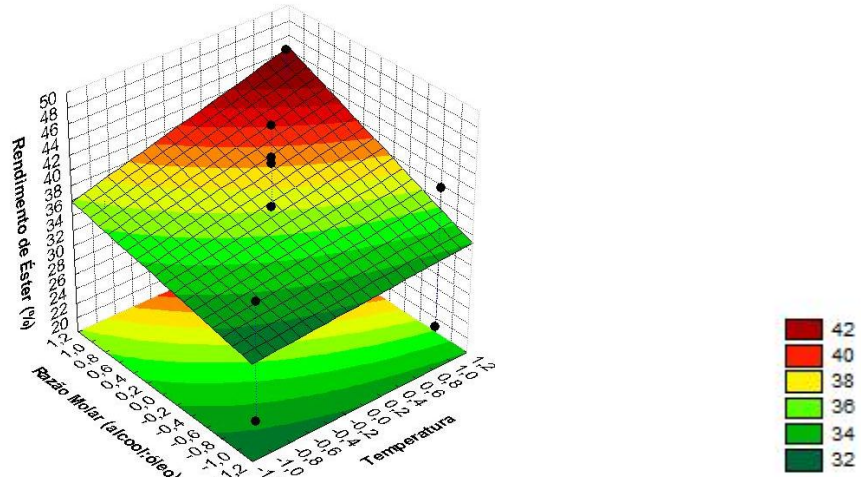


Figura 21: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da razão molar e temperatura.

A superfície de resposta descrita pela Figura 22 demonstra a influência que a quantidade de enzima e a razão molar têm sob o rendimento em éster. Para esse caso foi possível observar que a quantidade de enzima no meio reacional apresentou um efeito de aumento do rendimento. Esse fato é esperado, pois maior quantidade de enzima propicia reações mais rápidas. De acordo com Fu, et al. (1995) o rendimento de um produto enzimático pode ser aumentado se maiores tempos de reação forem usados ou então propiciando que maiores quantidades de enzima sejam adicionadas ao meio reacional, no entanto do ponto de vista industrial e de minimização de gastos. O mais interessante é poder utilizar menos enzima por quantidade de produto, devido ao alto custo dos catalisadores biológicos e dificuldade de recuperação quando utilizados na forma livre.

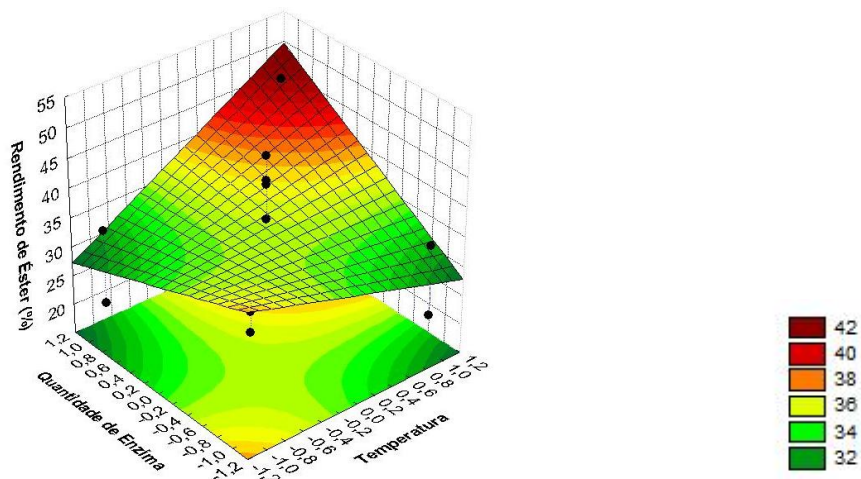


Figura 22: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* em função quantidade de enzima e razão molar.

A superfície de resposta em função da quantidade de enzima e temperatura é mostrado na Figura 23 e demonstram que para otimizar o rendimento foi necessário utilizar no meio reacional quantidades elevadas de enzima e temperatura também mais elevadas.

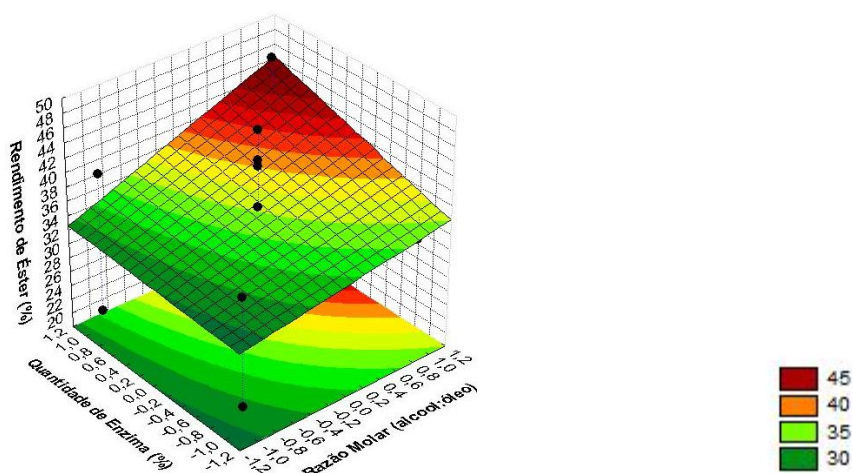


Figura 23: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da quantidade de enzima e razão molar.

Os valores de rendimento de éster podem ser facilmente visualizados na Tabela 9. Os maiores rendimento de éster 47,08% e o menor rendimento encontrado foi de 21,33% sem que co-solventes tenham sido utilizados.

A transesterificação do óleo de girassol realizada por um fermentado liofilizado contendo lipase obtida da bactéria *Burkholderia cepacia* apresentou rendimentos de 40% em 48 horas e 100% em 96 horas, utilizando heptano como co-solvente. A utilização de co-solvente apresenta indícios de melhorias no rendimento em éster, no entanto dificulta a recuperação dos produtos (Köse et al., 2002; Salum et al., 2010). O aumento do rendimento quando se utiliza co-solventes pode estar ligado com a solvatação do éster e do glicerol do meio reacional. Isso permite o deslocamento do equilíbrio da reação em direção a formação de produtos (Knothe et al., 2006).

Utilizando óleo de algodão e metanol como substrato a lipase obtida de *Candida antártica* imobilizada apresentou rendimento de 90% em 10 horas de reação, no entanto t-butanol foi utilizado como co-solvente. Em condições livres de co-solvente a enzima foi totalmente inibida e não ocorreu reação (Royon et al., 2007). Esses resultados demonstram a potencialidade de uso da *Burkholderia cepacia*, que apresenta rendimentos interessantes sem

a utilização de co-solvente que aumentam o custo do processo produtivo e ainda dificulta o processo de purificação dos produtos.

4.7.2 Resultados dos Ensaios de Produção de Ésteres Etilícos com Lípase de *Thermomyces lanuginosus* Utilizando Óleo de Canola

4.7.2.1 Atividade de Consumo de Triacilglicerol

A Tabela 13 mostra a análise de variância para a atividade de consumo de triacilglicerol utilizando óleo de canola catalisado pela enzima de *Thermomyces lanuginosus*. e indica as variáveis que influênciam na atividade de consumo de triacilglicerol

Tabela 13: Análise de variância para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus*.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	p-valor
Temperatura (°C)	4866,10	1	4866,10	69,00	0,00
Razão Molar (alcool:óleo)	114,00	1	114,00	1,62	0,27
Quantidade de Enzima (%)	1366,69	1	1366,69	19,38	0,01
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo)	274,53	1	274,53	3,89	0,12
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	553,20	1	553,20	7,84	0,05
Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	2,87	1	2,87	0,04	0,85
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	110,41	1	110,41	1,57	0,28
Erro	282,10	4	70,52		
Total SS	7569,89	11			

É descrito que a temperatura foi a variável que apresenta o maior efeito na variável de resposta, pois seu *p*-valor é igual a zero. Mas ainda mostra que a quantidade de enzima e a interação desse efeito com a razão molar apresenta forte influência sobre a atividade de consumo de triacilglicerol para um intervalo de confiança de 95%.

A interação das variáveis temperatura e quantidade de enzima, também podem tornar-se significante caso o intervalo de confiança seja aumentado para um valor ao menos de 88%. Já as outras variáveis ou suas interações não apresentam influência, a menos que, o intervalo de confiança seja muito superior ao usado. Porém isso não traz respostas estatisticamente confiáveis.

A análise da tabela de variância da atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de canola utilizando *Burkholderia cepacia* mostrada na Tabela 8 indicou que todos os efeitos foram estatisticamente importantes para a variável de resposta, num intervalo de confiança de 95%. A temperatura e a quantidade de enzima, assim como a interação dessas duas variáveis

também apresentaram um p -valor igual a 0,01, ou seja, apresentaram forte influência sobre a atividade de consumo de triacilglicerol. A diferença entre as lípases foi que, para a *Burkholderia cepacia*, a variável razão molar também apresentou forte influência, mas para a *Thermomyces lanuginosus* isso não ocorreu.

O diagrama de Pareto é mostrado na Figura 24 e é possível verificar quais os efeitos apresentam os maiores contrastes em relação a atividade de consumo dos triacilglicerídeos. A temperatura foi o efeito que apresentou o maior contraste, ou seja, foi o efeito que mais fortemente influenciou na variável de resposta, como já visto na análise de variância. A quantidade de enzima também apresentou uma boa influência assim como a interação de variáveis temperatura e quantidade de enzima.

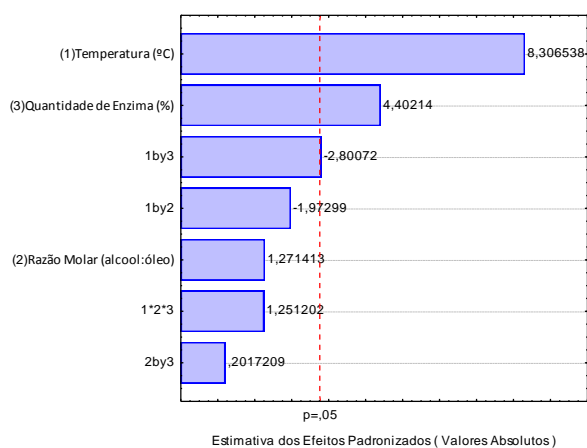


Figura 24: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus*.

A normalidade dos valores preditos pelo modelo de regressão estatística que descreve as superfícies de resposta e os valores observados experimentalmente encontram-se espalhados uniformemente sobre a reta de normalidade. Isso indica não existir qualquer anormalidade sobre os resíduos. Mesmo não sendo demonstrado o gráfico de resíduos em função dos ensaios, os resíduos apresentaram distribuição praticamente aleatória, sugerindo resíduos independentes. Garantindo que as prerrogativas do modelo são satisfeitas.

O valor do R^2 apresentado pelo modelo estatístico foi de 0,9627 indicando que o modelo apresenta boa confiabilidade com os dados experimentais e o erro foi inferior a 1,88%. O modelo de regressão dos dados de atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus* é descrito pela Equação 13.

$$\text{Ativ. cons} = -36,99 + 24,66 * T + 3,77 * R + 13,07 * Q - 5,85 * T * R - 8,31 * Q * T + 0,60 * Q * R + 3,71 * T * Q * R \quad (17)$$

Na Figura 25 mostra a superfície de resposta da atividade de consumo de triacilgliceról em função da razão molar e temperatura. É, por essa figura, possível verificar a forte influência que a temperatura tem sobre a atividade de consumo de triacilglicerol, como já mostrado no diagrama de Pareto.

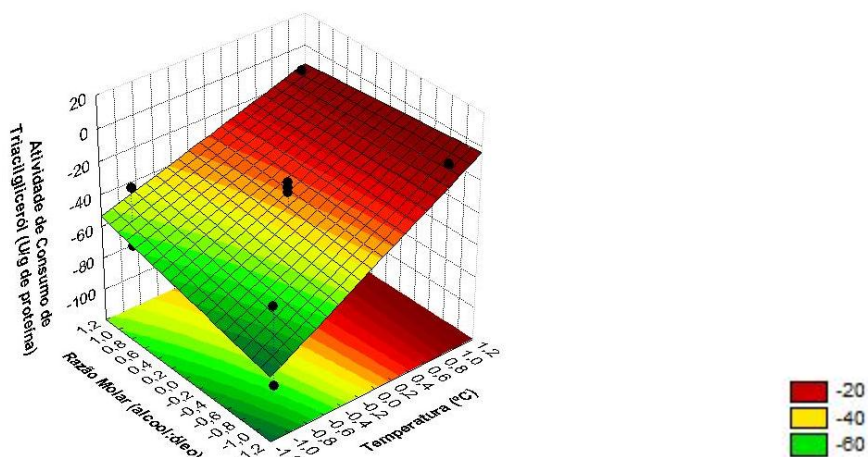


Figura 25: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da razão molar e temperatura.

O que chama a atenção nessa superfície é que, valores altos de temperatura e razão molar, prejudicam a atividade de consumo dos triacilglicerídeos, e baixos valores devem ser usados quanto altos valores de atividade são desejados. É de se espera que utilizando temperaturas e razões molares álcool:óleo elevadas, valores baixos de atividade sejam atingidos devido a inativação da enzima pelo efeito de excesso de álcool e alta desnaturação da estrutura terciária da enzima (Köse et al., 2002; Nie et al., 2006a; Royon et al., 2007).

Mesmo que a lipase de *Thermomyces lanuginosus* tenha sido obtida de um micro-organismo resistente à temperatura, essa característica não foi apresentada por essa lipase nesse teste, pois na temperatura de 60°C, em todos os testes a enzima foi inativada em poucos minutos. Mesmo que, essa enzima, seja muito estável em meios aquosos, resistindo a faixas de pH de 7 a 10 e mantendo atividade razoavelmente bem em temperaturas da ordem de 55 a 60°C (Novozyme, 2001).

A ótima temperatura para a atividade de hidrólise da trioleína pela enzima de *Thermomyces lanuginosus* foi verificada numa faixa de 23 a 58°C e ainda foi verificado que a máxima atividade foi atingida em 37°C, sendo essa a temperatura comum de alta atividade de

lípases de fungo. Ainda altas temperaturas causam um efeito de maior fluidez e distorção da interface o que pode causar rápida inativação ou baixa atividade depois da micro – encapsulação do óleo do meio reacional (Fernandes et al., 2004).

A Figura 26 mostra a atividade de consumo de triacilglicerol em função da quantidade de enzima e temperatura. É possível verificar que baixas quantidades de enzima propiciam atividade de consumo maior. De acordo com Fu *et al.* (1995) é de se espera exatamente o contrario, pois altas quantidades de enzima provocariam um consumo mais rápido dos triacilglicerol.

A atividade hidrolítica da *Thermomyces lanuginosus* foi medida por Fernandes (2007) que também verificou esse efeito e concorda que o esperado deveria ser o contrario. Pois a atividade hidrolítica medida em sistemas aquosos apresenta uma cinética tipicamente de primeira ordem. Altas concentrações de enzima no sistema reacional pode provocar a agregação das moléculas o que diminui a catálise e consequentemente diminui a atividade específica (Prazeres et al., 1992).

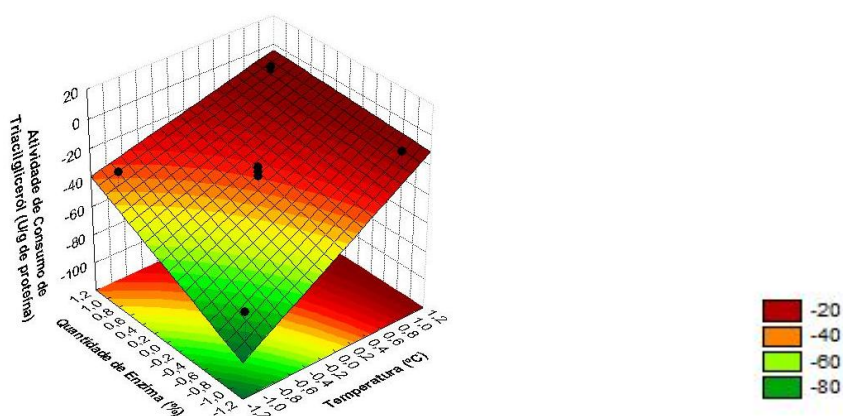


Figura 26: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da quantidade de enzima e temperatura.

Na Figura 27 é exibida a superfície de resposta da atividade de consumo de triacilglicerol em função da razão molar e da quantidade de enzima. Foi possível identificar que altas quantidades de enzima não provocaram um efeito de aumento da atividade como já discutido anteriormente, para a razão molar, o mesmo efeito foi verificado, ou seja, baixas razões molares são mais interessantes para o aumento da atividade de consumo de triacilglicerol.

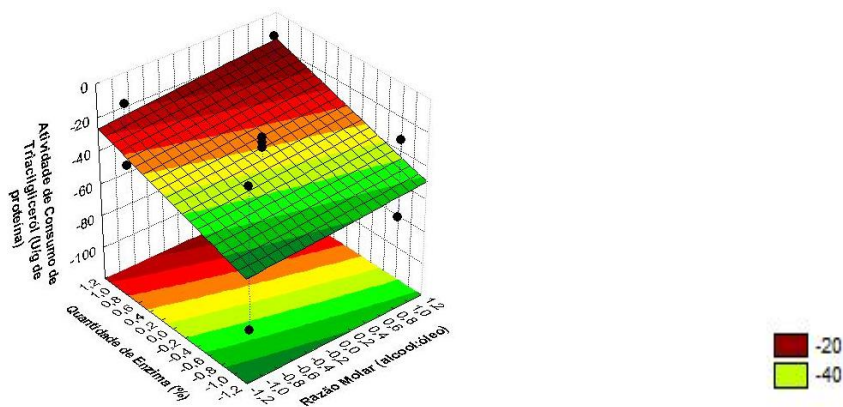


Figura 27: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da razão molar e quantidade de enzima.

Os resultados de atividade de consumo de triacilglicerídeos em relação aos experimentos podem ser verificados na Tabela 14. O maior valor de atividade (-97,03) foi obtido nas condições exigidas pelo experimento 1. O máximo de atividade de consumo de triacilglicerol (-149,90) pela *Burkholderia cepacia* também foi também verificado nas condições do experimento 1 em que utilizou-se a temperatura de 60°C, a razão molar de álcool:óleo de 6:1 e quantidade de enzima de 10%.

Tabela 14: Resultados das Variáveis de Resposta para cada Experimento do Planejamento Fatorial.

Experimento	Atividade de Consumo de Triglicerídeos (U/g proteína)	Conversão de Triacilgliceról (%)	Atividade de Produção de Éster (U/g proteína)	Rendimento em Éster (%)
Exp1	-97,03	99,13	84,97	85,59
Exp2	-11,93	13,68	8,49	2,41
Exp3	-71,53	69,86	77,50	26,21
Exp4	-24,72	30,87	32,86	10,15
Exp5	-48,03	96,37	46,31	80,91
Exp6	-11,05	19,44	8,88	3,64
Exp7	-34,99	98,33	53,14	78,84
Exp8	-6,58	15,93	6,03	4,15
Exp9	-47,56	87,28	53,33	54,07
Exp10	-33,18	81,83	54,26	36,92
Exp11	-27,15	80,12	55,31	34,78
Exp12	-30,16	80,97	54,78	35,85

O menor resultado de atividade de produção (-6,58) consumo de triacilglicerol foi obtido nas condições do experimento 7, em que a temperatura utilizada foi de 40°C, a razão molar álcool:óleo de 12:1 e quantidade de enzima de 10% diferentemente da *Burkholderia cepacia* que o menor resultado de atividade foi obtida para o experimento 6.

4.7.2.2 Conversão dos Triacilglicerídeos

A análise de variância para a conversão dos triacilglicerídeos é descrita na Tabela 15 e foi verificado que o efeito temperatura foi altamente significativo para a conversão dos triacilglicerídeos, mesmo para um intervalo de confiança de 99. Os outros efeitos não apresentam qualquer influência sobre a conversão, a menos que a confiança dos dados sejam reduzida drasticamente.

Tabela 15: Análise de variância para a conversão de triacilglicerol do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus*

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	p-valor
Temperatura (°C)	4866,10	1	4866,10	69,00	0,00
Razão Molar (alcool:óleo)	114,00	1	114,00	1,62	0,27
Quantidade de Enzima (%)	1366,69	1	1366,69	19,38	0,01
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo)	274,53	1	274,53	3,89	0,12
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	553,20	1	553,20	7,84	0,05
Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	2,87	1	2,87	0,04	0,85
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	110,41	1	110,41	1,57	0,28
Erro	282,10	4	70,52		
Total SS	7569,89	11			

O diagrama de Pareto mostrado na Figura 28, demonstra que a temperatura influencia fortemente na conversão dos triacilglicerídeos frente aos outros efeitos, pois o efeito que apresenta a maior influência sobre a conversão depois da temperatura foi a interação entre as três variáveis, e pode-se verificar que esse a magnitude desse efeito representa apenas 20% do efeito temperatura.

Diferentemente do comportamento verificado pela lipase de *Burkholderia cepacia*, para a lipase de *Thermomyces lanuginosus* a temperatura apresentou como uma variável que influencia fortemente na conversão dos triacilglicerídeos. Isso por que a lipase de *Thermomyces lanuginosus* apresentou uma forte inativação pela temperatura e em condições de operação dos sistemas a 50 e 60°C.

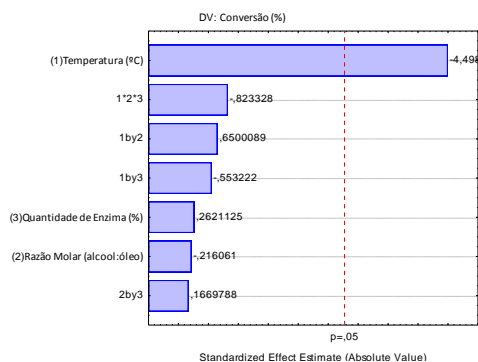


Figura 28: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a conversão do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus*.

O valor do R^2 para o modelo estatístico foi de 0,8449 e o erro associado é menor que 8,08%. O modelo de regressão dos dados de conversão de triacilglicerídeos do óleo de canola utilizando lípase de *Thermomyces lanuginosus* é mostrado pela Equação (18).

$$\text{Conv} = 64,48 - 35,47 * T - 1,70 * R + 2,06Q + 5,12 * T * R - 4,36 * Q * T + 1,31 * Q * R - 6,49 * T * R * Q \quad (18)$$

A superfície de resposta para a conversão dos triacilglicerídeos em função da temperatura e razão molar é descrito na Figura 29 e novamente foi possível verificar a forte inativação provocada pela alta temperatura na lípase, sendo que rendimento da ordem de 20% são observados quando a temperatura mais alta foi utilizada.

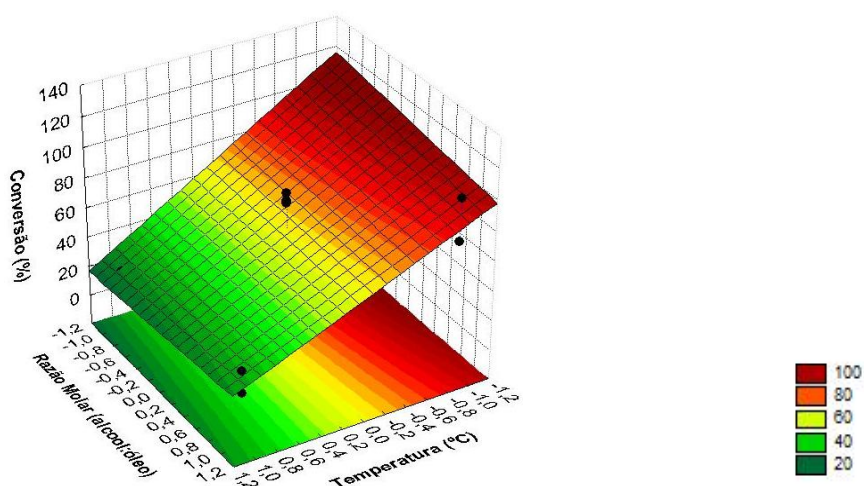


Figura 29: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da razão molar e temperatura.

Novamente o efeito da temperatura sobre a conversão foi verificado na superfície de resposta para a conversão dos triacilglicerídeos em função da quantidade de enzima e temperatura, mostrados na Figura 30. Por essa figura foi possível observar a baixa influência que a quantidade de enzima apresenta sobre a conversão.

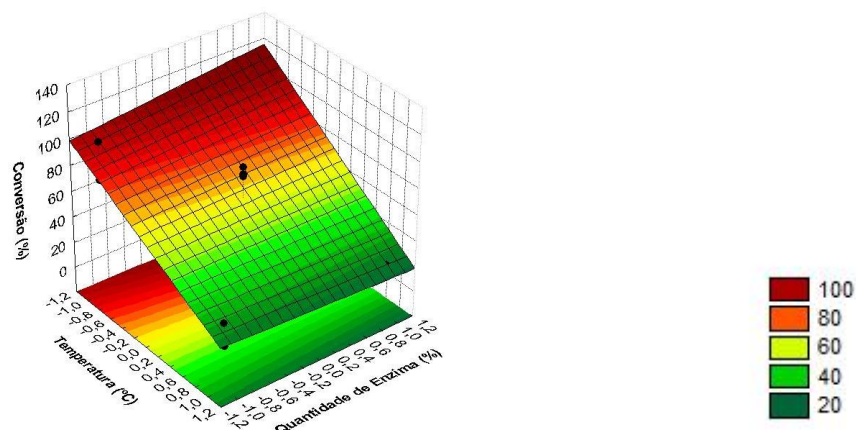


Figura 30: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função quantidade de enzima e temperatura.

Pela Figura 31 fica claro que a baixa influência que a quantidade de enzima e razão molar apresentam sobre a conversão, sendo que a melhor condição para a otimização da conversão dos triacilglicerídeos no sentido de aumento da conversão foi a utilização de alta razão molar e baixa quantidade de enzima.

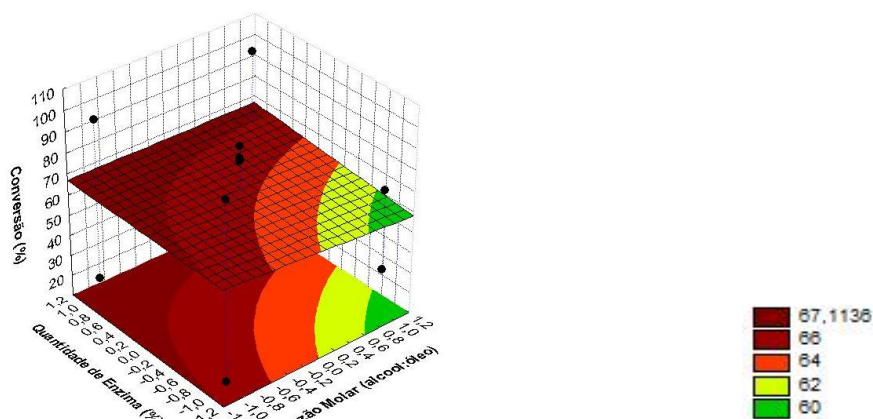


Figura 31: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da quantidade de enzima e razão molar.

O interessante é que alta atividade de consumo leva a esperar que alta conversão do triacilglicerol seja obtida, então os efeitos encontrados como mais importantes para ampliar a atividade também teriam que ser significativo para o estudo da conversão. Para o efeito temperatura e quantidade de enzima o comportamento foi o mesmo, no entanto para razão molar isso não ocorreu. O efeito de aumento de a razão molar provocar maiores conversões sugere que mesmo a enzima sofrendo uma redução na atividade pelo excesso de etanol no meio reacional, não necessariamente essa inativação influenciara na conversão. Isso pode estar ligado ao efeito de deslocamento do equilíbrio químico em direção a formação de produtos (Nie et al., 2006a; Royon et al., 2007).

Pela Figura 32 é possível verificar o consumo dos triacilglicerídeos pela lípase de *Thermomyces lanuginosus* e mostra que a partir dos 1500 minutos, grande maioria dos triacilglicerídeos já haviam sido consumidos. Possivelmente para uma interpretação mais didática dos efeitos importante para o consumo, deveria ter sido realizada nos períodos anterior a 4200. No entanto o nosso interesse foi verificar a conversão total e não parcial. Então esse período da reação já foi contemplado pela análise da atividade de conversão de éster.

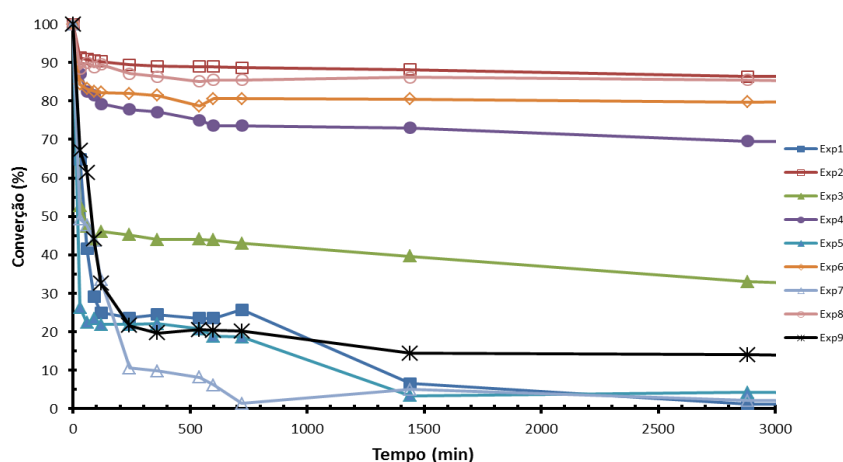


Figura 32: Conversão dos triacilglicerídeos de óleo de canola em função do tempo, utilizando lípase de *Thermomyces lanuginosus* para todas as condições experimentadas.

Os resultados de conversão dos triacilglicerídeos podem ser facilmente verificados na Tabela 14 que indicam que o maior valor de conversão, 99,13% é obtido nas condições do experimento 1, o menor valor de conversão 13,68% é obtido nas condições do experimento 2. Os valores apresentados pela lípase de *Burkholderia cepacia* foram sempre maiores que 89%, mostrando que essa lípase apresentou melhor resultados de conversão que a lípase de *Thermomyces lanuginosus*.

4.7.2.3 Atividade de Produção de Éster

A análise de variância para a atividade de produção de éster é mostrada na Tabela 16. Por ela foi possível observar que os efeitos mais importantes para a variável de resposta são a temperatura e a quantidade de enzima, apresentando respectivamente p -valor igual a zero e 0,06, respectivamente.

Os outros efeitos como razão molar e as interações entre os efeitos principais não apresentaram qualquer importância, a menos que o intervalo de confiança seja ampliado para

70%, dessa forma a interação entre os três efeitos principais tornam-se também importante. Mas intervalos de confiança menor que 85% devem ser vistos com muita cautela e analisados com muito cuidado visto que a confiabilidade dos resultados torna-se muito prejudicada.

Tabela 16: Análise de variância para a atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus*.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	p-valor
Temperatura (°C)	5287,56	1	5287,56	36,84	0,00
Razão Molar (alcool:óleo)	54,56	1	54,56	0,38	0,57
Quantidade de Enzima (%)	1000,43	1	1000,43	6,97	0,06
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo)	61,37	1	61,37	0,43	0,55
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	167,28	1	167,28	1,17	0,34
Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	20,89	1	20,89	0,15	0,72
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	215,59	1	215,59	1,50	0,29
Erro	574,15	4	143,54		
Total SS	7381,81	11			

O diagrama de Pareto com a estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de produção de éster é mostrado na Figura 33. Foi possível identificar que a temperatura novamente apresenta influência forte sobre a atividade de produção de éster, pois essa variável provoca uma forte inativação da enzima logo nos primeiros minutos de reação.

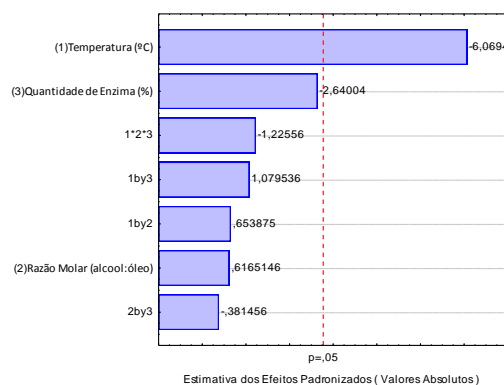


Figura 33: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus*

A quantidade de enzima, mesmo apresentando o p -valor superior a 0,05 ainda pode ser considerada uma variável importante na atividade, não só pelo seu p -valor, mas também por que esse efeito já foi anteriormente verificado na atividade de consumo de triacilglicerol.

As normalidades dos pontos experimentais apresentam-se bem distribuídos ao longo da reta de normalidade indicando que os resíduos possuem distribuição normal. Uma possível superestimação dos valores de atividade pode ocorrer pelo modelo estatístico, pois os pontos experimentais encontram-se um tanto afastados, a acima da reta de normalidade, no entanto

mesmo havendo uma pequena indicação de resíduos não aleatórios, podemos afirmar que as prerrogativas do modelo foram cumpridas. O valor do R^2 apresentado pelo modelo estatístico foi de 0,92 indicando que o modelo apresenta boa confiabilidade com os dados experimentais e o erro é inferior a 3,96%.

O modelo de regressão dos dados de atividade de produção de éster do óleo de Canola pela lipase obtida de *Thermomyces lanuginosus* é descrito pela equação (19)

$$\begin{aligned} \text{Ativ. éster} = & 44,65 - 25,70 * T + 2,61 * R - 11,18 * Q + 2,77 * T * R + 4,57 * Q * T \\ & - 1,61 * Q * R - 5,19 * T * R * Q \end{aligned} \quad (19)$$

Na Figura 34 é mostrada a superfície de resposta para a atividade de produção de éster em função da razão molar e temperatura. Novamente foi possível observar o forte efeito negativo que a temperatura aplica sobre a variável de resposta. Maiores valores de atividade serão obtidos quanto menor a temperatura utilizada. Altas razões molares também possuem um efeito negativo na atividade de produção de éster, mesmo esse efeito não sendo verificado pelo p -valor.

Para o estudo realizado para a atividade de produção de éster realizado pela lipase de *Burkholderia cepacia* os efeitos importantes foram a temperatura, razão molar e quantidade de enzima, como também a interação dos efeitos razão molar e quantidade de enzima. Como podemos perceber, tanto para a lipase de *Burkholderia cepacia* quanto para a lipase de *Thermomyces lanuginosus* a temperatura tem efeito importante.

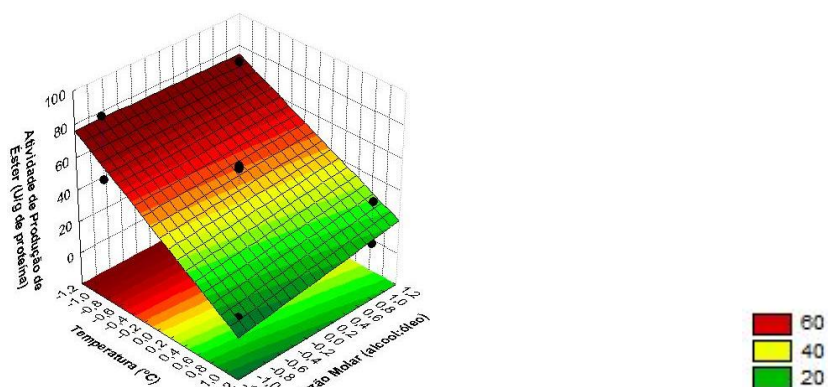


Figura 34: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função razão molar e temperatura.

Na Figura 35 é mostrada a superfície de resposta para a atividade de produção de éster em função da temperatura e quantidade de enzima. A temperatura como já discutido

anteriormente apresenta um efeito bastante proeminente, mas agora foi possível identificar também o efeito da quantidade de enzima sobre a atividade e, novamente como já identificada para a *Burkholderia cepacia*, altas quantidades de enzima prejudicaram a velocidade da enzima em produzir éster.

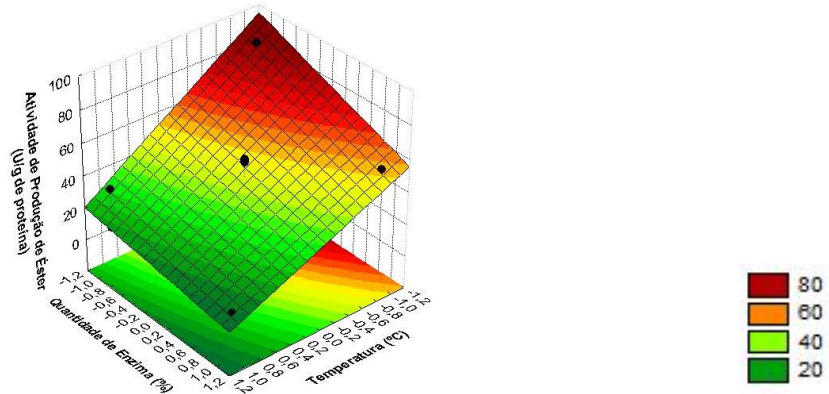


Figura 35: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função quantidade de enzima e temperatura.

(Prazeres et al., 1992) afirma que altas concentrações de enzima no meio reacional pode provocar um efeito agregador das moléculas enzimáticas que dificulta a catálise e diminui a atividade catalítica da enzima. Esse efeito agregador pode ser a justificativa para a diminuição da atividade quando altas quantidades de enzima foram usadas.

Na Figura 36 é mostrado a superfície de resposta para a atividade de produção de éster em função da quantidade de enzima e razão molar. Foi verificado que mesmo a razão molar apresentando influência sobre a atividade de produção de éster essa influência foi muito pequena identificada apenas quando em conjunto com a temperatura.

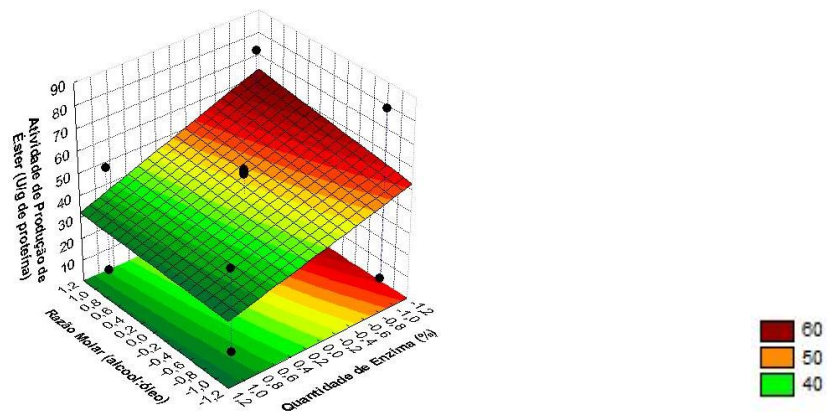


Figura 36: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da quantidade de enzima e razão molar.

Os resultados de atividade de produção de éster podem ser verificados na Tabela 14. Os maiores valores de atividade, 84,97 U/g de proteína, foi verificada nas condições do experimento 1 e o menor valor 6,03 U/g de proteína e foi obtido nas condições do experimento 8. Esses valores são superiores aos obtidos no estudo da atividade de produção de éster da lipase de *Burkholderia cepacia*. O maior valor encontrado foi de 53,10 (U/ g de proteína).

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* apresentou maior seletividade para a produção de éster. Então isso contribui para maiores valores de atividade. Enquanto que a lipase de *Burkholderia cepacia* apresentou maior seletividade para a produção de intermediários reacionais, como os diacilgliceróis e monoacilgliceróis, pois possui alta conversão de triacilgliceról e baixos rendimentos em éster.

O leitor menos atento a tecnologia pode pensar que essa última lipase é menos interessante para aplicação industrial, mas os diacilgliceróis, assim como os monoacilgliceróis são importantes para indústria de alimentos (Hama et al., 2009; Št'ávoová et al., 2011).

4.7.2.4 Rendimento em Éster

A análise de variância para a variável de resposta rendimento em éster é mostrado na Tabela 17 e surpreendentemente para o rendimento em éster com intervalo de confiança de 85% todas as variáveis, incluindo as interações delas, apresentam influência sobre o rendimento em éster. Considerando um intervalo de confiança de 90%, o efeito quantidade de enzima deixa de ser importante e verifica-se que o efeito de diminuição da atividade não necessariamente influencia na conversão dos ésteres, ou seja, o efeito de diminuição da atividade é superado por algum efeito em direção a formação de ésteres.

A temperatura novamente aparece como um efeito importante e *p*-valor igual a zero, no entanto a interação dos efeitos temperatura e razão molar apresentam forte influência sobre o rendimento.

Tabela 17: Análise de variância para rendimento de éster do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus*

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	p-valor
Temperatura (°C)	7887,69	1	7887,69	108,03	0,00
Razão Molar (alcool:óleo)	353,82	1	353,82	4,85	0,09
Quantidade de Enzima (%)	233,14	1	233,14	3,19	0,15
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo)	607,32	1	607,32	8,32	0,04
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	347,46	1	347,46	4,76	0,09
Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	313,54	1	313,54	4,29	0,11
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	520,62	1	520,62	7,13	0,06
Erro	292,06	4	73,01		
Total SS	10555,64	11			

O diagrama de Pareto mostrado na Figura 37 mostra a intensidade em que os efeitos influenciam na conversão dos triacilglicerídeos em éster. A temperatura apresenta um efeito muito forte, no entanto a interação dos efeitos também foi importante. O formato do diagrama de Pareto chama a atenção, pois com exceção da temperatura, que afeta fortemente a variável de resposta, todos os outros efeitos apresentam contribuição quase que semelhante, diferentemente para o caso da *Burkholderia cepacia*, em que os efeitos apresentam diferença considerável entre os efeitos.

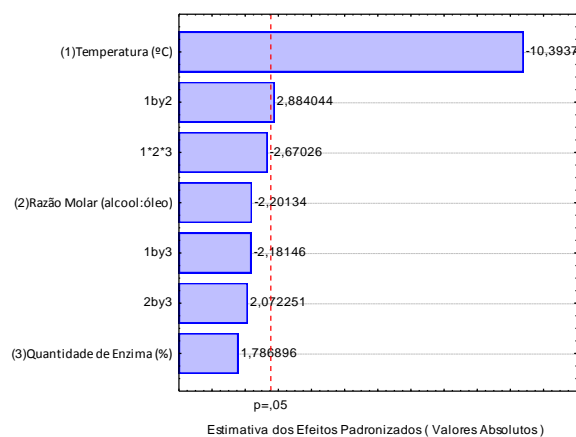


Figura 37: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para rendimento em éster do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus*

Os pontos experimentais do gráfico de normalidade mostrado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** apresentam-se bem distribuídos ao longo da reta de normalidade indicando que os resíduos possuem distribuição normal.

Mesmo não sendo, nesse trabalho, demonstrado o gráfico de resíduos em função dos ensaios, os resíduos apresentaram distribuição praticamente aleatória, sugerindo resíduos independentes. Diante dessas análises é possível afirmar que todas as pressuposições do modelo estatístico estão satisfeitas. O valor do R^2 apresentado pelo modelo estatístico de

regressão foi de 0,9763, o erro é experimental associado aos dados foi de 1,20%. O modelo de regressão dos dados utilizado para construção das superfícies de resposta é descrito pela Equação (20).

$$\text{Rend} = 37,79 - 31,40 * T - 6,65 * R + 5,40 * Q + 8,71 * T * R - 6,59 * Q * T + 6,26 * Q * R - 8,06 * T * R * Q \quad (20)$$

A superfície de resposta para rendimento do éster é mostrado pela Figura 38 e foi possível observar o efeito da temperatura e da razão molar no rendimento de éster. A superfície de resposta mostra um máximo no rendimento quando a temperatura de operação do sistema foi utilizada em seu valor mínimo

É importante chamar a atenção para os valores de rendimentos alcançados. Os rendimentos obtidos pela lípase de *Thermomyces lanuginosus* nas condições em que não houve inativação pela temperatura foram duas vezes maiores que os valores obtidos pelas lípases de *Burkholderia cepacia*. Outra diferença importante foi a seletividade, a lípase de *Thermomyces lanuginosus* apresenta uma maior seletividade para a produção de éster, fato que não foi verificado para a lípase de *Burkholderia cepacia* que apresenta uma maior seletividade para a produção de intermediários monoacilgliceróis e diacilgliceróis.

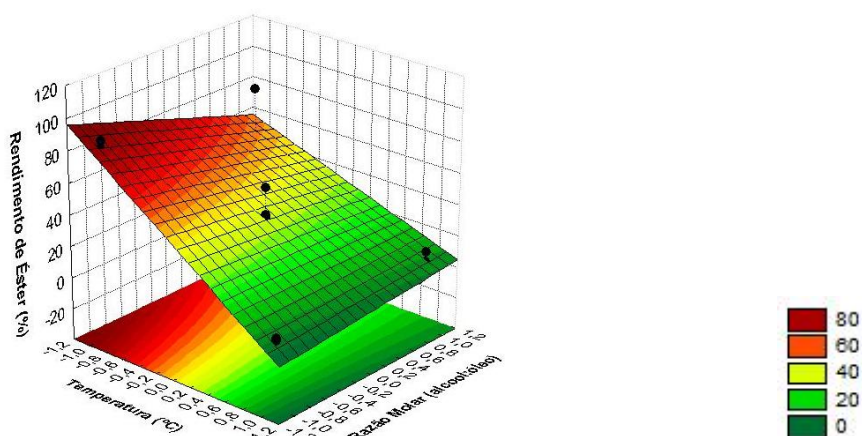


Figura 38: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da razão molar e temperatura.

A superfície de resposta de rendimento em éster em função da temperatura e quantidade de enzima foi mostrada na Figura 39. Por essa figura foi verificado a alta influência da temperatura sobre o rendimento. O que chama a atenção na Figura 39 foi que a quantidade de enzima, ao contrario dos resultados obtidos para todos os outros estudos e inclusive para a atividade de produção de éster, mostraram maiores rendimento quando altas concentrações de enzima foram usadas.

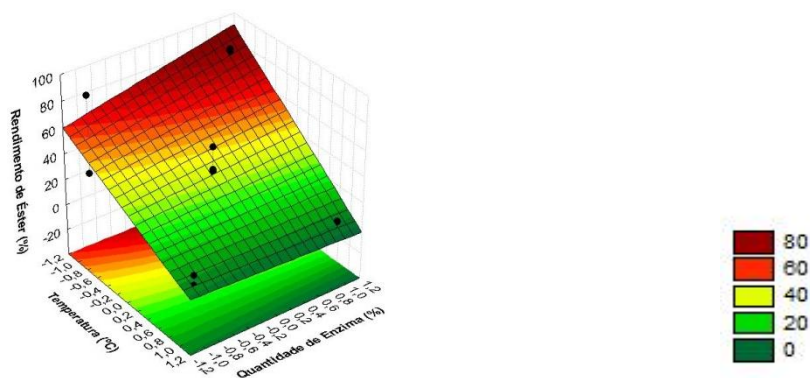


Figura 39: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função quantidade de enzima e temperatura.

Isso pode ser uma indicação que o efeito de aglomeração que pode causar a redução da atividade proposto por Prazeres *et al.*(1992) realmente diminui a atividade da enzima, no entanto, provoca proteção da estrutura da enzima que pode indicar maiores rendimentos ao longo de todo o período reacional.

A transesterificação do óleo de soja utilizando uma mistura de lípase obtida de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor mieber* foi estudada por (Rodrigues & Ayub, 2011) utilizando um planejamento experimental e apresentou resultados semelhantes aos verificados nesse trabalho. Os autores relataram que o rendimento de éster pode ser maximizado quando a combinação de alta quantidade de enzima e de razões molar foram utilizados. O melhor resultado de rendimento 90%, foi encontrada quando 25% de uma mistura enzimática contendo 80% de lípase de *Thermomyces lanuginosus* e a razão molar álcool:óleo de 7,5:1. A temperatura utilizada foi de 30°C.

Na Figura 40 é mostrada a superfície de resposta de rendimento em função da quantidade de enzima e razão molar. Como já esperado devido a previa análise da tabela de análise de variância e do diagrama de Pareto, tanto a razão molar quanto a quantidade de enzima apresentam pouca influência sobre o rendimento em éster.

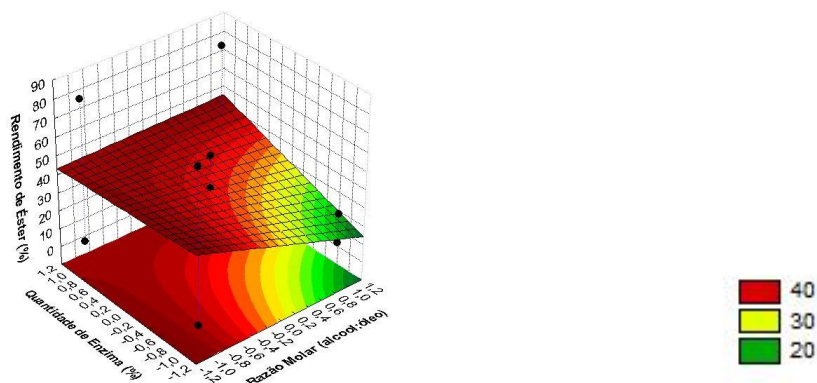


Figura 40: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Canola pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da quantidade de enzima e razão molar.

A Figura 41 mostra o perfil de rendimento em éster do óleo de canola em função do tempo. Foi possível verificar por essa figura a forte inativação sofrida pela enzima nos experimentos em que a maior temperatura de reação foi utilizada, evidenciando que o rendimento nesses casos não foi maior que 8%. Também foi possível identificar o alto rendimento alcançado quando temperaturas inferiores foram utilizadas, como foi o caso dos experimentos 1, 5 e 7.

Em todas as análises realizadas acima, tanto para a lipase de *Burkholderia cepacia* quanto para a lipase de *Thermomyces lanuginosus* a temperatura apresentou papel importante, quando não principal, sobre as variáveis de resposta. Isso é um fato que sugere existir uma influência maior da temperatura no sistema de produção de biodiesel e não somente como esperávamos na estrutura terciária da lipase.

O efeito da temperatura não somente sobre a enzima foi sugerido por Fernandes, (2004) numa reação de hidrólise de trioleína com enzima de *Thermomyces lanuginosus* que verificou que utilizando altas temperaturas, (58°C), a interface água e óleo torna-se mais fluida e desordenada. O que pode causar uma rápida inativação da enzima com baixa ou nenhuma atividade detectada.

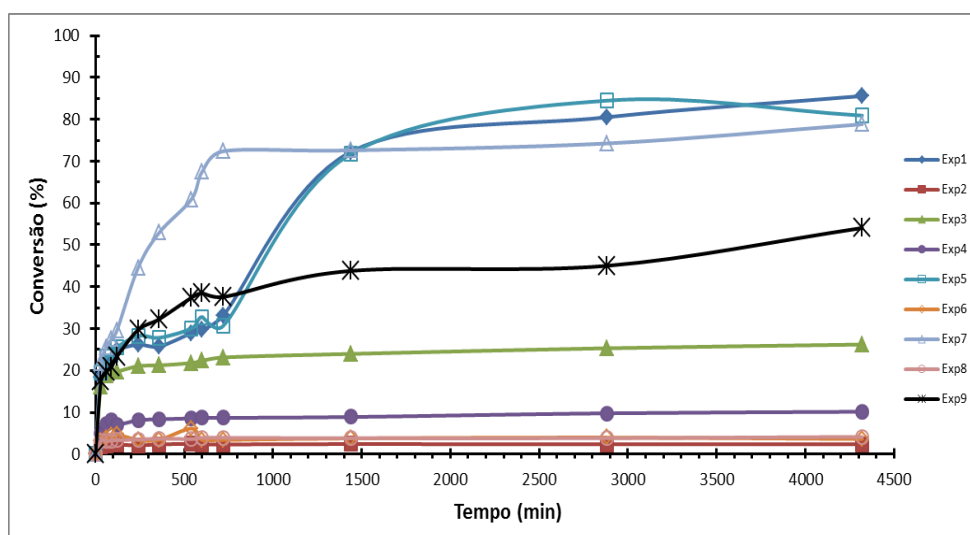


Figura 41: Rendimento de éster do óleo de canola em função do tempo utilizando lipase de *Thermomyces lanuginosus* para todas as condições experimentadas.

O efeito da temperatura sobre a interface água óleo pode ser particularmente importante para reações enzimáticas, pois as lipases tem sua ação tanto na interface álcool-

óleo quanto água-óleo. Vale *et al.*(2009) estudando reações de transesterificação do óleo de nabo forrageiro por etóxido de sódio verificou o efeito negativo da temperatura (faixa de estudo de 30 a 50°C) tanto sobre o rendimento de éster quanto sobre a purificação dos ésteres. Os autores também verificaram que a agitação do meio reacional provocou um efeito negativo na produção de éster como também a associação de efeitos entre temperatura e velocidade de agitação (Valle et al., 2009).

Essa conclusão indica que a temperatura pode provocar um efeito negativo na estrutura da enzima. No entanto o fato de reações por rota química também serem afetadas pela variável temperatura e pela associação entre temperatura e agitação, sugerem que o efeito negativo pode ser gerado na emulsão de mistura entre álcool e óleo necessária para que a reação ocorra.

Os valores de rendimentos, verificados na Tabela 14, apresentados pela lípase de *Thermomyces lanuginosus* são muito superiores dos apresentados pela lípase de *Burkholderia cepacia*, isso quando a primeira não foi inativada.

Os maiores rendimentos de produção de éster do óleo de canola foram de 85,59% enquanto para os meios reacionais catalisados pela lípase de *Burkholderia cepacia*, os maiores rendimentos foram da ordem de 40%. Uma das diferenças mais marcantes foi que a lípase de *Burkholderia cepacia* não apresentou inativação pela temperatura e mesmo em condições bastante diferentes os rendimentos não apresentaram grandes variação. Isso não ocorreu para os meios reacionais contento *Thermomyces lanuginosus* em que houve inativação quando a temperatura acima de 50°C foram utilizados.

4.7.3 Resultados dos Ensaio de Produção de Ésteres Etílicos com Lípase de *Burkholderia cepacia* Utilizando Óleo em Nabo Forrageiro

4.7.3.1 Atividade de Consumo de Triacilglicerol

A análise de variância da atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Nabo forrageiro é mostrada na Tabela 18. Para a transesterificação do óleo de nabo forrageiro as variáveis que apresentam efeito significativo com intervalo de confiança de 95% foram a razão molar e a interação dos efeitos razão molar e quantidade de enzima

Tabela 18: Análise de variância para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia*

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	p-valor
Temperatura (°C)	14,35	1	14,35	0,18	0,69
Razão Molar (alcool:óleo)	1918,80	1	1918,80	24,47	0,01
Quantidade de Enzima (%)	1,86	1	1,86	0,02	0,88
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo)	70,87	1	70,87	0,90	0,40
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	0,68	1	0,68	0,01	0,93
Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	700,20	1	700,20	8,93	0,04
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	3,31	1	3,31	0,04	0,85
Erro	313,59	4	78,40		
Total SS	3023,66	11			

. Os outros efeitos apresentam *p*-valor muito superior a 95%, isso indica que pouco afetam a atividade de consumo de triacilglicerídeos.

Os resultados obtidos na atividade de consumo de triacilglicerol pela *Burkholderia cepacia* do óleo de canola mostrou que todas as variáveis estudadas no planejamento apresentam efeitos significativos. O que é diferentemente do que ocorreu para o estudo dos planejamentos anteriores.

A diferença na análise de variância indica que a composição graxa dos óleos influencia nos resultados de atividade de consumo de triacilglicerol, pois as mesmas variáveis e condições foram utilizados nos dois planejamentos experimentais anteriores, sendo apenas a fonte de triacilglicerol diferenciada. As Figura 4 e Figura 5 mostram a diferença nas composições de triacilglicerídeos e as Tabela 2 e Tabela 4 mostram as diferenças no perfil de ácido graxo entre os dois óleos.

As fontes de material graxo devem ser levadas em consideração quando pretende-se realizar reações de transesterificação por rota enzimática, pois a presença de ceras e fosfolipídios podem influenciar negativamente a atividade da enzima. O comprimento da cadeia de ácido graxo ligado ao glicerol também pode ser decisivo (Salis et al., 2007). A seletividade da enzima pelo tamanho da cadeia dos ácidos graxos depende das propriedades nativas da enzima e esta ligada com a formação do intermediário enzima-substrato, ou seja, esta ligada com a afinidade entre os ácidos graxos e a enzima em si (Dutta & Dasu, 2011).

O diagrama de Pareto representado na Figura 42 mostra que a razão molar foi o efeito que fortemente influencia a atividade de consumo de triacilglicerol e também evidencia a importância que os efeitos significantes apresentam em relação a variável de resposta.

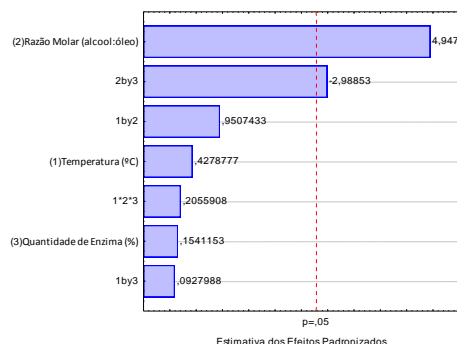


Figura 42: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia*.

Mesmo os planejamentos experimentais do óleo de canola e nabo forrageiro indicando variáveis bastante distintas que influência na atividade de consumo de triacilglicerol foi possível verificar que para o caso do óleo de canola a razão molar também foi a variável que apresentou maior efeito sobre atividade.

Assim como também foi verificado, quando o óleo de nabo forrageiro foi utilizado como substrato da lipase. É ainda interessante mostrar que tanto para a atividade de consumo de triacilglicerol utilizando óleo de canola, quanto para a atividade utilizando óleo de nabo, quanto maior a razão molar álcool:óleo maior foi o efeito de redução da atividade. Isso evidencia o caráter prejudicial que a alta razão molar provoca na reação enzimática de transesterificação.

A análise da normalidade dos pontos experimentais apresentam esses distribuídos ao longo da reta, indicando não haver ausência de normalidade nos dados experimentais. Mesmo não sendo demonstrado o os resíduos em função dos ensaios, esses apresentam distribuição praticamente aleatória, sugerindo resíduos independentes. Diante dessas análises foi possível afirmar que as pressuposições do modelo estatístico estão satisfeita.

O valor do R^2 apresentado pelo modelo estatístico foi de 0,89. Então, indicando que o modelo apresenta boa confiabilidade com os dados experimentais e o erro é inferior a 5,33%. O modelo de regressão dos dados de atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de nabo forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia* é descrito pela Equação (21).

$$\text{Ativ. cons} = 42,97 + 1,33 * T + 15,48 * R + 0,48 * Q + 2,97 * T * R + 0,29 * Q * T - 9,35 * Q * R + 0,64 * T * R * Q \quad (21)$$

A Figura 43 mostra superfície de resposta da atividade de consumo de triacilglicerol em função da razão molar e temperatura. Pela figura é possível observar o forte efeito

negativo que o aumento da razão molar provoca sobre a atividade de consumo de triacilglicerídeos. Também é possível verificar que a temperatura não apresenta efeitos significativos sobre essa atividade. Diferentemente dos resultados apresentados para os experimentos conduzidos com o óleo de canola, nas mesmas condições, em que a temperatura também se apresentou como um efeito importante.

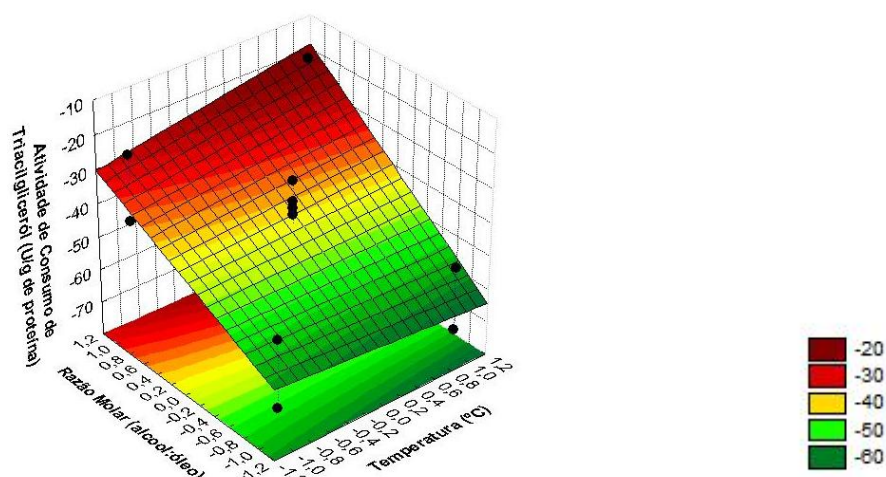


Figura 43: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da razão molar e temperatura.

A superfície de resposta da atividade de consumo de triacilglicerol em função da quantidade de enzima é mostrada na Figura 44. Por ela, é possível observar a pequena influência que a temperatura e a quantidade de enzima apresentam sobre a atividade de consumo de triacilglicerídeos. Assim variando os efeitos entre os pontos mais altos e mais baixos, um ganho muito pequeno na atividade foi verificado, sendo que esse ganho inferior a cinco unidades de atividade enzimática.

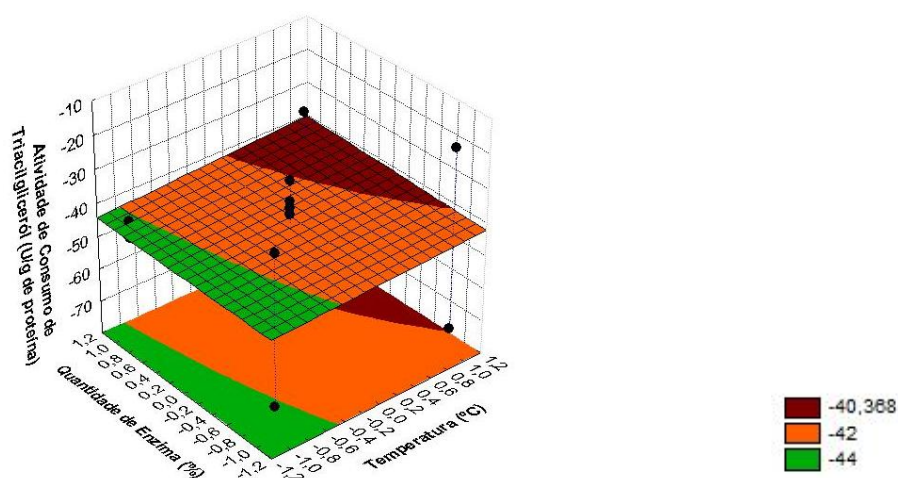


Figura 44: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da quantidade de enzima e temperatura.

No entanto ainda foi perceptível que altos valores de temperatura diminuem a atividade, assim como valores elevados de enzima. Para um comportamento desse tipo, visando uma possível aplicação da tecnologia é interessante operar o sistema com a menor quantidade de enzima e menor temperatura do sistema para reduzir os custos de operação.

A Figura 45 mostra a atividade de consumo de triacilglicerol em função da quantidade de enzima e razão molar. Para essa superfície de resposta é interessante chamar atenção ao fato que altas razões molares apresentam baixos valores de atividade. Isso foi diferente do observado em reações catalisadas por compostos inorgânicos, em que excesso de álcool é empregado para assegurar uma alta conversão e minimizar os efeitos de restrições difusionais (Knothe, *et al.* 2006).

Entretanto, na síntese enzimática, níveis excessivos de álcool podem inibir a enzima e diminuir sua atividade catalítica ao longo da reação. De acordo com Salis, *et al.* (2005), uma alta razão álcool:substrato significa uma maior polaridade do meio que pode estar associada à inativação do biocatalisador ou ainda, à possibilidade de desestabilizar a camada de água essencial do sítio catalítico destes biocatalisadores (Köse et al., 2002; Salis et al., 2005).

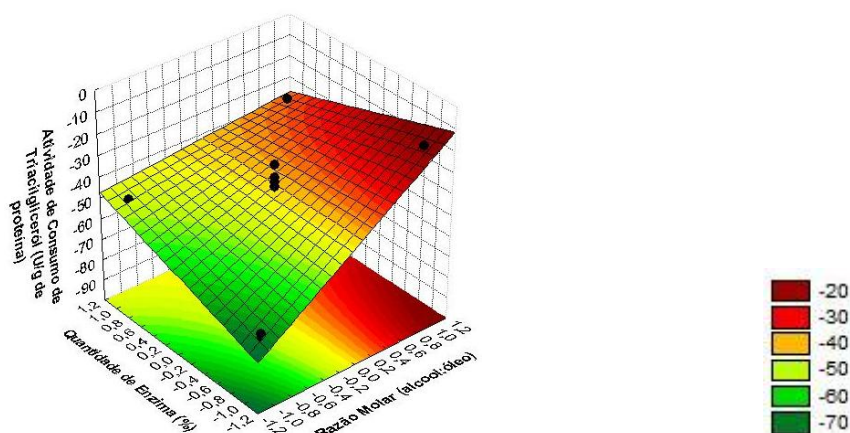


Figura 45: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da razão molar e quantidade de enzima.

A quantidade de enzima apresentou-se como efeito significativo quando associado com o efeito razão molar, e tem influência na direção de aumento da atividade quanto menor a quantidade de enzima utilizada. Prazeres, *et al.* (1992) também verificaram que altas quantidades de enzima no meio reacional provocam diminuição da atividade enzimática e esses autores indicaram que essa alta concentração de proteína pode provocar a agregação das moléculas. A agregação das moléculas pode causar diminuição da atividade catalítica por dificuldade do substrato atingir o sitio ativo da enzima. Os resultados de atividade de consumo

de triacilglicerídeos do óleo de nabo forrageiro em relação aos experimentos podem ser verificados na Tabela 19. O maior valor de atividade (-72,95 U/g de proteína) foi obtido nas condições exigidas pelo experimento 2. O máximo de atividade de consumo de triacilglicerol (-149,90 U/g de proteína) pela *Burkholderia cepacia* utilizando o óleo de canola foi verificado nas condições do experimento 1 em que utilizou-se a temperatura de 60°C, a razão molar de álcool:óleo de 6:1 e quantidade de enzima de 10%. O experimento 2 do planejamento experimental para o óleo de canola catalisado pela lipase de *Burkholderia cepacia* apresentou o segundo maior resultado de atividade -50,06 U/g de proteína mostrando que as configurações de temperatura de 60°C, razão molar álcool:óleo de 6:1 e 5% de enzima apresentam altos valores de atividade. Quando altos valores de atividade são obtidos, esperam-se também altos valores de conversão, a menos que a enzima sofra uma forte inibição no decorrer da reação.

Tabela 19: Resultados das Variáveis de Resposta para cada Experimento do Planejamento Fatorial.

Experimento	Atividade de Consumo de Triglicerol (U/g proteína)	Conversão do Triacilgliceról (%)	Atividade de Produção de Éster (U/g proteína)	Rendimento em Ester (%)
Exp1	-70,28	99,53	37,85	25,01
Exp2	-72,85	95,37	48,19	30,69
Exp3	-25,26	84,01	16,07	25,88
Exp4	-18,49	79,60	23,95	22,45
Exp5	-49,90	98,58	15,96	22,45
Exp6	-53,88	99,83	46,82	34,23
Exp7	-44,87	94,63	28,81	28,58
Exp8	-34,37	98,77	27,89	39,98
Exp9	-38,48	99,84	37,12	32,11
Exp10	-40,51	92,40	32,44	26,40
Exp11	-30,34	91,00	30,89	24,69
Exp12	-36,45	94,40	33,48	27,73

O menor resultado de atividade de produção (-18,49 U/g de proteína) consumo de triacilglicerol foi obtido nas condições do experimento 4, em que a temperatura utilizada foi de 60°C, a razão molar álcool:óleo 12:1 e quantidade de enzima de 5% diferentemente da *Burkholderia cepacia* que o menor resultado de atividade (5,48 U/g de proteína) foi obtida nas condições do experimento 6.

4.7.3.2 Conversão dos Triacilglicerídeos

A análise de variância indicada na Tabela 20 mostra os efeitos significativos na conversão dos triacilglicerídeos. Os efeitos mais importantes para a conversão, com intervalo de confiança igual ou superior a 95% foi a razão molar, a quantidade de enzima e a associação desses dois efeitos.

Comparativamente para experimentos realizados com a *Burkholderia cepacia* e óleo de canola, nenhum efeito apresentou importância com intervalo de confiança de 95%, sendo que o único efeito que apresentou qualquer influência. A interação dos efeitos razão molar e quantidade de enzima só ocorreu quando um intervalo de 90% foi utilizado.

Tabela 20: Análise de variância para a conversão de triacilglicerol do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia*.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	P-valor
Temperatura (°C)	1,26	1	1,26	0,11	0,76
Razão Molar (alcool:óleo)	164,66	1	164,66	14,26	0,02
Quantidade de Enzima (%)	138,58	1	138,58	12,00	0,03
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo)	0,88	1	0,88	0,08	0,80
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	24,37	1	24,37	2,11	0,22
Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	86,32	1	86,32	7,47	0,05
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	1,24	1	1,24	0,11	0,76
Erro	46,20	4	11,55		
Total SS	463,51	11			

É interessante notar que tanto para o óleo de nabo forrageiro quanto para o óleo de canola a interação entre os dois efeitos, razão molar e quantidade de enzima foram significativos. A interação desses efeitos também mostrou-se importante quando analisada a atividade de conversão dos triacilglicerídeos, mostrando e evidenciando a importância dessas variáveis na reação catalisada pela *Burkholderia cepacia*.

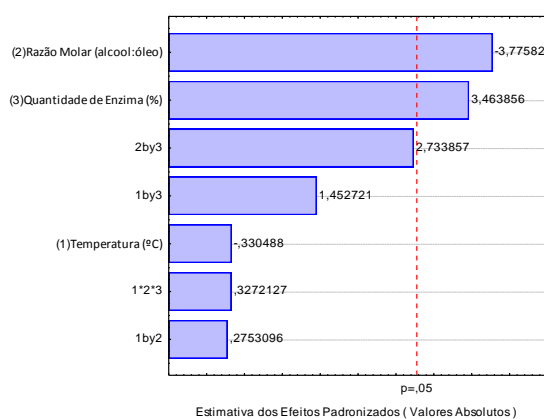


Figura 46: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a conversão do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia*

A análise da normalidade mostra distribuição aleatória dos dados, como também indica a existência de aleatória dos resíduos, garantindo que as prerrogativas do modelo estatístico são satisfeitas. O valor do R^2 apresentado pelo modelo estatístico foi de 0,90 indicando que o modelo apresenta boa confiabilidade com os dados experimentais e o erro

entre os dados experimentais e o previsto pelo modelo foi inferior a 5,13%. O modelo de regressão dos dados de conversão de triacilglicerídeos do óleo de canola utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* é mostrado pela Equação (22).

$$\text{Conv} = 94,00 - 0,39 * T - 4,53 * R + 4,16 * Q + 0,33 * T * R + 1,74 * Q * T + 3,28 * Q * R + 0,39 * T * R * Q \quad (22)$$

A superfície da resposta para a conversão de triacilglicerídeos pela enzima de *Burkholderia cepacia* é mostrada na Figura 47. Por ela foi possível verificar que o aumento da razão molar apresenta diminuição na conversão do triacilglicerídeos. Isso é esperado, visto que o aumento na razão molar também provoca um efeito redutor da atividade. Como descrito anteriormente altas concentrações de álcool podem provocar desestruturação da polaridade do meio e prejudicam a camada essencial de estabilização do sítio catalítico (Köse et al., 2002; Salis et al., 2005).

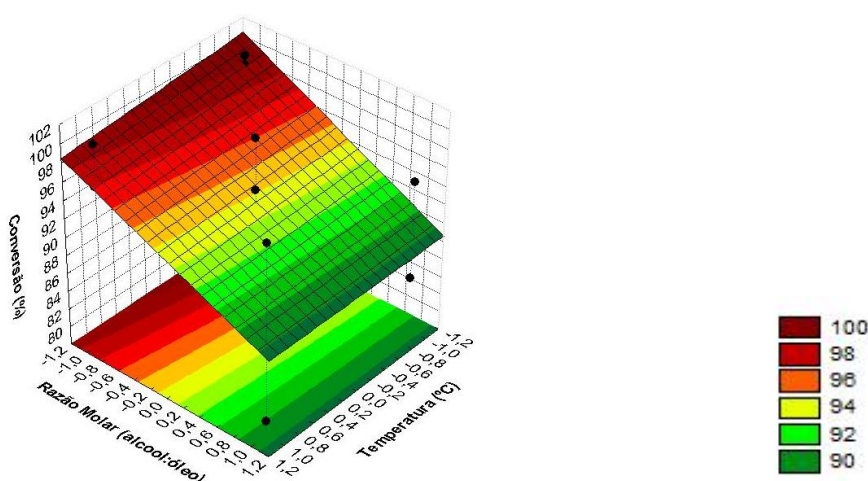


Figura 47: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da razão molar e temperatura.

A Figura 48 mostra a superfície de resposta para a conversão dos triacilglicerídeos indicando que altas concentrações de enzima propiciam altos valores conversão. O interessante é quando a quantidade reduzida de enzima foi utilizado no meio reacional, pois o aumento da temperatura causa um efeito prejudicial no sentido de diminuição da conversão, no entanto quando altas concentrações foram utilizadas o aumento da temperatura causa um efeito no sentido de aumento da conversão.

Estudos de Prazeres, (1992) afirma que, quando altas quantidades de enzima são adicionadas no meio reacional, tendem a formar aglomerados que diminui a velocidade de catálise. Isso pode estar ocorrendo devido ao efeito de diminuição da atividade verificado

quando altas quantidades de enzima foram utilizadas. Essa diminuição foi mostrado e amplamente discutido nas Figura 44 e Figura 45. No entanto, esse efeito de aglomeração pode apresentar também um efeito protetor da estrutura catalítica da enzima que aumenta a conversão quando altas quantidades de enzima e altas temperaturas são utilizadas. E

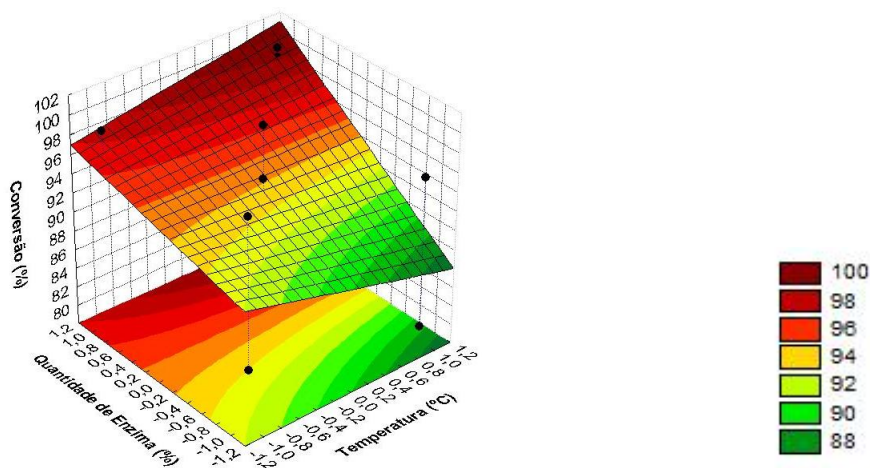


Figura 48: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da quantidade de enzima e temperatura.

A Figura 49 mostra a influência de aumento da conversão quando valores baixas razões molares e quantidade de enzima são utilizados, visto que poucas diferenças na conversão ocorrem caso os valores mais altos das duas variáveis foram utilizados. A Figura 49 mostra um caso especial em que é mostrado não ter necessidade de gasto excessivo com reagentes para otimizar a conversão, sendo possível diminuir o custo sem precisar perder em qualidade do produto gerado.

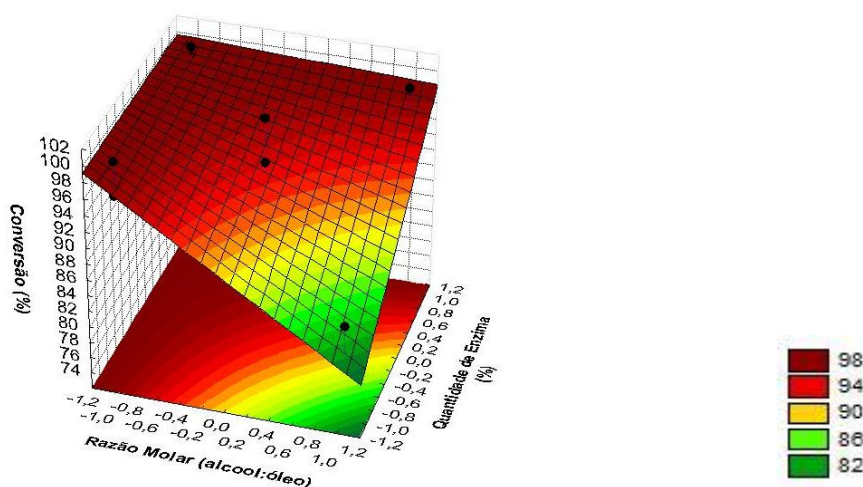


Figura 49: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da quantidade de enzima e razão molar.

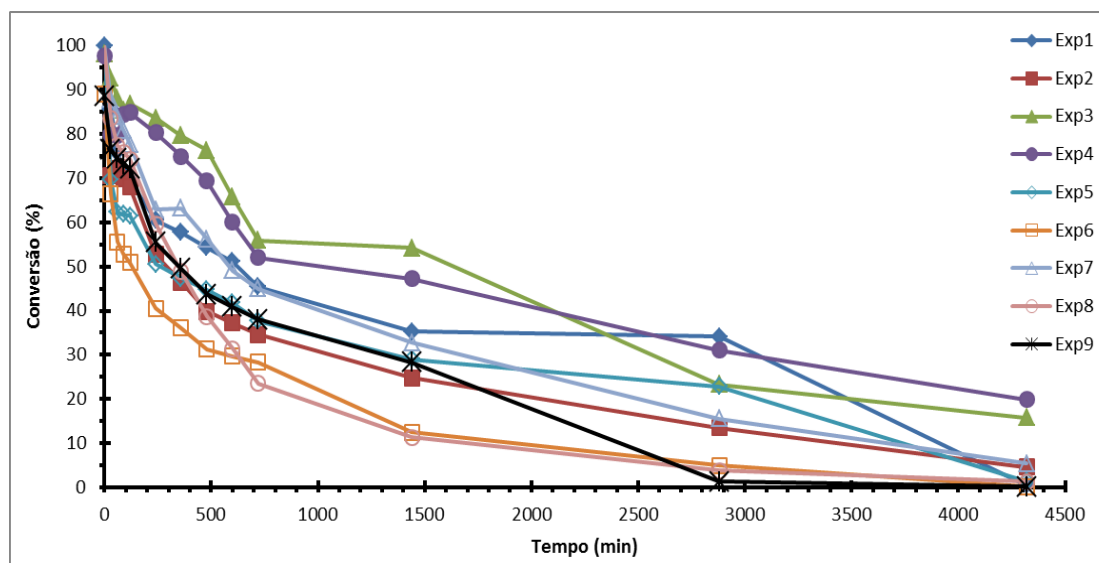


Figura 50: Conversão dos triacilglicerídeos de óleo de nabo forrageiro em função do tempo, utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* para todas as condições experimentadas

Os resultados de conversão de triacilglicerol podem ser verificados na Tabela 19 que mostra a alta capacidade da lipase de *Burkholderia cepacia* em converter os triacilglicerídeos em diacilgliceróis e monoacilgliceróis. As conversões dos triacilglicerídeos do óleo de nabo forrageiro foram muito parecidas as alcançadas quando se utilizou o óleo de canola, nas mesmas condições.

Também muito parecidas as conversões alcançadas pela lipase de *Thermomyces lanuginosus*. Isso mostra que as lipases possuem grande potencialidade em produzir intermediários (mono e diacilgliceróis). Esses intermediários possuem aplicação na produção de alimentos, apresentam sabor parecido ao triacilglicerol, no entanto são mais saudáveis como descrito por (Voll, 2011).

4.7.3.3 Atividade de Produção de Éster

A Tabela 21 mostra a análise de variância para a atividade de produção de éster do óleo de nabo forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia*, e evidencia os efeitos que apresenta maior influência na atividade. No intervalo de confiança de 90% foi possível determinar que a temperatura, a razão molar, quantidade de enzima e a interação dos efeitos temperatura quantidade de enzima e razão molar quantidade de enzima são os efeitos que apresentam maiores influências sobre a atividade de produção de éster. A razão molar foi o efeito que influência mais fortemente a atividade, visto que seu p -valor foi igual a zero.

Comparativamente para o caso da atividade de produção de éster do óleo de canola pela mesma lípase, o mesmo comportamento foi verificado, todos os efeitos principais também foram significativos no mesmo intervalo de confiança, como também a interação dos efeitos razão molar e quantidade de enzima.

Tabela 21: Análise de variância para a atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia*.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	P-valor
Temperatura (°C)	61,32	1	61,32	13,35	0,01
Razão Molar (alcool:óleo)	762,56	1	762,56	165,97	0,00
Quantidade de Enzima (%)	47,26	1	47,26	10,29	0,02
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo)	8,47	1	8,47	1,84	0,23
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	25,54	1	25,54	5,56	0,06
Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	24,25	1	24,25	5,28	0,07
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	22,97	5	4,59		
Erro	952,36	11			
Total SS	1146,93	11			

A Figura 51 mostra o diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados e indica as variáveis que influênciam mais fortemente a atividade de produção. E como já comentado na análise de variância a razão molar apresenta o maior impacto sobre a atividade, como também a temperatura e quantidade de lípase. É interessante analisar o valor do contraste vinculado a variável razão molar, esse é muito maior que o contraste relativo a temperatura, demonstrando que a razão molar álcool:óleo apresenta influência fortíssima na atividade de produção de éster.

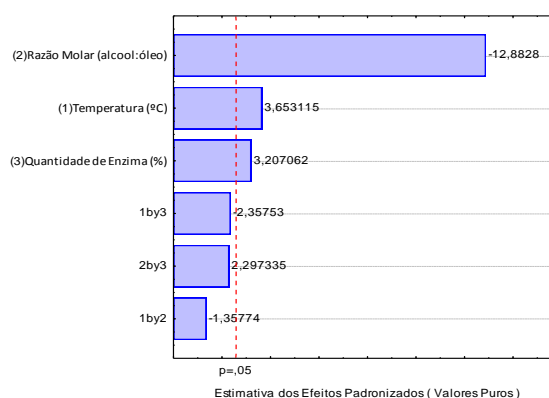


Figura 51: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia*

Os dados experimentais estão bem distribuídos ao longo da reta de normalidade, indicando não haver evidências de ausência de normalidade dos resíduos. Os resíduos mesmo não sendo mostrados apresentaram distribuição praticamente aleatória, sugerindo resíduos

independentes. Então foi possível afirmar que as pressuposições do modelo estatístico estão todas satisfeitas. O valor do R^2 apresentado pelo modelo estatístico foi de 0,9635 indicando que o modelo de regressão das superfícies de otimização apresenta muito boa confiabilidade com os dados experimentais sendo o erro calculado foi inferior a 1,84%. O modelo de regressão dos dados de atividade de produção de éster do óleo de nabo forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia* é descrito pela Equação (23).

$$\begin{aligned} \text{Ativ. éster} = & 31,62 + 6,01 * T - 6,51 * R - 0,82 * Q - 4,28 * T * R + 1,46 * Q * T \\ & + 4,99 * Q * R - 3,66 * T * Q * R \end{aligned} \quad (23)$$

A superfície de resposta mostrada na Figura 52 demonstra a influência que as variáveis temperatura e razão molar impõem na atividade de produção de éster. Para a produção de éster, como mostrado na análise de variância e diagrama de Pareto, a razão molar apresenta o maior efeito, e isso se reflete nesse ponto, em que quanto menor a razão molar utilizada maiores foram as atividades atingidas. O contrario ocorre para a temperatura que quanto maior a faixa utilizada, maior foi a atividade apresentada pela lípase.

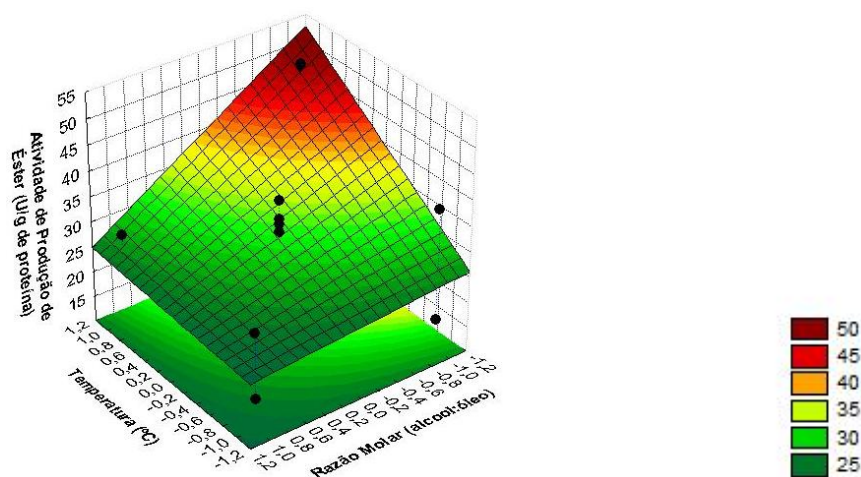


Figura 52: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da temperatura e razão molar.

Na Figura 53 é mostrada a superfície de resposta da atividade de produção de éster em função da temperatura e quantidade de enzima e mostra que altas atividades devem ser encontradas quando altas temperaturas e quantidade de enzima foram utilizadas.

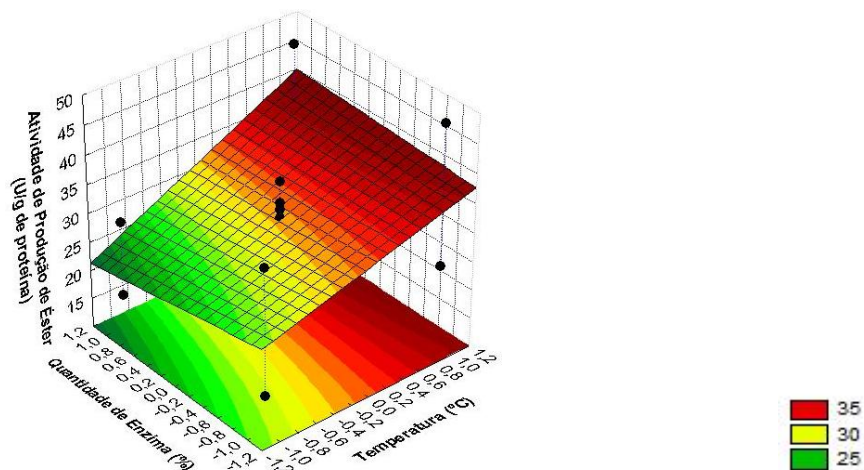


Figura 53: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia* em função temperatura e quantidade de enzima.

A superfície de resposta da atividade de produção de éster em função da quantidade de enzima e razão molar é mostrada na Figura 54. A superfície indica máxima atividade quando baixas razões molares foram utilizadas não importando muito a quantidade de enzima empregada. Do ponto de vista de aplicabilidade da tecnologia, esse é um resultado importante, pois aumentar a atividade significa reações mais rápidas.

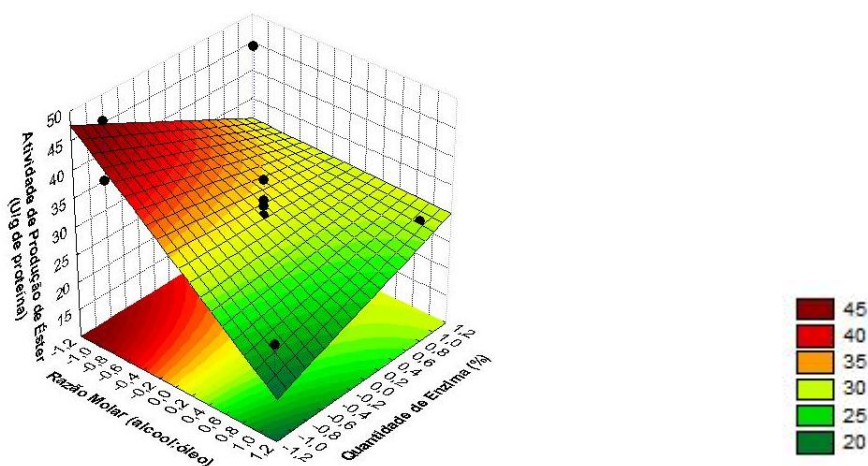


Figura 54: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da quantidade de enzima e razão molar.

Os valores das atividades de produção de éster em função dos experimentos do delineamento fatorial estão descritos na Tabela 19. O maior valor da atividade de produção de éster obtido para lipase de *Burkholderia cepacia* em óleo de nabo forrageiro foi de 48,19 U/g de proteína enquanto que para as mesmas condições, mas utilizando óleo de canola o valor foi de 53,27 U/g de proteínas. O menor valor de atividade de produção de éster foi de 15,96 enquanto que para a atividade de produção de éster do óleo de canola o valor foi de 18,45 U/g de proteína. Os valores de atividade apresentado para os dois óleos foram bastante parecidos.

4.7.3.4 Rendimento em Éster

A Tabela 22 mostra a análise de variância para rendimento de produção de éster pela enzima *Burkholderia cepacia*. Por ela é possível observar que a temperatura, quantidade de enzima, e a interação de efeitos temperatura e quantidade de enzima como também razão molar e quantidade de enzima tornam-se importantes.

Comparando com os resultados obtidos para o rendimento de éster nas mesmas condições utilizando óleo de canola é notado uma diferença grande. Nenhuma variável apresentou significância para o rendimento em éster com intervalo de 90%. No entanto para um intervalo de 80%, a interação de efeitos entre temperatura e quantidade de enzima apresentou efeito significativo. O interessante é que essa interação de variáveis vem se apresentando como um efeito importante para a enzima *Burkholderia cepacia*, tanto quando a variável de resposta é rendimento, atividade ou conversão.

Tabela 22: Análise de variância para rendimento de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia*.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	P-valor
Temperatura (°C)	92,86	1	92,86	12,40	0,02
Razão Molar (alcool:óleo)	5,02	1	5,02	0,67	0,45
Quantidade de Enzima (%)	47,01	1	47,01	6,28	0,05
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo)	15,98	1	15,98	2,13	0,20
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	64,79	1	64,79	8,65	0,03
Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	55,44	1	55,44	7,40	0,04
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	37,45	5	7,49		
Erro	318,55	11			
Total SS	294,04	11			

O Diagrama de Pareto representado na Figura 55 demonstra as variáveis que influenciam o rendimento em éster. A temperatura se apresenta como uma variável que influencia fortemente no rendimento, entretanto a interação entre temperatura e quantidade de enzima e quantidade de enzima e razão molar também apresentam influência.

Uma análise da normalidade demonstram os pontos experimentais bem distribuídos ao longo da reta de normalidade indicando não haver evidências de ausência de normalidade dos resíduos. Os resíduos mesmo não sendo mostrados apresentaram distribuição praticamente aleatória, sugerindo resíduos independentes. Então é possível afirmar que as pressuposições do modelo estatístico estão todas satisfeitas. O valor do R^2 apresentado pelo modelo estatístico foi de 0,8896 indicando que o modelo de regressão das superfícies de

otimização apresenta boa confiabilidade com os dados experimentais sendo o erro é inferior a 5,68%.

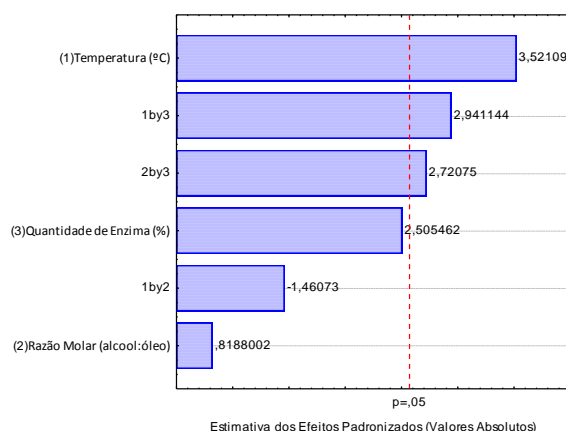


Figura 55: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para rendimento em éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia*

A superfície de resposta para rendimento de éster pela enzima de *Burkholderia cepacia* é mostrado na Figura 56. A superfície mostra que maiores rendimentos são alcançados quando faixas mais elevadas de temperatura são utilizadas como também altas razões molares. Razões molares elevadas provocam redução na atividade de produção de éster, no entanto interferem positivamente no sentido de aumento do rendimento o que leva a acreditar que quantidades elevadas de álcool desloca o equilíbrio em favor da produção de produto. Mesmo que altos rendimentos não são alcançados, máximo de 49%.

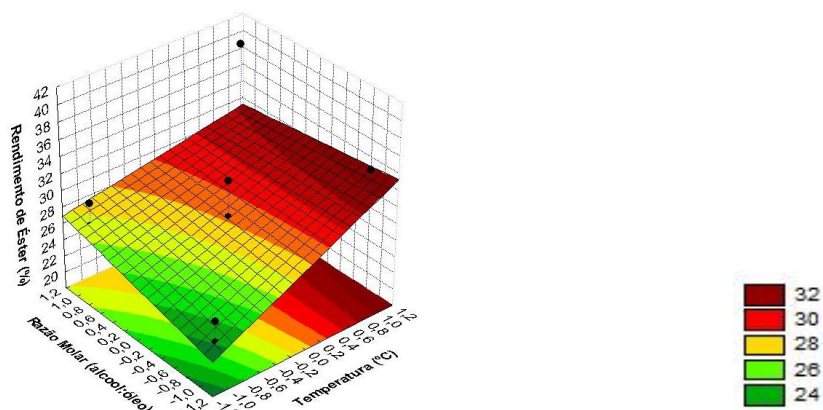


Figura 56: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da razão molar e temperatura.

A superfície de resposta do rendimento em éster em função da quantidade de enzima e temperatura é mostrada na Figura 57 sendo possível verificar que rendimentos mais elevados são esperados quando altas quantidades de enzima como também altas temperaturas. Esse

mesmo comportamento já havia sido verificado para atividade de produção de éster que altas atividades são esperadas quando as condições extremas são utilizadas.

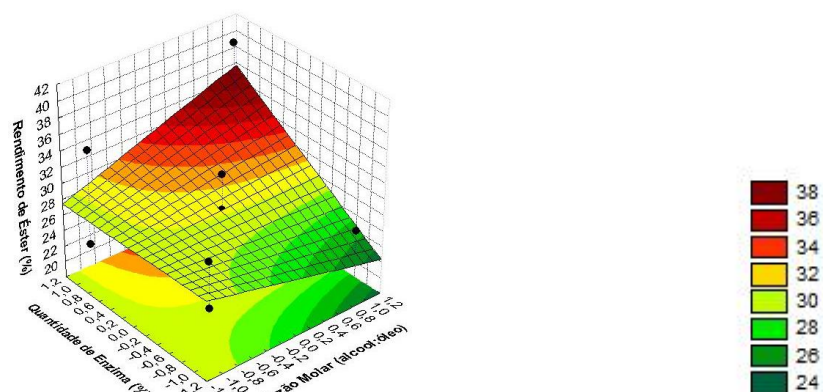


Figura 57: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia* em função quantidade de enzima e razão molar.

A Figura 58 mostra a superfície de otimização para a variável de resposta rendimento de éster em função das variáveis quantidade de enzima e razão molar. A superfície mostra que os rendimentos mais elevados são alcançados quando altas quantidades de enzima e razão molar são utilizados.

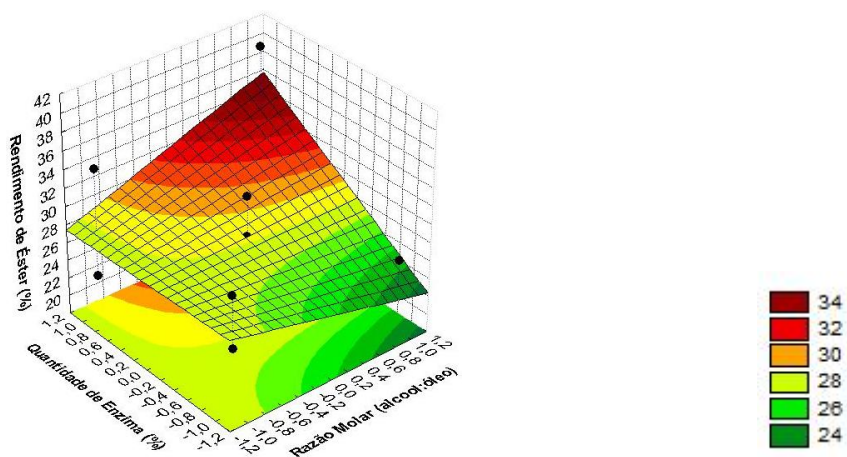


Figura 58: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Burkholderia cepacia* em função da quantidade de enzima e razão molar.

Para o caso de rendimento de éster, o possível efeito protetor dos aglomerados de enzima também é verificado. Pois, em quantidades mínimas de enzima, menores razões molares apresentam rendimentos superiores, no entanto quando altas razões molares são utilizadas uma necessidade de maiores quantidades de enzima é exigida para a manutenção ou aumento do rendimento.

O rendimento da produção de éster foi calculado ao final dos ensaios, ou seja, com 72 horas de reação. Ao contrario do que ocorreu para a lipase de *Thermomyces lanuginosus* e para o rendimento de éster de óleo de canola pela *Burkholderia cepacia*, a produção de éster do óleo de nabo forrageiro pela *Burkholderia cepacia* apresentou aumento do rendimento até 72 hores, indicando que não houve estabilização da produção. Como pode ser verificado pela Figura 59.

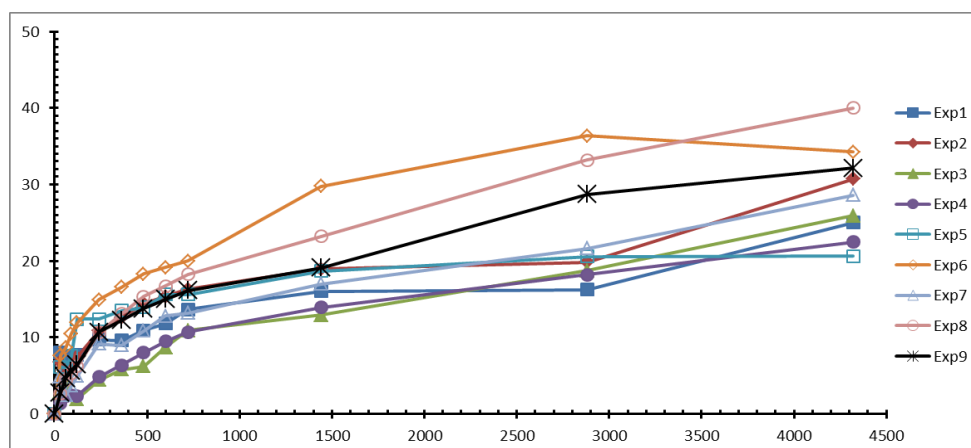


Figura 59: Rendimento de éster do óleo de Nabo Forrageiro em função do tempo utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* para todas as condições experimentadas.

Os valores de rendimento de éster podem ser facilmente visualizados na Tabela 19. O maior rendimento de éster 40% é um pouco inferior ao resultado apresentado pela *Burkholderia cepacia* utilizando óleo de canola 47,08%. O menor rendimento encontrado foi de 22,45%. Resultados parecidos foram encontrados na transesterificação do óleo de girassol utilizando um fermentado liofilizado contendo lipase obtida da bactéria *Burkholderia cepacia*, esse meio reacional apresentou rendimentos de 40% em 48 horas e 100% em 96 horas, utilizando heptano como co-solvente. A utilização de co-solvente, heptano ou isso-propanol, apresenta indícios de melhorias no rendimento em éster, no entanto dificulta a recuperação dos produtos como glicerina, éster e ainda acrescenta uma etapa de purificação posterior à produção (Köse et al., 2002; Salum et al., 2010).

Como já comentado anteriormente, utilizando óleo de algodão e metanol como substrato a lipase obtida de *Candida antártica* imobilizada apresentou rendimento de 90% em 10 horas de reação, no entanto t-butanol foi utilizado como co-solvente. Em condições livres de co-solvente a enzima foi totalmente inibida e não ocorreu reação (Royon et al., 2007). Os resultados apresentados por esse trabalho demonstram a potencialidade de uso da

Burkholderia cepacia em variados tipos de óleos, com rendimentos interessantes, sem a utilização de co-solvente.

4.7.4 Resultados dos Ensaio de Produção de Ésteres Etilícos com Lípase de *Thermomyces lanuginosus* Utilizando Óleo de Nabo Forrageiro

4.7.4.1 Atividade de Consumo de Triacilglicerol

A análise de variância para a atividade de consumo dos triacilglicerídeos do nabo forrageiro pela lípase de *Thermomyces lanuginosus* é mostrada na Tabela 23. A temperatura foi o único efeito que apresenta significância quando um intervalo de confiança de 95% foi utilizado. A menos que o intervalo de confiança seja ampliado para 70% nenhum outro efeito apresentará influência na atividade.

Os resultados já indicavam uma tendência de forte dependência da atividade de consumo de triacilglicerídeos com a temperatura. No uso de óleo de canola como substrato há produção de éster o mesmo resultado foi encontrado. Essa forte dependência surge por que a lípase de *Thermomyces lanuginosus* foi inativada muito rapidamente por temperaturas superiores a 50°C.

Tabela 23: Análise de variância para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus*.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	P-valor
Temperatura (°C)	893,40	1	893,40	33,67	0,00
Razão Molar (alcool:óleo)	7,79	1	7,79	0,29	0,62
Quantidade de Enzima (%)	38,47	1	38,47	1,45	0,29
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo)	0,26	1	0,26	0,01	0,93
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	0,89	1	0,89	0,03	0,86
Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	44,39	1	44,39	1,67	0,27
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	28,08	1	28,08	1,06	0,36
Erro	106,13	4	26,53		
Total SS	1119,40	11			

A importância da variável temperatura na reação de transesterificação do óleo de girassol também foi verificada por Dizge, et al. (2009). Os autores afirmam ter obtido rendimento da ordem de 57% com temperatura de 65°C e garante que a atividade da enzima não sofreu qualquer redução quando operada a essa temperatura talvez por que esses autores utilizaram lipase na forma imobilizada, diferente ao usado nesse trabalho. Em alguns casos, a imobilização, propicia uma maior resistência a temperatura, esse fenômeno é chamado de ativação térmica.

O diagrama de Pareto representado na Figura 60, indica os efeitos que mais proeminentemente influenciam a atividade de consumo de triacilglicerol. É possível identificar por ele, que a temperatura influência fortemente a atividade..

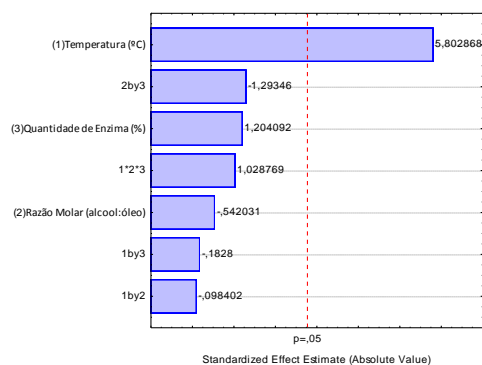


Figura 60: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus*.

Os dados de normalidade dos dados experimentais encontram-se bem distribuídos ao longo da reta de normalidade, com poucos pontos afastados da reta. Então foi possível garantir que os dados não apresentam evidências de ausência de normalidade dos resíduos. O gráfico de resíduos em função dos experimentos, mesmo não sendo mostrado, apresentaram distribuição praticamente aleatória, sugerindo resíduos independentes. É então possível afirmar que as pressuposições do modelo estatístico estão todas satisfeitas.

O valor do R^2 apresentado pelo modelo estatístico foi de 0,90. Esse valor indica que o modelo apresenta boa confiabilidade com os dados experimentais e o erro entre os dados experimentais e o previsto pelo modelo é inferior a 4,58%. O modelo de regressão dos dados de atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de nabo forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus* é descrito pela Equação (24).

$$\text{Ativ. cons} = 16,10 + 10,56 * T - 0,98 * R + 2,19 * Q - 0,18 * T * R - 0,33 * Q * T - 2,35 * Q * R + 1,8 * T * R * Q \quad (24)$$

A Figura 61 mostra a superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerol. A figura evidencia o efeito prejudicial do aumento da temperatura, pois a direção do aumento há redução da atividade. Por essa figura é possível perceber também a pequena influência que a razão molar apresenta sobre a atividade. Pois variando o efeito entre as duas extremidades, menores e maior, utilizadas na análise do planejamento pouco se percebe mudanças na variável de resposta.

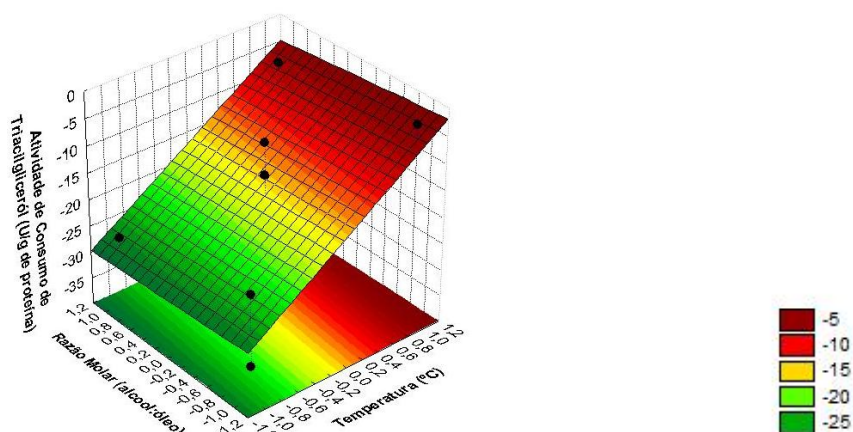


Figura 61: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da razão molar e temperatura.

A superfície de resposta para atividade de consumo de triacilglicerol é mostrado na Figura 62. O efeito prejudicial da temperatura foi novamente pronunciado. Verifica-se que a quantidade de enzima também apresenta uma pequena influência, pois altos valores de quantidade de enzima prejudica a atividade de conversão.

Fenomenologicamente o efeito da quantidade de enzima esta ligado com a formação de aglomerados. Quando grandes quantidades de enzima são utilizadas, esses aglomerados tendem a reduzir a atividade catalítica da lipase (Prazeres et al., 1992). Essa redução ocorre principalmente devido a problemas de restrição difusional. Mas a influência da quantidade de enzima foi muito pequena se comparada com a temperatura.

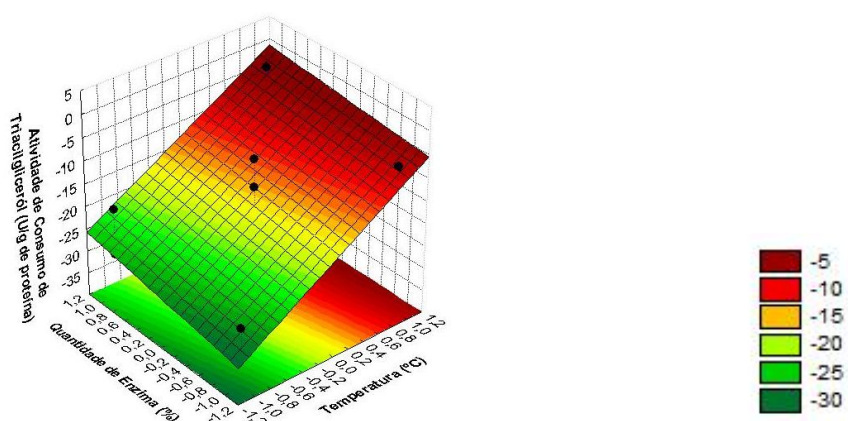


Figura 62: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da quantidade de enzima e temperatura.

A superfície de reposta da atividade de consumo de triacilglicerídeos em função da quantidade de enzima e razão molar é mostrada na Figura 63. Por ela foi possível comparar a influência que a razão molar e a quantidade de enzima apresentam sobre a atividade. Quando comparado com o efeito que a temperatura causa, os efeitos razão molar e quantidade de

enzima se mostram muito pequeno. A superfície ainda indica dois pontos de inativação da enzima representados pelas cores vermelha e amarela nas extremidades da curva. A maior atividade de consumo de triacilglicerol será encontrada quando quantidades reduzidas, tanto de enzima quanto de razão molar foram utilizados.

Os resultados de atividade de consumo de triacilglicerol em função dos experimentos do planejamento experimental podem ser verificados na Tabela 24. O maior valor de atividade, -33,78 U/g de proteína foi encontrado nas condições impostas pelo experimento 1, em que a temperatura do meio reacional foi 40°C, a razão molar álcool:óleo foi de 6:1 e a quantidade de enzima igual a 5%.

Tabela 24: Resultados das Variáveis de Resposta para cada Experimento do Planejamento Fatorial.

Experimento	Atividade de Consumo de Triacilgliceról (U/g proteína)	Conversão dos Triacilgliceról (%)	Atividade de Produção de Éster (U/g proteína)	Rendimento em Éster (%)
Exp1	-33,78	100,00	27,52	64,11
Exp2	-7,87	29,75	2,37	2,78
Exp3	-26,94	80,28	24,58	24,23
Exp4	-9,24	21,70	8,41	2,97
Exp5	-20,27	99,76	20,88	71,38
Exp6	-3,19	17,58	1,43	7,04
Exp7	-30,34	99,75	28,46	70,97
Exp8	-6,49	37,40	0,33	2,41
Exp9	-7,71	35,92	9,54	13,24
Exp10	-19,87	85,66	13,20	27,48
Exp11	-13,79	60,77	11,38	20,36
Exp12	-13,79	60,77	11,37	20,36

Para o caso da atividade de conversão realizada pela *Thermomyces lanuginosus* utilizando óleo de canola, a mais alta atividade também ocorreu para o experimento 1, no entanto o valor obtido foi muito superior -97,03 U/g de proteína, que representa quase 2,83 vezes menor.

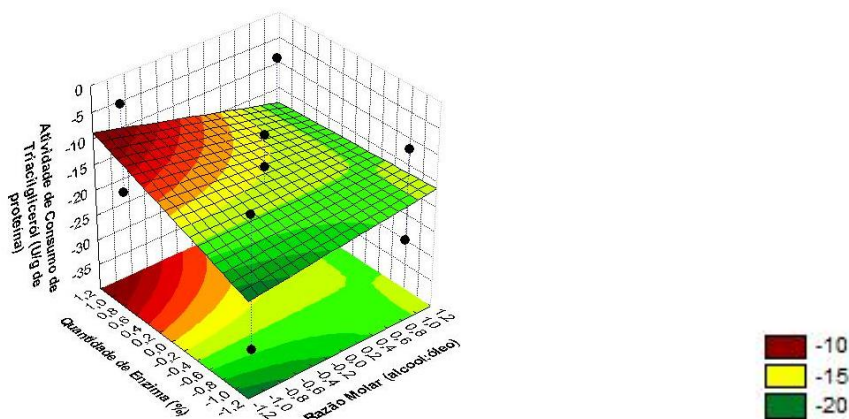


Figura 63: Superfície de resposta para a atividade de consumo de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da razão molar e quantidade de enzima.

Também para o estudo da atividade de consumo de triacilglicerol pela *Burkholderia cepacia* foi verificado um menor valor de atividade da ordem de 50% quando se usou óleo de nabo forrageiro em comparação aos valores apresentados quando se utilizou óleo de canola. Essas drásticas diferenças de atividade esta ligada com o perfil de triacilglicerol presente nos óleos, principalmente pela alta concentração de ácidos graxos de cadeia curta ligada ao glicerol presente no óleo de nabo forrageiro.

A seletividade da cutinase obtida de *Burkholderia cepacia* foi estudada por Dutta e Dasu, (2011). Os resultados desses autores mostraram que essa enzima apresenta maiores rendimento em éster quando ácidos graxos de cadeia curta são utilizados. Diferentemente do que indica os resultados obtidos pela lipase de *Thermomyces lanuginosus* e de *Burkholderia cepacia*. Pois para os nossos estudos o óleo que apresentou em sua constituição maior concentração de ácidos graxos de cadeia curta ligado ao glicerol – nabo forrageiro - foi o que se gerou rendimento menores, assim como os valores de atividade, que também foram inferiores aos de canola. A seletividade das enzimas pelo tamanho de cadeia dos ácidos graxos depende das propriedades nativas de cada enzima, e no caso das reações catalisadas pelas lípases/esterases essa seletividade esta ligada com a formação do intermediário acil-enzima (Dutta & Dasu, 2011).

4.7.4.2 Conversão dos Triacilglicerídeos

A análise de variância para conversão dos triacilglicerídeos é mostrado na Tabela 25. Por ela foi possível perceber que somente a temperatura apresenta significância quando o intervalo de confiança utilizado foi de 95%. Como ocorrido para a conversão dos

triacilglicerídeos do óleo de canola pela mesma enzima. Os efeitos significativos podem não ter sido observados por dois motivos. Ou por que as conversões dos triacilglicerídeos foram calculadas com 72 horas de reação, quando a produção já havia estabilizado ou por que a influência dessa variável foi muito maior que as outras variáveis analisadas. Devido ao baixo p -valor do efeito temperatura, espera-se que essa variável apresenta importância muito superior as outras investigadas nesse planejamento.

Tabela 25: Análise de variância para a conversão de triacilglicerol do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus*.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	P-valor
Temperatura (°C)	9340,10	1	9340,10	30,20	0,01
Razão Molar (alcool:óleo)	7,94	1	7,94	0,03	0,88
Quantidade de Enzima (%)	64,72	1	64,72	0,21	0,67
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo)	124,02	1	124,02	0,40	0,56
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	30,81	1	30,81	0,10	0,77
Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	282,83	1	282,83	0,91	0,39
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	8,33	1	8,33	0,03	0,88
Erro	1237,01	4	309,25		
Total SS	11095,77	11			

O diagrama de Pareto é mostrado na Figura 64. Por ele foi possível verificar que a temperatura apresenta um papel importantíssimo, como já verificado pela análise de variância que mostra o p -valor foi muito pequeno. Para o caso do óleo de canola utilizando as mesmas condições somente a temperatura apresentou significância, indicando não haver diferenças no mecanismo de atuação da enzima na conversão dos diferentes óleos.

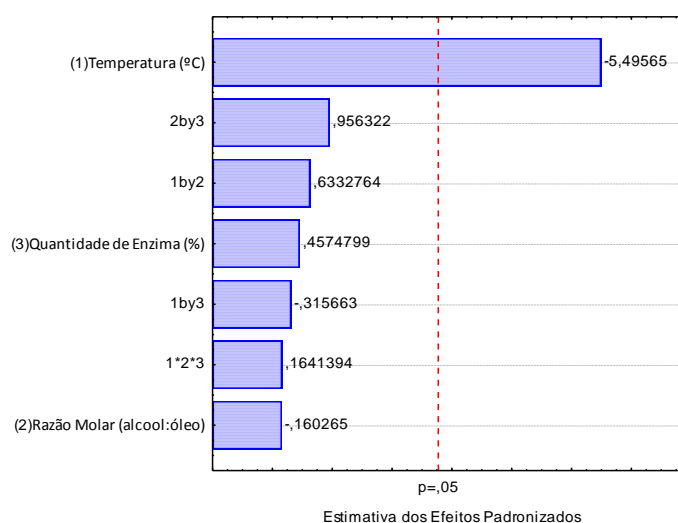


Figura 64: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a conversão do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus*.

O gráfico de normalidade indicou os dados bem distribuídos ao longo da reta de normalidade sendo uma distribuição em forma de nuvem ao longo da reta de normalidade indicando distribuição normal. Os valores de resíduos em função dos experimentos novamente não foram mostrados, no entanto indicam haver distribuição aleatória dos resíduos. Ou seja, as prerrogativas do modelo são satisfeitas. O valor do R^2 apresentado pelo modelo estatístico foi de 0,89 indicando que o modelo estatístico apresenta boa confiabilidade com os dados experimentais e o erro foi inferior a 5,73%.

O modelo de regressão dos dados de conversão de triacilglicerídeos do óleo de nabo forrageiro utilizando lipase de *Thermomyces lanuginosus* é mostrado pela Equação (18).

$$\text{Conv} = 60,78 - 34,16 * T - 1,00 * R + 2,84 * Q + 3,94 * T * R - 1,96 * Q * T + 5,95 * Q * R + 1,02 * T * R * Q \quad (25)$$

A Figura 65 mostra a superfície de resposta para a conversão dos triacilglicerídeos em função da razão molar e temperatura. A superfície mostra novamente o efeito negativo que a temperatura impõe no sentido reduzir a conversão devido à inativação da enzima.

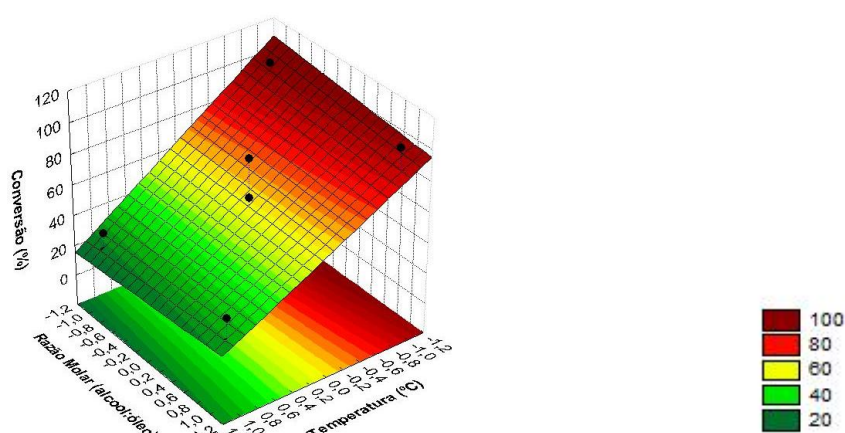


Figura 65: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da razão molar e temperatura.

O mesmo resultado de alta dependência da conversão com a temperatura é mostrado também para o estudo do óleo de canola. O comportamento da razão molar também foi semelhante, mesmo que os resultados dos efeitos importantes para a atividade de consumo do triacilglicerol tenham apresentado diferenças consideráveis de magnitude.

A Figura 66 mostra a superfície de resposta para a conversão dos triacilglicerídeos em função da temperatura e quantidade de enzima. Novamente verifica-se o forte efeito que a variável temperatura desempenha, no sentido de inibir a conversão dos triacilglicerídeos.

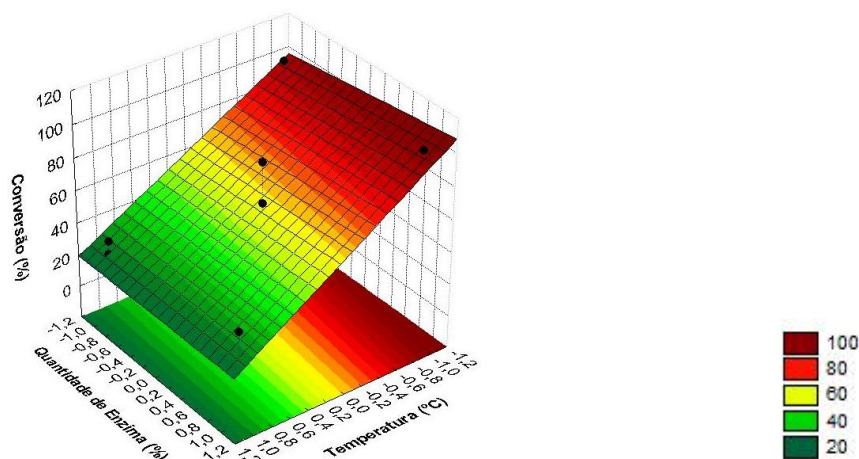


Figura 66: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função quantidade de enzima e temperatura.

A Figura 67 mostra o efeito, mesmo que não significativos, das variáveis quantidade de enzima e razão molar sobre a conversão dos triacilglicerídeos. Pela superfície foi verificado a formação de dois pontos de máximo de conversão, um no ponto em que baixas quantidades de enzima e razão molar foi utilizados e outro em que as condições máximas, tanto de razão molar quanto de quantidade de enzima são empregados. Do ponto de vista de aplicabilidade da tecnologia, o ponto de máximo de conversão em que a mínima exigência, tanto de reagente quanto de catalisador é utilizada, torna-se mais interessante, visto que menores custos são associados ao processo.

Na análise da variável de resposta atividade de consumo de triacilglicerol do óleo de nabo forrageiro foi verificadas que altas quantidades de enzima provocaram diminuição da atividade e que quando valores reduzidos foram utilizados a atividade indicou um aumento. Esse aumento da atividade devido pequenas quantidades de enzima utilizada pode justificar o alto rendimento alcançado quando a quantidade de enzima e razão molar foram utilizado. A alta conversão quando as condições extremas foram utilizadas leva a verificar novamente o efeito protetor do sítio ativo contra a inativação provocada pelo álcool causado pelo aglomerado de enzimas formado quando altas quantidades de enzima são encontradas no meio reacional. Como já mencionado anteriormente, em condições de alta concentração de enzima no meio reacional, essas podem aglomerar-se, e provocar a diminuição da atividade catalítica e conseqüentemente as taxas de reação menores (Prazeres et al., 1992).

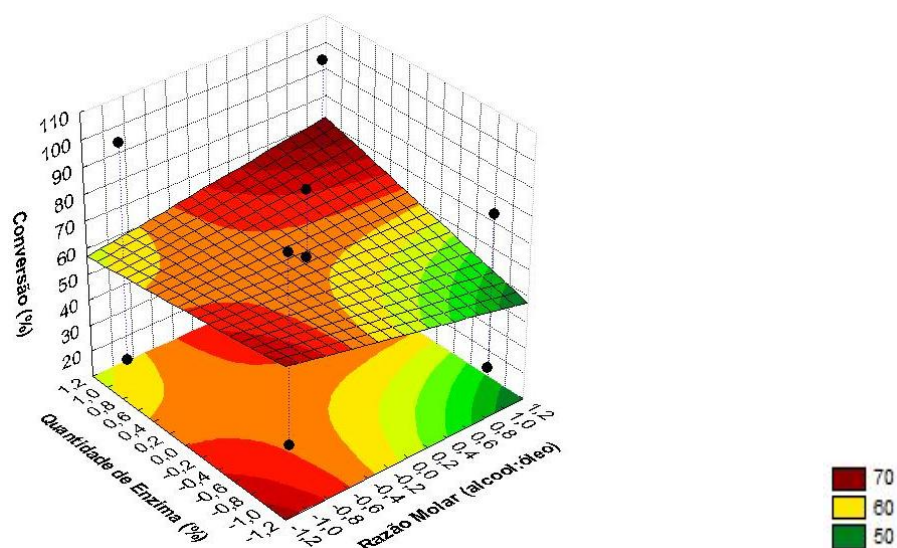


Figura 67: Superfície de resposta para conversão de triacilglicerídeos do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da quantidade de enzima e razão molar.

Pela Figura 68 é possível verificar o consumo dos triacilglicerídeos pela lípase de *Thermomyces lanuginosus* e mostra que a partir dos 1500 minutos a grande maioria dos triacilglicerídeos já foram consumidos, evidenciando a alta capacidade da lípase de *Thermomyces lanuginosus* em converter os triacilglicerídeos.

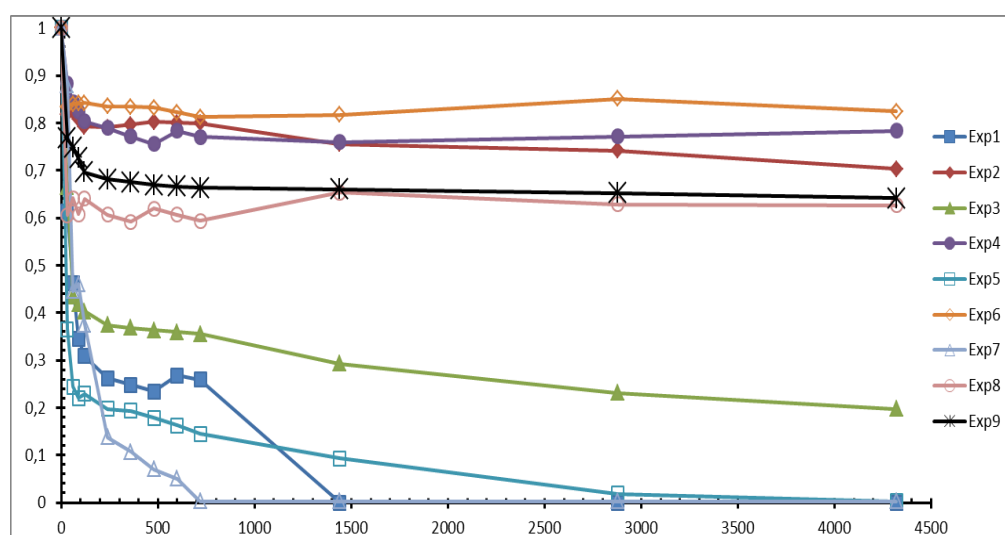


Figura 68: Conversão dos triacilglicerídeos de óleo de canola em função do tempo, utilizando lípase de *Thermomyces lanuginosus* para todos as condições experimentadas.

Os resultados de conversão dos triacilglicerídeos podem ser verificados na Tabela 24, que demonstra a conversão em função dos experimentos do planejamento. O maior valor de conversão catalisado pela lípase de *Thermomyces lanuginosus* ocorreu seguindo as

configurações do experimento 1, 5 e 7, em que pelo menos 99,7% dos triacilglicerídeos foram consumidos.

Em desacordo com os resultados de atividade de conversão de triacilglicerol, as conversões dos triacilglicerídeos do óleo de canola foram equivalentes às conversões dos triacilglicerídeos do óleo de nabo forrageiro. Baixos valores de atividade indicam impedimento do progresso da reação por algum efeito deletério na estrutura da enzima fato que acarretaria em uma reação mais lenta e conseqüentemente menor conversão para um mesmo período reacional, o que não foi verificado nos experimentos 1 e 7.

4.7.4.3 Atividade de Produção de Éster

A análise de variância da atividade de produção de éster é mostrada na Tabela 26. A temperatura novamente apareceu como o efeito que fortemente influencia a atividade de produção éster, isso por que a enzima de *Thermomyces lanuginosus* sofre uma forte inativação quando temperaturas acima de 50°C são utilizadas. Esses resultados se repetiram para os testes realizados com essa lipase. Utilizando um intervalo de confiança maior, 90%, foi possível observar que a interação entre os três efeitos também apresenta influência sobre a atividade de produção de éster. A atividade de produção de éster pela *Thermomyces lanuginosus* utilizando óleo de canola, nas mesmas condições de estudo, a temperatura também foi um efeito que mais fortemente influenciou a atividade de produção de éster, assim como a razão molar. Novamente a análise da atividade de produção de éster, indica haver diferenças nos mecanismos de atuação da enzima *Thermomyces lanuginosus* quando diferentes óleos são utilizados.

Tabela 26: Análise de variância para a atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus*.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	P-valor
Temperatura (°C)	987,55	1	987,55	137,65	0,00
Razão Molar (alcool:óleo)	11,47	1	11,47	1,60	0,27
Quantidade de Enzima (%)	17,31	1	17,31	2,41	0,20
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo)	0,01	1	0,01	0,00	0,97
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	4,90	1	4,90	0,68	0,46
Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	1,43	1	1,43	0,20	0,68
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	38,97	1	38,97	5,43	0,08
Erro	28,70	4	7,17		
Total SS	1090,34	11			

O diagrama de Pareto representado na Figura 69 demonstra que a temperatura foi o efeito que mais influência na atividade de produção de éster. A interação dos três efeitos também apresenta influência para um intervalo de confiança maior e também pode ser verificado pelo diagrama de Pareto.

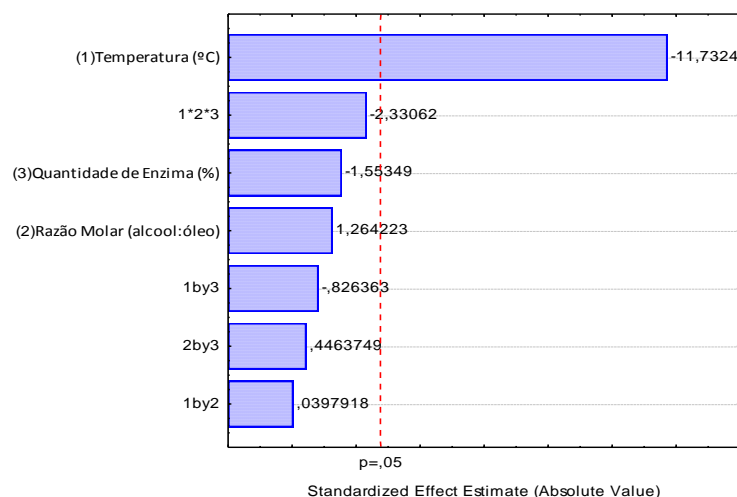


Figura 69: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus*.

O gráfico de normalidade mostrou que os dados experimentais encontram-se bem distribuídos ao longo da reta de normalidade indicando não haver indícios de anormalidade dos dados. Os resíduos também apresentaram distribuição aleatória. Então podemos concluir que todas as prerrogativas do modelo são satisfeitas.

O valor do R^2 apresentado pelo modelo estatístico foi de 0,9736 indicando que o modelo estatístico apresenta boa confiabilidade com os dados experimentais e o erro foi inferior a 1,32%. O modelo de regressão dos dados de atividade de produção de éster do óleo de nabo forrageiro pela lipase obtida de *Thermomyces lanuginosus* é descrito pela equação

$$\begin{aligned} \text{Ativ. éster} = & 13,29 - 11,11 * T + 1,20 * R - 1,47 * Q + 0,03 * T * R - 0,78 * Q * R \\ & + 0,42 * Q * R - 2,20 * T * R * Q \end{aligned} \quad (26)$$

A Figura 70 demonstra a superfície da resposta da atividade de produção de éster pela enzima *Thermomyces lanuginosus*. Verifica-se que a variável razão molar pouco influência na atividade, no entanto para a variável temperatura a atividade de produção de éster, foi fortemente dependente. Como já foi discutido anteriormente a lipase de *Thermomyces lanuginosus* sofre forte inativação por temperaturas elevadas.

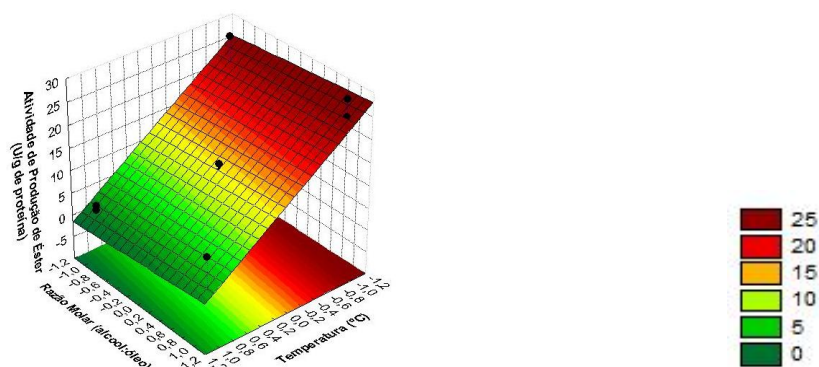


Figura 70: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da temperatura e razão molar.

A Figura 71 mostra a superfície de resposta para a atividade de produção de éster em função da temperatura e quantidade de enzima. A quantidade de enzima já se mostrou uma variável que merece atenção, tanto para atividade de consumo de triacilglicerol para os dois óleos quanto para a atividade de produção de éster para o óleo de canola. Novamente esse efeito foi verificado e mostra que altas quantidades de enzima provocam a diminuição da atividade da enzima.

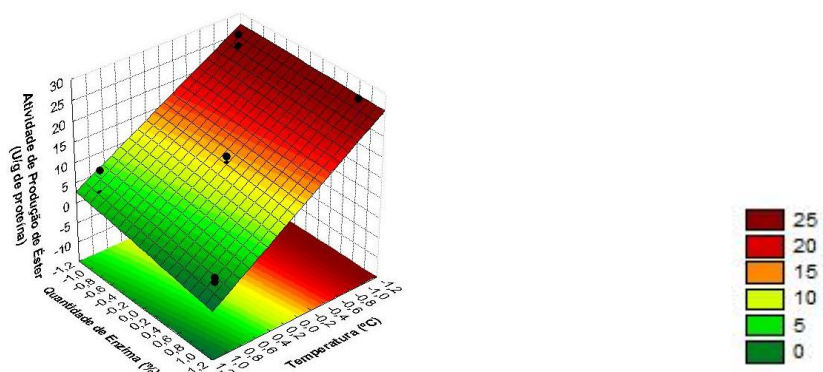


Figura 71: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função temperatura e quantidade de enzima.

A superfície de resposta da atividade de produção de éster em função da quantidade de enzima e razão molar é mostrada na Figura 72. Por essa figura foi possível identificar um máximo de atividade quanto se empregou a maior razão molar no meio reacional, no entanto, uma estreita faixa de alta atividade foi mostrada quando se utilizou menores razões molares e quantidades de enzima. Novamente verificou-se o efeito negativo que a alta quantidade de enzima provoca na atividade de enzima. O efeito da alta concentração de enzima provocar a diminuição da atividade foi também verificado quando utilizou-se o óleo de canola como substrato da enzima, mostrando que essa enzima não desempenha altas atividades quando altas concentrações de enzima são adicionadas no meio reacional.

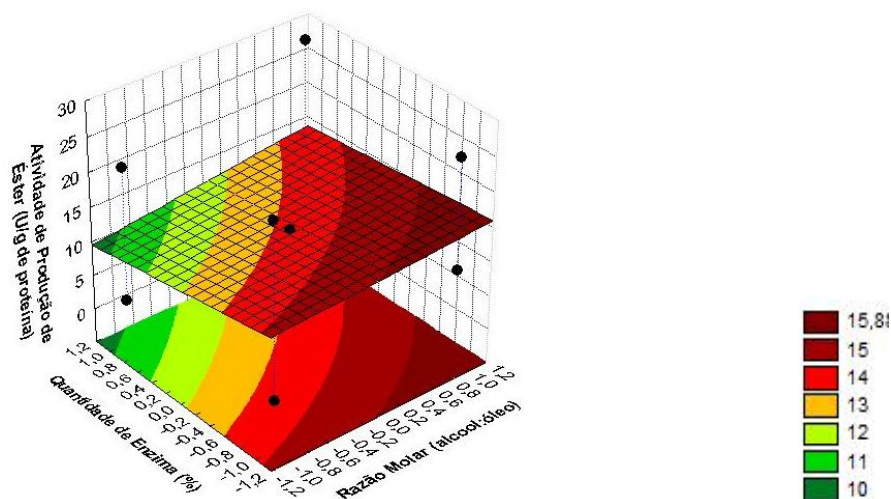


Figura 72: Superfície de resposta para atividade de produção de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da quantidade de enzima e razão molar.

Os resultados de atividade de produção de éster podem ser verificados na Figura 73 que mostra os maiores valores de atividade obtidos foram iguais a 27,52 U/g de proteína para o experimento 1 e 28,46 U/g de proteína para o experimento 7. Os valores de atividade de produção de éster do óleo de canola obtidos da lipase de *Thermomyces lanuginosus* são bastante superiores, confirmando novamente que a diferença de composição glicídicas dos óleos influencia tanto no mecanismo de atuação da lipase quanto na atividade da enzima (Dizge et al., 2009; Salis et al., 2007).

4.7.4.4 Rendimento em Éster

A tabela de análise de variância para o rendimento de éster é mostrado na Tabela 27. Por ela foi possível identificar, para o intervalo de confiança de 95%, somente a temperatura influencia no rendimento de éster, no entanto utilizando um intervalo maior, de 85%, também a quantidade de enzima e a interação dos efeitos quantidade de enzima e temperatura tornam-se significantes.

A análise de variância do rendimento em éster do óleo de canola mostrou, para um intervalo de 85% de confiança, que todos os efeitos analisados são importantes. A temperatura novamente foi o efeito que mais influenciou, tanto para o óleo de canola quanto para o óleo de nabo forrageiro.

Tabela 27: Análise de variância para rendimento de éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus*.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	P-valor
Temperatura (°C)	0,58	1	0,58	59,74	0,00
Razão Molar (alcool:óleo)	0,03	1	0,03	2,57	0,18
Quantidade de Enzima (%)	0,04	1	0,04	4,28	0,11
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo)	0,02	1	0,02	1,65	0,27
Temperatura (°C) x Quantidade de Enzima (%)	0,03	1	0,03	3,26	0,15
Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	0,01	1	0,01	1,54	0,28
Temperatura (°C) x Razão Molar (alcool:óleo) x Quantidade de Enzima (%)	0,02	1	0,02	2,52	0,19
Erro	0,04	4	0,01		
Total SS	0,77	11			

O diagrama de Pareto mostrado na Figura 74 demonstra o efeito que mais influência no rendimento de éster. A temperatura destaca-se como efeito mais importante, pois inativa a enzima a temperaturas superiores a 50°C. A quantidade de enzima também se apresenta como uma variável que deve ser analisada como já verificada para o caso da atividade de produção de éster.

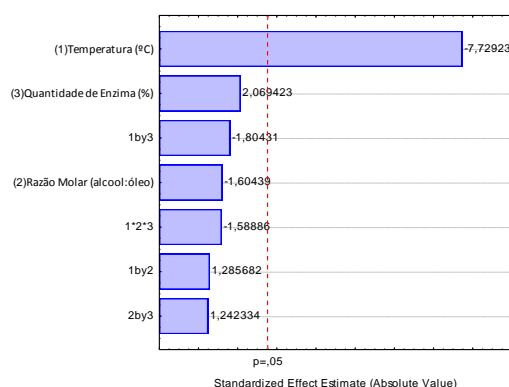


Figura 74: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para rendimento em éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus*.

O gráfico de normalidade mostrou os pontos experimentais bem distribuídos ao longo da reta de normalidade indicando que os resultados apresentam distribuição normal. Os resíduos apresentaram distribuição aleatória, indicando não haver tendência experimental nos resíduos. O valor do R^2 apresentado pelo modelo estatístico foi de 0,9497 indicando que o modelo de regressão das superfícies de otimização apresenta boa confiabilidade com os dados experimentais e o erro foi inferior a 2,54%.

O modelo de regressão dos dados utilizado para construção das superfícies de resposta é descrito pela Equação.

$$\text{Rend} = 27,27 - 26,93 * T - 5,59 * R + 7,21 * Q + 4,48 * T * R - 6,28 * Q * T + 4,33 * T * Q * R \quad ()$$

A superfície da resposta para rendimento em éster em função da razão molar e temperatura é mostrada na Figura 75. A superfície indica a alta influência que a temperatura aplica sobre o rendimento e também demonstra que utilizar quantidades excessivas de álcool no meio reacional prejudica a conversão dos triacilglicerídeos em éster, representando uma redução no rendimento.

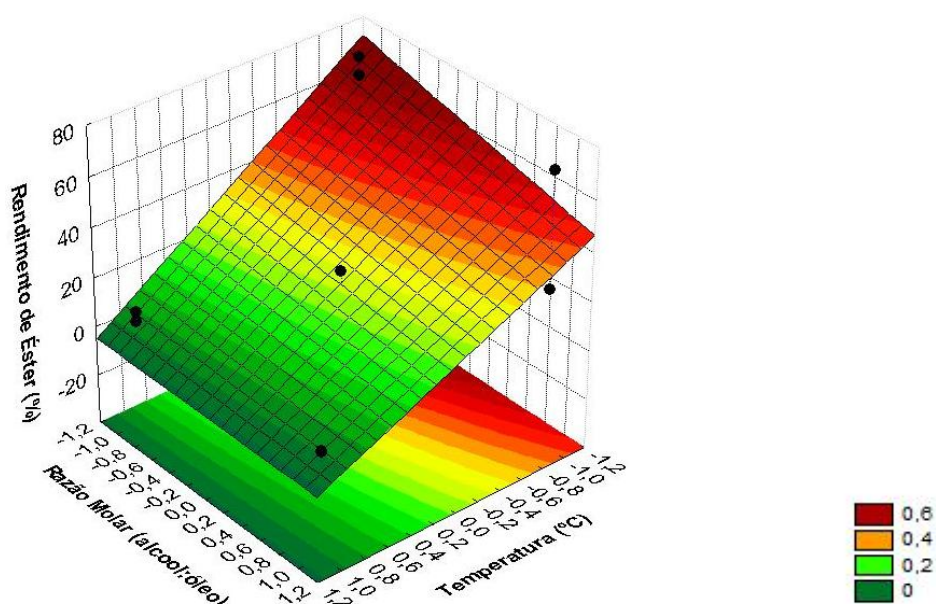


Figura 75: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função da razão molar e temperatura.

A Figura 76 mostra a superfície de resposta para rendimento de éster em função da quantidade de enzima e temperatura. Pela figura foi possível perceber que em temperatura mais elevada a quantidade de enzima não apresenta efeito em relação ao rendimento. Principalmente porque toda a enzima foi inativada no início da reação. No entanto em temperaturas mais amenas, uma influência considerável foi verificada. Variando-se o efeito do ponto mais baixo para o ponto mais alto, tem-se um aumento no rendimento de 40%, ou seja, o aumento da quantidade de enzima no meio reacional foi benéfico no sentido de aumento do rendimento.

Para o caso da *Thermomyces lanuginosus*, aumento do rendimento em uma reação pode ser alcançado quando um longo tempo reacional é empregado, ou então aumentando a relação quantidade de enzima por substrato (Fu et al., 1995). Mas deve-se tomar cuidado quando altas concentrações são utilizadas. Pois a formação de aglomerados pode inverter a

tendência devido à redução da atividade de produção de éster ou de consumo de triacilglicerol verificado tanto para lipase de *Burkholderia cepacia*, quanto para a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Prazeres et al., 1992).

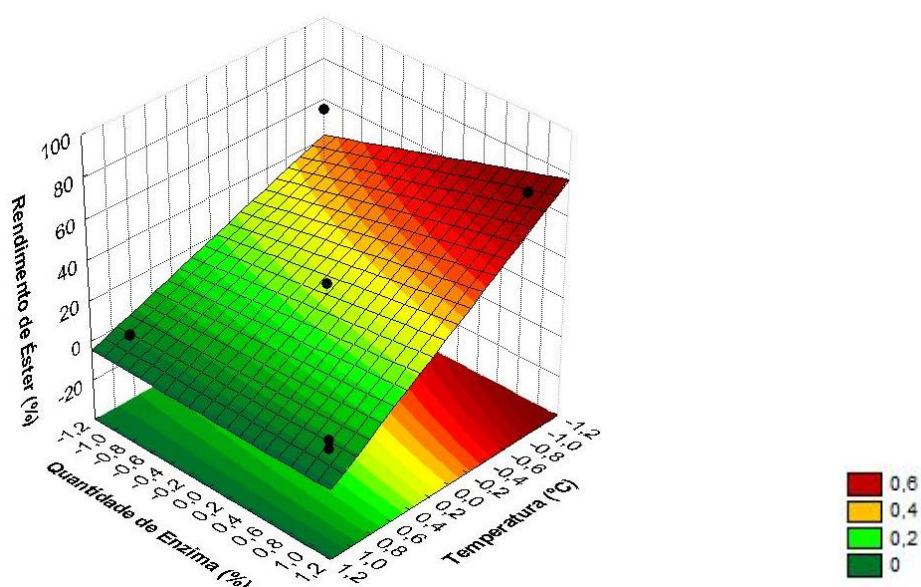


Figura 76: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função quantidade de enzima e temperatura.

A superfície de resposta para rendimento de éster em função da quantidade de enzima e razão molar é mostrada na Figura 77. Na condição em que uma baixa razão molar foi utilizada, a quantidade de enzima não apresenta muita influência sobre o rendimento, mas na condição de alta razão molar, a quantidade de enzima torna-se importante, pois o aumento na quantidade de enzima propicia um grande aumento no rendimento de éster.

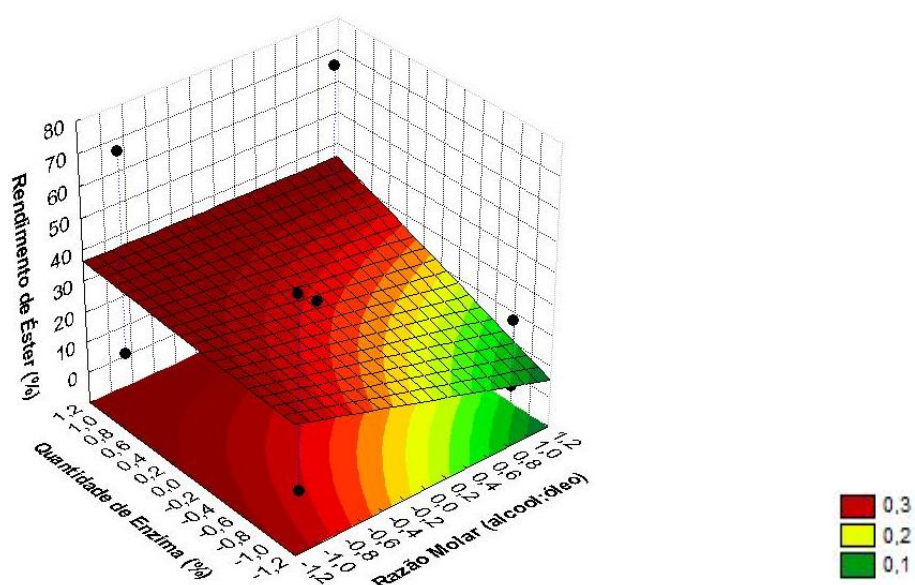


Figura 77: Superfície de resposta para rendimento em éster do óleo de Nabo Forrageiro pela enzima *Thermomyces lanuginosus* em função quantidade de enzima e razão molar.

Para o estudo do rendimento de éster do óleo de canola, a quantidade de enzima apresentou uma influência no rendimento desde que alta concentração álcool seja utilizada no de meio reacional. Essa influência da quantidade de enzima novamente confirma o efeito de aglutinação redutor da atividade verificado por Prazeres (1992). Esse efeito que provoca a diminuição da atividade da enzima pelo efeito aglutinador pode causar uma proteção da estrutura da enzima que proporciona maiores rendimentos ao longo de todo o período reacional.

Resultados de que a alta concentração da enzima deve ser usada quando altas razões molares são encontradas no meio reacional também foi verificado por Rodrigues et al. (2011). A transesterificação do óleo de soja utilizando uma mistura de lipase obtida de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor mieber* foi estudada utilizando um planejamento experimental e os autores verificaram que o rendimento de éster pode ser maximizado quando a combinação de alta quantidade de enzima e de razões molar foi utilizada. O melhor resultado de rendimento 90%, foi encontrada quando 25% de uma mistura enzimática contendo 80% de lipase de *Thermomyces lanuginosus* e a razão molar álcool:óleo de 7,5:1 (Rodrigues & Ayub, 2011).

A Figura 78 mostra o perfil de rendimento em éster do óleo de canola em função do tempo. É possível verificar por essa figura a forte inativação sofrida pela enzima nos experimentos em que a maior temperatura de reação foi utilizada, evidenciando que o rendimento nesses casos não foi maior que 8%. É possível identificar o alto rendimento alcançado quando temperaturas inferiores foram utilizadas, como é o caso dos experimentos 1, 5 e 7.

Interessante verificar que tanto para o óleo de canola quanto o óleo de nabo forrageiro o experimento 3 demonstrou indícios de inativação da enzima possivelmente pela alta razão molar utilizada. No entanto, quando se realiza uma comparação com o experimento 5 que também utiliza esta razão molar e obteve-se para os dois óleos rendimentos elevados. Nos sugere que a alta quantidade de enzima presente no experimento 5, (10% em relação ao meio reacional) pode formar aglomerados (Prazeres et al., 1992) que protege a enzima de inativação provocada pelo álcool e permite um maior rendimento.

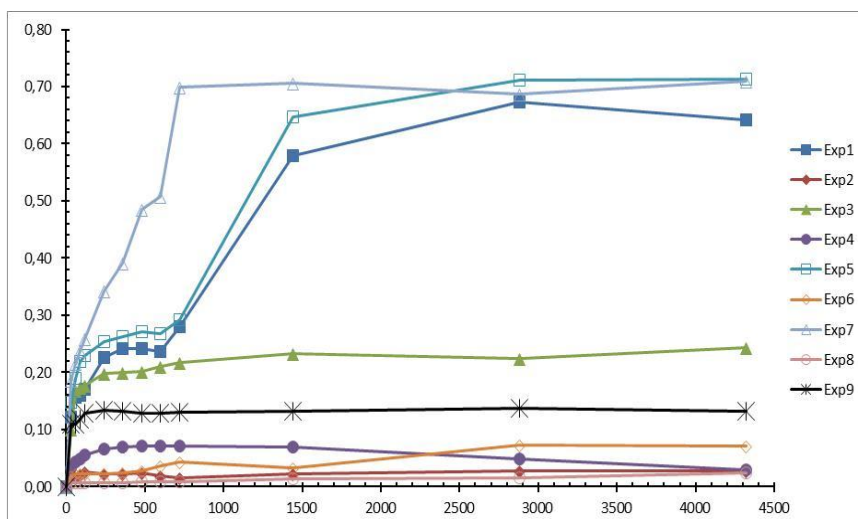


Figura 78: Rendimento de éster do óleo de Nabo Forrageiro em função do tempo utilizando lipase de *Thermomyces lanuginosus* para todas as condições experimentadas

Os valores de rendimento em éster do óleo de nabo forrageiro podem ser verificados na Tabela 24. Os valores de rendimentos apresentados pela lipase de *Thermomyces lanuginosus* são superiores dos apresentados pela lipase de *Burkholderia cepacia*, tanto para o óleo de canola quanto para o óleo de nabo forrageiro, isso quando a primeira não foi inativada pela temperatura. Os maiores rendimentos de produção de éster do óleo de canola pela *Thermomyces lanuginosus* foram de 85,59% enquanto para o óleo de nabo forrageiro o valor foi bastante menor, 70,97%. Essa diferença já era esperada devido aos baixos valores de atividade de conversão de triacilglicerol e de atividade de formação de ésteres verificados nesse trabalho e comentado anteriormente. A diferença nos rendimentos pode ter ocorrido devido a diferença no perfil de ácido graxo entre os dois óleos. O perfil de ácidos graxos presente no óleo de canola apresenta baixa concentração de ácidos graxos de cadeias carbônicas inferiores a 10 carbonos, enquanto que o perfil do óleo de nabo forrageiro apresenta uma concentração igual a 18% desses ácidos graxos.

Ácidos graxos de cadeia curta quando ligados aos triacilglicerídeos propiciam alta densidade eletrônica nas ligações carbono oxigênio do glicerol. Essa alta densidade eletrônica pode dificultar a formação do complexo enzima substrato e conseqüentemente diminuir tanto a atividade catalítica, quanto a formação dos produtos.

5 Conclusões

A caracterização dos óleos de canola e nabo forrageiro mostrou que esses apresentavam boas características principalmente devido aos baixos índices de acidez e de

peróxido. O óleo de nabo forrageiro demonstrou-se bastante resistente, pois mesmo extraído pelo método de extrusão pelo menos oito meses antes da caracterização e armazenado de forma não ideal e ainda apresentou resultados comparáveis a óleos novos. O perfil de ácido graxo do óleo de canola mostrou que esse óleo possui uma alta concentração de ácidos oléicos e linoleicos enquanto que o óleo de nabo forrageiro possui uma maior diversificação de ácidos graxos em sua composição.

A caracterização das enzimas por meio das atividades, hidrolítica, de esterificação e transesterificação mostrou que a lipase de *Thermomyces lanuginosus* apresentou um maior potencial de transesterificação que a lipase de *Burkholderia cepacia*. Pois os valores das atividades testadas foram sempre maiores para a lipase de *Thermomyces lanuginosus* que os valores de atividade encontrados da lipase de *Burkholderia cepacia*.

O método de separação gradiente combinado linear aquoso-orgânico/não aquoso utilizado no acompanhamento da reação de transesterificação e análise das amostras mostrou-se muito eficiente e confiável na separação dos grupos de compostos de correspondentes aos monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilglicerídeos e ésteres, para todos os óleos analisados.

As superfícies de respostas obtidas do planejamento experimental foram muito precisas em descrever as variáveis que influenciou nas atividades de consumo de triacilglicerídeos, sendo que pelo menos 89,63% dos dados experimentais foram descritos pelos modelos estatísticos de regressão das superfícies.

As análises de variância mostraram que para a atividade de transesterificação da lipase de *Burkholderia cepacia* foi fortemente influenciada pela variável razão molar, tanto para o óleo de canola quanto para o óleo de nabo forrageiro. Também a temperatura e quantidade de enzima apresentaram forte influência na atividade de transesterificação do óleo de canola e a quantidade de enzima para a atividade de transesterificação do óleo de nabo forrageiro. A atividade de transesterificação da lipase de *Thermomyces lanuginosus* sofreu forte influência da temperatura para os dois óleos, pois essa lipase sofre forte inativação em temperaturas superiores a 50°C no meio reacional livre de solvente.

O estudo da análise de variância da conversão de triacilglicerol mostrou que a temperatura é o efeito mais importante para todos os casos estudados. Com exceção da conversão do óleo de nabo forrageiro pela lipase de *Burkholderia cepacia* em que a razão

molar e a quantidade de enzima foram as variáveis que mais importantes. Ainda a quantidade de enzima também foi importante na conversão dos triacilglicerídeos do óleo de canola. As superfícies de resposta obtidas também descreveram bem o comportamento dos dados experimentais e indicaram o caminho para otimização da conversão dos triacilglicerídeos utilizando lípases.

O modelo estatístico de regressão usado para a construção das superfícies de respostas se ajustaram muito bem com os dados experimentais, sendo que o R^2 , para todos os casos estudados foram maiores que 92,22%.

A análise de variância mostrou que para a lipase de *Burkholderia cepacia* a razão molar e quantidade de enzima são os efeitos mais importantes para a atividade de produção de éster. Quando maximizados reduzem a atividade da lipase tanto por efeitos prejudiciais do álcool quanto por possível formação de aglomerados enzimáticos. Para a lipase obtida de *Thermomyces lanuginosus* a temperatura foi a variável mais importante.

As superfícies de resposta para o rendimento em éster descreveu bem os dados experimentais. A análise de variância do rendimento em éster mostrou que a temperatura é o efeito que mais influência para todos os casos estudados e a variável quantidade de enzima se mostrou importante nas reações catalisadas pela *Burkholderia cepacia*.

6 Referências

- Ackman, R.G., Sipos, J.C. 1964. Application of specific response factors in the gas chromatographic analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detector. *J. Am. Oil Chemical Society*, **41**.
- Adolfo Lutz, I. 2008. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 1º ed.* Instituto Adolfo Lutz, São Paulo: instituto Adolfo Lutz.
- Almeida, P.G. 2006. *Evolução: A Jornada do Espirito.* Ibrasa, São Paulo.
- Aloulou, A., Rodriguez, J.A., Fernandez, S., van, O.D., Puccinelli, D., Carriere, F. 2006. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochim Biophys Acta*, **1761**(Copyright (C) 2011 U.S. National Library of Medicine.), 995-1013.
- Alves, M.H., Campos-Takaki, G.M., Porto, A.L.F., Malanez, A.I. 2002. Screening of *Mucor* spp. for production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal of Microbiology*, **33**.
- Amano. 2007. Assay method of transesterification activity, (Ed.) A.E. INC, pp. 1.
- Arai, S., Nakashima, K., Tanino, T., Ogino, C., Kondo, A., Fukuda, H. 2010. Production of biodiesel fuel from soybean oil catalyzed by fungus whole-cell biocatalysts in ionic liquids. *Enzyme and Microbial Technology*, **46**(1), 51-55.
- Ávila, R.N.d.A., Sodr , J.R. 2012. Physical–chemical properties and thermal behavior of fodder radish crude oil and biodiesel. *Industrial Crops and Products*, **38**(0), 54-57
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 5, 1976.
- Biaggi, P.E.A., Silva, R.M.G. 2011. Standardize of Oil Extraction From Peanuts and Nabo Forrageiro Seeds Using Soxhlet Method and Physicochemical Analyses. in: *Campus de Assis – Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Laboratório de Fitoterpicos – Engenharia Biotecnol gica Assis - São Paulo.*
- Bornscheuer, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 26, n. Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 73-81, 2002.
- Bottoli, C.B.G. 2011. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Internet:<http://www.cg.iqm.unicamp.br/material/qa582/hplc-Fracassi.pdf>.
- Bousquet-Dubouch, M.-P., Graber, M., Sousa, N., Lamare, S., Legoy, M.-D. 2001. Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1550**(1), 90-99.

Bunce, M. et al. Stock and Optimized Performance and Emissions with 5 and 20% Soy Biodiesel Blends in a Modern Common Rail Turbo-Diesel Engine. *Energy & Fuels*, v. 24, n. 2, p. 928-939, 2009.

Brasil, P. 2011a. Matriz Energética - Biocombustíveis.

Brasil, P. 2011b. Matriz Energética - Etanol.

Bryan R, M. 2011. Influence of extended storage on fuel properties of methyl esters prepared from canola, palm, soybean and sunflower oils. *Renewable Energy*, **36**(4), 1221-1226.

Canada, C.C. 2011. The comprehensive website for canola information from the Canola Council, representing canola growers, input suppliers, researchers, processors and marketers of canola and its products., Canola Council of Canada. Online.

Cardenas, F., Castro, M.S., Sanchez-Monteiro, J.M., Sinisterra, J.V., Valmaseda, M., Elson, S.W., Alvarez, E. 2001. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzymes and Microbial Technology*, **18**, 145-154.

Challoner, J., Baylis, T. 2010. *1001 Invenções que mudaram o mundo*. Sextante, Rio de Janeiro.

Coedeiro, L.A.M., Reis, M.S., Avarenga, E.M.A. 1999. Cultura da Canola. Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia.

Collins, C.H., Braga, G.L., Bonato, P.S. 2006. Fundamentos de Cromatografia. 1 ed, Editora Unicamp. Unicamp.

Costa, I.C.R. 2009 Utilização de Lipozyme RM IM na Produção de Diacilgliceróis a Partir do Óleo de Palma in: *Instituto de Química*, Vol. Mestrado em Bioquímica Universidade Federal do Rio de Janeiro Rio de Janeiro pp. .

Costa Neto , P.R. 2002. Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja., Vol. Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

D6751-11b, A.S. 2011. Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels, ASTM, pp. 9.

Dambiski, L. 2007. Síntese de Biodiesel de Óleo de Nabo Forrageiro Empregando Metanol Supercrítico in: *Departamento de Engenharia Mecânica e de Materiais*, Vol. Mestrado, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, pp. 94.

de Barros, D.P.C., Fonseca, L.P., Fernandes, P., Cabral, J.M.S., Mojovic, L. 2009. Biosynthesis of ethyl caproate and other short ethyl esters catalyzed by cutinase in organic solvent. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **60**(3-4), 178-185.

Di Nicola, G., Pacetti, M., Polonara, F., Santori, G., Stryjek, R. 2008. Development and optimization of a method for analyzing biodiesel mixtures with non-aqueous reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1190**(1-2), 120-126.

- Di Serio, M., Ledda, M., Cozzolino, M., Minutillo, G., Tesser, R., Santacesaria, E. 2006. Transesterification of Soybean Oil to Biodiesel by Using Heterogeneous Basic Catalysts. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **45**(9), 3009-3014.
- Dizge, N., Aydiner, C., Imer, D.Y., Bayramoglu, M., Tanriseven, A., Keskinler, B. 2009. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource Technology*, **100**(6), 1983-1991.
- Dizge, N., Keskinler, B. 2008. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biomass and Bioenergy*, **32**(12), 1274-1278.
- Dominguez, A., Costas, M., Longo, M.A., Sanromán, A. 2003. A novel application of solid culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, **25**.
- Domingos, A.K., Saad, E.B., Wilhelm, H.M., Ramos, L.P. 2008. Optimization of the ethanolysis of *Raphanus sativus* (L. Var.) crude oil applying the response surface methodology. *Bioresource Technology*, **99**(6), 1837-1845.
- Dossat, V., Combes, D., Marty, A. 2002. Efficient lipase catalysed production of a lubricant and surfactant formulation using a continuous solvent-free process. *Journal of Biotechnology*, **97**(2), 117-124.
- Du, D., Sato, M., Mori, M., Park, E.Y. 2006. Repeated production of fatty acid methyl ester with activated bleaching earth in solvent-free system. *Process Biochemistry*, **41**(8), 1849-1853.
- Dutta, K., Dasu, V.V. 2011. Synthesis of short chain alkyl esters using cutinase from *Burkholderia cepacia* NRRL B2320. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **72**(3-4), 150-156.
- ELSD SEDERE, 2011 - Leader in Evaporative Light Scattering Detectors (ELSD), (Ed.) SEDERE.
- Fallot, A., Girard, P. 2006. Review of existing and emerging Technologies for the production of biofuels in developing countries. *Energy for Sustainable Development*, **2**.
- Fasciotti, M., Pereira Netto, A.D. 2010. Optimization and application of methods of triacylglycerol evaluation for characterization of olive oil adulteration by soybean oil with HPLC-APCI-MS-MS. *Talanta*, **81**(3), 1116-1125.
- Fernandes, M.L.M. 2007. Produção de Lipases por Fermentação no Estado Sólido e sua Utilização em Biocatálise. *Departamento de Química*, Doutorado, Universidade Federal de Curitiba. Curitiba, pp. 120.
- Fernandes, M.L.M., Krieger, N., Baron, A.M., Zamora, P.P., Ramos, L.P., Mitchell, D.A. 2004. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **30**(1), 43-49.

- Forgaty, W., Kelly, C. 1990. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Elsevier New York.
- Fogler, H. S. Elements of Chemical Reaction Engineering. 4. LTC, 2009
- Forgaty, W.; Kelly, C. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. New York: Elsevier. 1990.
- Freitas, L.d.S. 2011. Conceitos Básicos de Cromatografia para Biodiesel. Maringá - Universidade Estadual de Maringá, pp. 50.
- Fu, X., Zhu, X., Gao, K., Duan, J. 1995. Oil and fat hydrolysis with lipase from *Aspergillus* sp. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 527-31.
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **92**(5), 405-416.
- Gonçalves, F.A.G. 2007. Produção de Lipases Extracelular por Leveduras em Cultivo Submerso. in: *Ciências de Alimentos*, Vol. Mestrado, Faculdade de Farmácia. Belo Horizonte, pp. 67
- Govan, J.R.W., Burns, J.L., Speert, D.P. 2010. Common Questions About *Burkholderia cepacia*. in: *Cystic Fibrosis Services*, International Burkholderia cepacia working group.
- Guisan, J.M. 2006. *Immobilization of Enzymes and Cells*. 2 ed. Human Press, New Jersey
- Gunstone, F.D. 1967. *An Introduction to the Chemistry and Biochemistry of Fatty Acids and their Glycerides*. 2 ed. Chapman & Hall, Londres.
- Hadeball, W. 1991. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. *Acta Biotechnology*, **11**, 159-167.
- Hartman, L., Lago, R.C.A. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.*, **22**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 475-6, 494.
- Holčapek, M., Jandera, P., Fischer, J., Prokeš, B. 1999. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. *Journal of Chromatography A*, **858**(1), 13-31.
- Holčapek, M., Jandera, P., Zderadička, P., Hrubá, L. 2003. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1010**(2), 195-215.
- Jaeger, K.-E., Eggert, T. 2002. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**(4), 390-397.
- JAEGER, K.E., DIJKSTRA, B.W., REETZ, M.T. 1999. **Bacterial biocatalysts: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases**. *Annual Review of Microbiology*, **53**, 315-351.

Jesus, M.F.C.P., Branco, R.N., J.G.L., S.a., Freire, D.M.G., Silva, J.G. 1999. *Penicillium restrictum* lipases: a comparative study and characterization of enzymes with different degrees of purity. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **16**.

Jin, F., Kawasaki, K., Kishida, H., Tohji, K., Moriya, T., Enomoto, H. 2007. NMR spectroscopic study on methanolysis reaction of vegetable oil. *Fuel*, **86**(7-8), 1201-1207.

Karmakar, A., Karmakar, S., Mukherjee, S. 2010. Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 101(19), 7201-7210.

Karra-Châabouni, M., Ghamgui, H., Bezzine, S., Rekik, A., Gargouri, Y. 2006. Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. *Process Biochemistry*, 41(7), 1692-1698.

Kawashima, H., Takase, H., Yasunaga, K., Wakaki, Y., Katsuragi, Y., Mori, K., Yamagushi, T., Hase, T., Matsuo, N., Yasukawa, T., Tokimitsu, I., Koyama, W. 2008. One-Year Ad Libitum Consumption of Diacylglycerol Oil as Part of a Regular Diet Results in Modest Weight Loss in Comparison with Consumption of a Triacylglycerol Control Oil in Overweight Japanese Subjects. *Journal of the American Dietetic Association*, **108**, 9.

Knothe, G., Van Gerpen, J., Krahl, J. 2006. *Manual do biodiesel*. Edgard Blucher, São Paulo.

Köse, Ö., Tüter, M., Aksoy, H.A. 2002. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Bioresource Technology*, **83**(2), 125-129.

Ledoux, M., Laloux, L., Wolff, R.L. 2000. Analytical methods for determination of trans-C18 fatty acid isomers in milk fat. A review. *Analisis*, **28**(5), 402-412.

Lee, A., Chaibakhsh, N., Rahman, M.B.A., Basri, M., Tejo, B.A. 2010. Optimized enzymatic synthesis of levulinate ester in solvent-free system. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 246-251.

Lee, D.-S., Lee, E.-S., Kim, H.-J., Kim, S.-O., Kim, K. 2001. Reversed phase liquid chromatographic determination of triacylglycerol composition in sesame oils and the chemometric detection of adulteration. *Analytica Chimica Acta*, **429**(2), 321-330.

Lima, J.R.d.O., Brandao, d.S.R., Maria, d.S.C.C., Soares, d.S.L.S., Ribeiro, d.S.J., Jr., Moura, E.M., Rodarte, d.M.C.V. 2007. Biodiesel from babassu (*Orbignya* sp.) obtained by an ethanolic route. *Quim. Nova*, **30**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 600-603.

Lima, V.M.G., Krieger, N., Mitchell, D.A., Fontana, J.D. 2004. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochemical Engineering Journal*, **18**(1), 65-71.

Lu, D.-M., Jiang, L.-Y., Chen, L.-A., Liu, J.-Z., Mao, Z.-W. 2011. Optimization of Fermentation Conditions of the Engineered *Corynebacterium Glutamicum* to Enhance L-Ornithine Production by Response Surface Methodology *J Biotechnol Biomaterial*, **1**(7), 7.

- Ma, F., Hanna, M.A. 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresour. Technol.*, **70**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 1-15.
- Malacrida, C.R. 2003. Alterações do óleo de soja e da mistura azeite de dendê - óleo de soja em frituras descontínuas de batatas chips. *Brazilian Journal Food Technology*, **6**, 245-249.
- Marchetti, J.M., Miguel, V.U., Errazu, A.F. 2007. Possible methods for biodiesel production. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, **11**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 1300-1311.
- Montgomery, D.C. 2005. *Design and Analysis of Experiments. 6 ed.* John Wiley & Sons New York
- Montgomery, D.C., Runger, G.C. 2002. *Applied Statistic and Probability for Engineers. 3 ed.* John Wiley & Sons, United States of America.
- Moser, B.R. 2009. Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **45**(3), 229-266.
- Neto, B.B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. 2003. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2 ed.* Unicamp, Campinas.
- Nie, K., Xie, F., Wang, F., Tan, T. 2006. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **43**(1-4), 142-147.
- Nomenclature, I.-B. 2011. Enzyme Nomenclature.
- Novozyme. 2001. Lipolase 100 L, B 434 d-GB 500 (Ed.) N. S.A. Bagsvaerd-Denmark, .
- Oliveira, D.T.M. 2000. Lipase extracelular de fungo filamentoso: Isolamento e caracterização parciais. in: *Ciências de Alimentos*, Vol. Mestrado, Faculdade de Farmácia - UFMG. Belo Horizonte, pp. 152
- Oliveira, L.S., Franca, A.S., Camargos, R.R.S., Ferraz, V.P. 2008. Coffee oil as a potential feedstock for biodiesel production. *Bioresource Technology*, **99**(8), 3244-3250.
- Paiva, A.L., Malcata, F.X. 1997. Integration of reaction and separation with lipases: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **3**(1-4), 99-109.
- Parke, J.L. 2000. *Burkholderia cepacia*: Friend or Foe? . *The Plant Health Instructor*, pp. 3.
- Peres, T.B. 2002. Noções Básicas de Cromatografia. in: *Biológico*, Vol. 2, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental-Instituto. São Paulo, pp. 227-229.
- Peters, I. I.; Nelson, F. E. Factors influencing the production of lipase by *Mycotorula liplytica*. *J. Bacteriol.*, v. 55, p. 581-591, 1948.

Pinto, A.C., Guarieiro, L.L.N., Rezende, M.J.C., Ribeiro, N.M., Torres, E.A., Lopes, W.A., Pereira, P.A.d.P., de, A.J.B. 2005. Biodiesel: An overview. *J. Braz. Chem. Soc.*, **16**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 1313-1330.

Prazeres, D.M.F., Garcia, F.A.P., Cabral, J.M.S. 1992. Batch and continuous lipolysis/product separation in a reversed micellar membrane bioreactor. *Prog. Biotechnol.*, **8**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 713-18.

REED, G. 1975. *Enzymes in food processing. 2 ed.* Wisconsin:Academic Press.

Rios, M. 2008. Nabo forrageiro é opção na reforma de canaviais. in: *Jornal da Cana*, Vol. 178.

Rodrigues, M.I. 2009. *Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2 ed.* Campinas, S.P. - Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor.

Rodrigues, R.C., Ayub, M.A.Z. 2011. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochemistry*, **46**(3), 682-688.

ROSEVEAR, A., KENNEDY, J.F., CABRAL, J.M.S. 1987. *Immobilized Enzymes and Cells.* Adam Hilger Bristol and Philadelphia.

Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G., Locatelli, S. 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource Technology*, **98**(3), 648-653.

Salis, A., Monduzzi, M., Solinas, V., Polaina, J., MacCabe, A.P. 2007. *Industrial Enzymes: Structure Function and Applications Springer.*

Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., Solinas, V. 2005. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, **119**(3), 291-299.

Salum, T.F.C., Villeneuve, P., Barea, B., Yamamoto, C.I., Côcco, L.C., Mitchell, D.A., Krieger, N. 2010. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. *Process Biochemistry*, **45**(8), 1348-1354.

Sarda, L.E., Desnuelle, P. 1958. Action de la lipase pancréatique sur les esteres en emulsion. *Biophys. Acta*, **30**, 513-521,.

Schuchardt, U., Sercheli, R., Vargas, R.M. 1998. Transesterification of vegetable oils: a review. *J. Braz. Chem. Soc.*, **9**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 199-210.

Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C., Gatti-Lafranconi, P., Brocca, S., Lotti, M., Jaeger, K.-E., Puls, M., Eggert, T. 2006. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **39**(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 166-170.

Sementes, G.R. 2010. Nabo Forrageiro.

Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., Tominaga, Y. 1999. **Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase.** *Journal of the American Chemists Society*, **76**, 789-793.

Silva, A.R.B., Martinez, M.M., Maia, J.C.d.S., Lins e Silva, M.L., Silva, T.R.B. 2005. Comportamento de cultivares de Nabo Forrageiro (*Raphanus sativus L.*) em função da variação da população de espaçamento entre linhas. in: *II Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel*. Universidade Federal de Lavras.

Skoog, D.A., Hooler, F.J., Neiman, T.A. 2002. *Princípios de Análise Instrumental. 5 ed.* Bookman.

Soares, C.M.F. 2004. Encapsulação da Enzima Lipase em Matrizes Sol-Gel e sua Aplicação em Reações de Hidrólise e Esterificação. in: *Departamento de Engenharia Química, Vol. Doutorado, Universidade Estadual de Maringá. Maringá*, pp. 213.

Sonare, N.R., Rathod, V.K. 2010. Transesterification of used sunflower oil using immobilized enzyme. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **66**(1-2), 142-147.

Standard, A. 2011. Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels. in: *D6751-11b*, ASTM, pp. 9.

Standard., A. 2011. Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels. in: *D6751-11b*, ASTM, pp. 9.

Steenhoek, J. 2000. *Burkholderia cepacia*, (Ed.) djwesten@mst.edu, Vol. 2011, Missouri Biological Science.

Streitwieser, A., Heathcock, C.H., Kosower, E.M. 1992. *Introduction to Organic Chemistry* Macmillan, New York.

Svendsen, A. Sequence comparisons within the lipase family. 1994. Cambridge Univ. Press. p.1-21.

Tagushi, H., Watanabe, H., Onizawa, K., Nagao, T., Gotoh, N., Yasukawa, T., Tsushima, R., Shimasaki, H., Itakura, H. 2000. Double-blind controlled study on the effects of dietary diacylglycerol on postprandial serum and chylomicron triacylglycerol responses in healthy humans. *Journal of the American College of Nutrition*, **19**, 5.

Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., Wang, F. 2010. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, **28**(5), 628-634.

Tomm, G.O. 2007a. Canola : Planta que traz muitos beneficios a saúde humana e cresce em importância no Brasil e no mundo., Embrapa Trigo. Online.

Tomm, G.O. 2007b. Cultivo de Canola, Vol. 3, Embrapa Trigo Sistemas de Produção. Versão Eletrônica.

Tomm, G.O., Santos, H.P., Fontaneli, R.S. 2005. *Principais Forrageiras para Integração Lavoura-Pecuária, sob Plantio Direto, nas Regiões Planalto e Missões do Rio Grande do Sul*

Trevisan, H.C. 2004. Lipases. 1 ed. in: *Enzimas como agentes biotecnológicos*, (Ed.) E.L. Summa, Vol. 1, Said, Suraia

University, C. 2005. Fungal Genomics Project, Vol. 2011. Internet

Valle, P.W.P.A., Rezende, T.F., Souza, R.A., Fortes, I.C.P., Pasa, V.M.D. 2009. Combination of Fractional Factorial and Doehlert Experimental Designs in Biodiesel Production: Ethanolysis of *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Stokes Oil Catalyzed by Sodium Ethoxide. *Energy & Fuels*, **23**, 8.

Vance, D.E., Vance, J.E. 2008. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes. 5 ed*, New York.

Véras, I.C., Silva, F.A.L., Ferrão-Gonzales, A.D., Moreau, V.H. 2011. One-step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from high-acidity waste feedstocks in solvent-free media. *Bioresource Technology*, 102(20), 9653-9658.

Verdugo, C., Luna, D., Posadillo, A., Sancho, E.D., Rodríguez, S., Bautista, F., Luque, R., Marinas, J.M., Romero, A.A. 2011. Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. *Catalysis Today*, **167**(1), 107-112.

Visentainer, J.V., Franco, M.R.B. 2006. *Ácidos Graxos em óleos e gorduras : Identificação e quantificação*. Livraria Varela, São Paulo.

Voll, F.A.P. 2011. Produção e separação de diacilglicerol a partir do triacilglicerol do óleo de palma. in: *Departamento de Engenharia Química*, Vol. Doutorado, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, pp. 117.

Xie, W., Huang, X., Li, H. 2007. Soybean oil methyl esters preparation using NaX zeolites loaded with KOH as a heterogeneous catalyst. *Bioresource Technology*, 98(4), 936-939.

Yahya, A.R.M., Anderson, W.A., Moo-Young, M. 1998. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(7-8), 438-450.

Zaks, A., Klivanov, A.M. 1984. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science*, 224, 3.