

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

SÍLVIO MIGUEL PARMEGIANI MARCUCCI

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS
CARACTERÍSTICAS TEXTURAIS DE SÍLICAS MACRO
E MESOPOROSAS UTILIZADAS COMO SUPORTE
ENZIMÁTICO NA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS A
PARTIR DO ÓLEO DE NABO FORRAGEIRO (*Raphanus
sativus* L.)**

**Maringá
2014**

SÍLVIO MIGUEL PARMEGIANI MARCUCCI

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS
TEXTURAIS DE SÍLICAS MACRO E MESOPOROSAS UTILIZADAS
COMO SUPORTE ENZIMÁTICO NA SÍNTESE DE ÉSTERES
ETÍLICOS A PARTIR DO ÓLEO DE NABO FORRAGEIRO (*Raphanus
sativus* L.)

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Maringá,
como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em
Bioenergia

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Gisella
Maria Zanin

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro
Augusto Arroyo

Maringá

2014

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

M322a Marcucci, Silvio Miguel Parmegiani
Avaliação da influência das características texturais de sílicas macro e mesoporosas utilizadas como suporte enzimático na síntese de ésteres etílicos a partir do óleo de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) / Silvio Miguel Parmegiani Marcucci. -- Maringá, 2014.
90 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin.
Coorientador: Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2014.

1. Sílica MCM-41 - Caracterização. 2. Sílica MCM-41 - Imobilização enzimática. 3. Sílica SBA-15 - Caracterização. 4. Sílica SBA-15 - Imobilização enzimática. 5. Ésteres etílicos - Óleo de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.). 6. Transesterificação enzimática. I. Zanin, Gisela Maria, orient. II. Arroyo, Pedro Augusto, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. IV. Título.

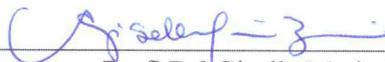
CDD 21.ed. 665.35

AMMA-003014

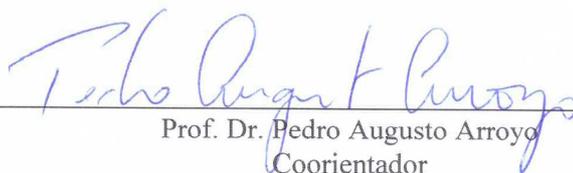
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por **Silvio Miguel Parmegiani Marcucci** perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Bioenergia em 01 de agosto de 2014.

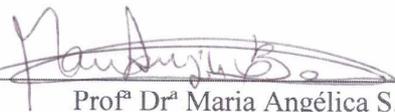
COMISSÃO JULGADORA



Profª Drª Gisella Maria Zanin
Orientadora/Presidente



Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo
Coorientador



Profª Drª Maria Angélica S. D. Barros
Membro



Prof. Dr. Nehemias Curvelo Pereira
Membro

Aos meus pais e minha irmã.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Marilene e Sílvio e à minha irmã por todo apoio e amor incondicional.

À minha orientadora professora Gisella Maria Zanin e ao meu coorientador professor Pedro Augusto Arroyo pela oportunidade de realizar o mestrado, apoio e conhecimento compartilhado. São pessoas que admiro e tenho como exemplo.

Aos avós, tios, tias e primos e ao meu cunhado.

Aos amigos do Laboratório de Catálise Heterogênea e Biodiesel, Elias, Kemely, Rodrigo, Charlene, Lidiane e Elciane.

Aos amigos de Echaporã, Maringá e os que estão pelo Brasil e mundo afora.

À professora Cleide Mara Faria Soares, ao professor Álvaro Lima e ao Anderson da Universidade Tiradentes (Unit) de Aracajú-SE.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Química da UEM, principalmente ao Lauro, Luiza, Valmir e Fiori.

À Joziane e Paola do Laboratório de Adsorção e Troca Iônica (LATI-UEM).

À Alessandra do Laboratório de Espectroscopia (COMCAPE-UEM) pelas análises de infravermelho.

À capes pela concessão da bolsa.

*“Boa Terra, velha esfera, que nos leva onde for
Pro futuro, quem nos dera, que te dessem mais valor.”*

Almir Sater e Paulo Simões

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS TEXTURAIS DE
SÍLICAS MACRO E MESOPOROSAS UTILIZADAS COMO SUPORTE
ENZIMÁTICO NA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DO ÓLEO
DE NABO FORRAGEIRO (*Raphanus sativus* L.)**

Autor: Sílvia Miguel Parmegiani Marcucci

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gisella Maria Zanin (DEQ/UEM)

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo (DEQ/UEM)

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Bioenergia; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, Bloco D-90 ; CEP 87020-900 – Maringá-PR-Brasil, defendida em 01 de agosto de 2014.

RESUMO

Neste trabalho as características texturais de sílicas macro e mesoporosas utilizadas como suporte enzimático foram avaliadas para a síntese de ésteres a partir do óleo não purificado de Nabo Forrageiro (*Raphanus Sativus* L.). Sílicas meso (MCM-41 e SBA-15) e macroporosa (Sílica de Porosidade Controlada, SPC) foram utilizadas sem nenhum tratamento prévio, como suporte para a imobilização da enzima lipase de *Burkholderia cepacia*. A enzima foi imobilizada nas sílicas pela técnica de adsorção. As sílicas e também os biocatalisadores imobilizados foram caracterizados por infravermelho com Transformada de Fourier, Difração de Raios X e adsorção/dessorção de nitrogênio para a determinação de suas características texturais e superficiais. As análises de Difração de Raios X mostraram que há diferenças nas intensidades dos picos característicos para as sílicas antes e após a imobilização, confirmando que a enzima lipase se ligou aos mesmos. As análises de adsorção/dessorção de nitrogênio demonstraram que a enzima ficou adsorvida na superfície externa da MCM-41, e no interior da SBA-15. O biocatalisador preparado com a SBA-15 (SBA/Imob.) foi o que apresentou maior capacidade de retenção da enzima (2,09 mg proteína/g de suporte seco). Além disso, testes de atividade de hidrólise, esterificação, influência da temperatura e da variação do pH no meio reacional, e testes de estabilidade operacional foram realizados. Por fim, os biocatalisadores foram utilizados na reação de transesterificação do óleo de Nabo Forrageiro. De acordo com os resultados obtidos, a imobilização foi positiva para a reação de esterificação e para os testes de estabilidade

térmica e a variação do pH do meio reacional, pois os biocatalisadores imobilizados demonstraram melhor desempenho, quando comparados à enzima livre. Somente o biocatalisador preparado com a utilização da MCM-41(MCM/Imob.) apresentou estabilidade menor do que a enzima livre no teste de variação do pH possivelmente devido às mudanças estruturais e superficiais no suporte. O biocatalisador SBA/Imob. apresentou maior capacidade de retenção das proteínas no teste de lixiviação e se mostrou mais ativo no teste de reuso na reação de hidrólise do azeite de oliva demonstrando ser mais estável ao reuso. Os biocatalisadores imobilizados proporcionaram maiores rendimentos em ésteres na reação de transesterificação. Dentre os biocatalisadores imobilizados, o que foi preparado com o uso da SPC foi o mais eficiente, pois sua eficiência catalítica foi de 35,5 g de ésteres/mg de proteína contra 26 g de éster /miligrama de proteína para o preparado com a MCM/Imob. e 16,14 g de éster/miligrama de proteína com a SBA/Imob. Os resultados sugerem que o suporte que permite a melhor distribuição das enzimas em sua superfície e menor restrição à difusão interna do substrato até a enzima possuiu melhor desempenho catalítico na reação de transesterificação.

**EVALUATION OF THE INFLUENCE OF THE TEXTURAL PROPERTIES
MACRO AND MESOPOROUS SILICAS USED AS AN ENZYMATIC
SUPPORT FOR SYNTHESIS OF ETHYL ESTERS FROM RADISH OIL
(*Raphanus sativus L.*)**

Author: Sílvio Miguel Parmegiani Marcucci

Supervisor: Prof. Dr. Gisella Maria Zanin (DEQ/UEM)

Co-supervisor: Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo (DEQ/UEM)

Master Thesis; Bioenergy Graduate Program; State University of Maringá; Colombo Av., 5790, D-90; ZIP 87020-900 – Maringá-PR-Brazil, presented in August, 01th 2014.

ABSTRACT

In the present study, the textural characteristics of macro and mesoporous silicas used as an enzymatic support for the production of esters from *Raphanus sativus L.* crude oil, were evaluated. Mesoporous (MCM-41 and SBA-15) and macroporous (Controlled Pore Silica CPS) silica were used without any pretreatment as support for immobilization. Silicas and immobilized biocatalysts were characterized by FTIR and X-ray diffraction and adsorption / desorption of nitrogen were used to characterize the MCM-41 and SBA-15 before and after lipase from *Burkholderia cepacia* immobilization. The enzyme was immobilized in the mesoporous silica by adsorption. The analysis of X-ray diffraction for silica showed difference in the peaks before and after immobilization, confirming that the enzyme bound to them. The analysis of the adsorption / desorption of nitrogen showed that the enzyme was adsorbed onto the external surface of MCM-41, while lipase had access into the SBA-15. The biocatalyst prepared SBA-15 (SBA / Imob.) showed the highest retention capacity of the enzyme (2.09 mg of protein/g of dry support). Furthermore, activity by hydrolysis, esterification, and the influence of temperature and pH in the reaction and the biocatalyst stability in reuse were evaluated. Finally the biocatalysts were used in the transesterification reaction of *Raphanus sativus L.* oil. According to the results, the immobilization was positive for the esterification reaction, thermal stability and the pH of the reaction medium tests, because the immobilized biocatalysts showed a better performance compared to the free enzyme. Only the biocatalyst prepared using MCM-

41 (MCM / Imob.) showed less than the free enzyme in the pH test possibly due to structural changes in the support surface. The biocatalyst prepared using the SBA-15 presented greater capacity retention of proteins in the leaching test, and was more active in the test for reuse in the hydrolysis reaction of olive oil. Regarding the production of ethyl esters, higher yields immobilized biocatalysts. Of the immobilized biocatalysts, which was prepared using the SCP was the most efficient (35.5 g of ester /mg of protein) to 26 (g ester/milligram of protein) MCM / Imob. and 16.14 (g ester/milligram of protein) with the SBA /Imob.. These results suggest that the support has a better distribution of the enzyme on the surface and lower internal diffusivity restriction of substrates have a better catalytic performance in the transesterification reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Distribuição das Matérias-Primas Utilizadas para a Produção Nacional de Biodiesel.....	5
Figura 2.2 - Reação de Transesterificação Catalítica. R ₁ , R ₂ , R ₃ e R ₄ são as cadeias carbônicas.....	6
Figura 2.3 - Representação tridimensional da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> . A tampa “lid” que recobre o sítio ativo na forma fechada está em verde e na forma aberta em azul. O íon de cálcio está destacado em amarelo.	7
Figura 2.4 - Técnicas de Imobilização A) adsorção; B) inclusão em matriz porosa; C) ligação covalente.	9
Figura 2.5 - Espectros no IVTF: a) MCM-41 ; e b)SBA-15.	13
Figura 2.6 - Difratoograma de raios X da amostra de MCM-41.	14
Figura 2.7 - Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio para amostras de MCM-41 e SBA-15.....	15
Figura 4.1 - Espectros no IVTF obtidos para MCM-41 antes da calcinação e MCM/CF.	36
Figura 4.2 - Espectros no IVTF obtidos para SBA-15 e para amostra calcinada SBA/CE.....	37
Figura 4.3 - Espectro no IVTF da Sílica de Porosidade Controlada (SPC).....	38
Figura 4.4 - Espectros IVTF obtidos para enzima livre e biocatalisadores imobilizados.	39
Figura 4.5 - Difratoogramas das sílicas utilizadas como suporte a) MCM-41 e MCM/CF; b) SBA-15 e SBA/CE e c) SPC.....	40
Figura 4.6: Difratoogramas de raios X das sílicas utilizadas como suporte antes e após a imobilização da enzima: a) MCM/CF e MCM/Imob. e b) SBA/CE e SBA/Imob.....	42
Figura 4.7 - Isotermas de Adsorção/Dessorção de nitrogênio para MCM/CF.	43
Figura 4.8 - Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio SBA/CE.....	44
Figura 4.9 - Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio para: a) MCM/CF e MCM/imob. e b) SBA/CE e SBA/Imob.....	45
Figura 4.10 - Atividade Hidrolítica Específica em função do biocatalisador, para a temperatura de 50 °C.	48

Figura 4.11 - Atividade de Esterificação do ácido oleico em função do tipo de biocatalisador, para a temperatura de 50 °C.....	50
Figura 4.12 - Atividade Relativa dos biocatalisadores em função da variação da temperatura na reação de hidrólise do azeite de oliva.....	51
Figura 4.13 - Efeito da variação do pH do meio reacional para a reação de hidrólise do azeite de oliva a 50 °C.....	53
Figura 4.14 - Porcentagem de proteína desorvida dos biocatalisadores desorvidas em função do tempo de permanência em uma solução tampão em pH 7,0, a 50 °C.....	55
Figura 4.15 - Atividade residual dos biocatalisadores imobilizados em relação aos ciclos operacionais, para a reação de hidrólise do azeite de oliva a 50 °C e em pH 7,0.....	56
Figura 4.16 - Eficiência catalítica dos biocatalisadores na produção de ésteres etílicos, para a reação de transesterificação do óleo de Nabo Forrageiro, razão molar álcool:óleo 3:1, utilizando 0,2 g de biocatalisador, para temperatura de 50 °C.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Composição em Ácidos Graxos do Óleo de Nabo Forrageiro.	35
Tabela 4.2 - Distâncias interplanares e parâmetros de cela unitária das amostras de partida e calcinada.	41
Tabela 4.3 - Características texturais das sílicas e biocatalisadores imobilizados.	46
Tabela 4.4 - Umidade presente nos biocatalisadores e quantidade de proteína adsorvida.	47
Tabela 4.5: Atividade específica e atividade relativa dos biocatalisadores em função da variação da temperatura na reação de hidrólise do azeite de oliva.	52
Tabela 4-6 - Efeito da variação do pH do meio reacional na atividade específica e relativa para a reação de hidrólise do azeite de oliva a 50 oC.	53
Tabela 4.7 - Porcentagem de proteína dessorvida dos biocatalisadores em função do tempo de permanência em uma solução tampão em pH 7,0, a 50 oC.....	55
Tabela 4.8 - Rendimento em éster % e eficiência catalítica em g éster/mg de proteína após 24 horas de reação a 50oC.	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Nabo Forrageiro (<i>Raphanus sativus</i> L.)	3
2.2 Biodiesel	4
2.2.1 Processos de produção.....	5
2.3 Lipases	7
2.3.1 Mecanismo de ação das lipases	8
2.3.2 Imobilização	9
2.3 Sílicas porosas	11
2.3.1 MCM-41	11
2.3.2 SBA-15	12
2.3.3 Caracterização das sílicas mesoporosas mcm-41 e sba-15.....	13
2.3.3.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)	13
2.3.3.2 Difração de raios X.....	14
2.3.3.2 Adsorção/dessorção de nitrogênio.....	15
2.4 Enzimas imobilizadas em sílicas porosas	16
2.4.1 Produção de ésteres por lipases imobilizadas.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Caracterização do óleo de Nabo Forrageiro	21
3.1.1 Índice de acidez e umidade.....	21
3.1.2 Composição em ácidos graxos e determinação da massa molar do óleo	21
3.2 Síntese da MCM-41	23
3.3 Síntese da SBA-15	24
3.4 Sílica de porosidade controlada	24
3.5 Imobilização da lipase	25
3.6 Caracterização das sílicas e biocatalisadores imobilizados	25

3.6.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (IVTF).....	25
3.6.2 Difração de raios X.....	26
3.6.3 Adsorção/dessorção de nitrogênio.....	27
3.7 Umidade	27
3.8 Análise de proteína	27
3.9 Atividade de hidrólise	28
3.10 Atividade de esterificação	29
3.11 Influência da temperatura e do ph do meio reacional na atividade enzimática	30
3.12 Estabilidade operacional dos biocatalisadores	31
3.12.1 Teste de dessorção de proteína	31
3.12.2 – Teste de reuso do biocatalisador na reação de hidrólise do azeite de oliva.....	31
3.13 Síntese de ésteres etílicos a partir do óleo de nabo forrageiro	32
3.13.1 Análise dos produtos reacionais	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Caracterização do óleo de nabo forrageiro	34
4.1.1 Índice de acidez e umidade.....	34
4.1.2 Composição em ácidos graxos e massa molar.....	34
4.2 Caracterização das sílicas e dos biocatalisadores imobilizados	36
4.2.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (IVTF).....	36
4.2.1.1 Sílicas utilizadas como suporte	36
4.2.2 Difractometria de raios X.....	40
4.2.2.1 Sílicas utilizadas como suporte	40
4.2.2.1.1 Biocatalisadores imobilizados	41
4.2.3 Adsorção/dessorção de nitrogênio.....	43
4.2.3.1 Sílicas utilizadas como suporte	43
4.2.3.2 Biocatalisadores imobilizados	45

4.3 Umidade e quantidade de proteína nos biocatalisadores imobilizados	47
4.4 Atividade hidrolítica.....	48
4.5 Atividade de esterificação	49
4.6 Influência da temperatura e do pH na atividade de hidrólise.....	51
4.7 Estabilidade operacional.....	54
4.8 Síntese de ésteres etílicos a partir do óleo de Nabo Forrageiro.....	57
5. CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS	63

NOMENCLATURA

A_0	Área no cromatograma do ácido graxo x
a_0	Parâmetro de cela unitária (nm)
A_T	Soma das áreas obtidas no cromatograma
<i>BET</i>	Brunauer-Emmett-Teller
<i>BJH</i>	Barret-Joyner-Halenda
<i>CTABr</i>	Brometo de Cetiltrimetilamônio
d_{100}	Distância interplanar (nm)
f	Fator de Correção para a solução de hidróxido de sódio
<i>FCT</i>	Fator de correção teórico
<i>MCM/CF</i>	MCM-41 calcinada com fluxo de nitrogênio e ar sintético
<i>MCM-41</i>	Peneira Molecular MCM-41
<i>MCM/imol.</i>	Biocatalisador imobilizado em MCM-41
MM_{agl}	Massa molar média dos ácidos graxos presentes na amostra (g/mol)
$MM_{glicerol}$	Massa molar do glicerol (g/mol)
MM_{H_2O}	Massa molar da água (g/mol)
MM_{oleo}	Massa molar do óleo (g/mol)
N	Índice de refração do ar
M_{al}	Massa da alíquota da reação de esterificação (g)
N	Normalidade da solução de KOH (eq/L)
P	Massa da amostra utilizada na determinação do índice de acidez (g)
<i>PI</i>	Padrão interno
<i>SBA/CE</i>	SBA-15 calcinada em condições estáticas
<i>SBA-15.</i>	Peneira Molecular SBA-15 (Santa Barbara Amorphous 15)
<i>SBA/Imob.</i>	Biocatalisador imobilizado em SBA-15
<i>SPC</i>	Sílica de Porosidade Controlada
<i>SPC/Imob.</i>	Biocatalisador Imobilizado em Sílica de Porosidade Controlada
<i>TEOS</i>	Tetraetilortossilicato
U	Atividade (mmol minuto^{-1})
V	Volume da solução de NaOH 0,1 mol/L gasto na titulação (mL)
V_{al}	Volume da solução de KOH gasto na titulação da alíquota (mL)

V_{KOH}

Volume de hidróxido de potássio de sódio gasto na titulação da amostra reacional total (mL)

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, devido à elevação do preço do petróleo, diminuição das reservas, aumento da demanda por combustíveis e questões ambientais, fontes alternativas de energia têm sido estudadas e desenvolvidas com a finalidade de diminuir a dependência em relação aos combustíveis fósseis. Neste contexto destaca-se o biodiesel, que pode substituir parcialmente ou totalmente o diesel derivado de petróleo (MA e HANNA, 1999).

O biodiesel é uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos e é obtido por meio da esterificação destes ácidos ou transesterificação de triacilgliceróis. É um biocombustível que pode ser produzido a partir de óleos vegetais, gorduras animais, resíduos da indústria oleoquímica, óleo de microalgas, óleo residual de fritura, entre outros. Em relação ao petrodiesel as vantagens apresentadas pelo biodiesel estão no fato deste ser biodegradável, sua queima gerar menos emissões de dióxido e monóxido de carbono, menor quantidade de enxofre em sua composição, possuir maior eficiência de combustão, e ainda matérias-primas renováveis e regionais podem ser utilizadas para sua produção (RAMOS et al., 2011; BANKOVIĆ-ILIC; STAMENKOVIĆ; VELJKOVIĆ, 2012).

A alcoólise com a utilização de catalisadores homogêneos ácidos ou básicos é a rota reacional comumente usada na indústria para a produção de biodiesel. A catálise homogênea apresenta altos rendimentos em ésteres (geralmente mais de 96%), baixo custo dos catalisadores e alta produtividade, comparada aos demais tipos de catálise, mas existe a dificuldade de recuperação do catalisador, do glicerol produzido e dificuldade de purificação dos produtos. No caso da catálise homogênea alcalina existe o problema da saponificação quando se utiliza matérias-primas sem tratamento prévio, que apresentem acidez maior que 2 mg KOH/g (STAMENKOVIĆ; VELICKOVIC; VELJKOVIC, 2011).

Ao contrário da catálise homogênea, quando se empregam enzimas lipases como catalisadores não existe a necessidade de se utilizar insumos purificados (não há restrição na utilização de insumos com elevada quantidade de ácidos graxos livres) e a recuperação do produto e purificação são mais fáceis. Entretanto, o uso de enzimas na reação aumenta os custos de produção de tal modo que essa prática é atualmente inviável para a produção de biodiesel em larga escala. Uma maneira de diminuir os custos relativos às enzimas é sua imobilização em uma matriz adequada (inerte ao meio

reacional, térmica e mecanicamente estável), permitindo, assim, sua reutilização, além de melhorar sua estabilidade operacional (ZHANG et al., 2012).

A imobilização pode ser dividida em três métodos, sendo estes ligação ao suporte (adsorção, ligação covalente, interações iônicas), inclusão em matriz polimérica e ligação cruzada (ligação entre enzimas sem o uso de suporte). Além da técnica de imobilização, o tipo de suporte, orgânicos, inorgânicos, poroso e não poroso, tem grande influência na imobilização. As características dos suportes inorgânicos porosos, tais como tamanho de poros, tamanho de partículas e morfologia, estabilidade e natureza da interação entre a superfície do suporte e da enzima influenciam a eficiência catalítica da lipase (HARTMANN e JUNG, 2010; HUDSON; COONEY; MAGNER, 2008).

A pesquisa teve como objetivo avaliar a influência das características texturais de sílicas macro e mesoporosas utilizadas como suporte para a imobilização da enzima lipase de *Burkholderia cepacia* e sua aplicação reação de transesterificação do óleo de Nabo Forrageiro.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

-Sintetizar e caracterizar as sílicas mesoporosas altamente ordenadas MCM-41 e SBA-15, e também caracterizar a Sílica de Porosidade Controlada comercial;

-Imobilizar a enzima lipase nas sílicas sintetizadas e na comercial por meio da adsorção;

-Avaliar a massa de proteína retida em cada tipo de suporte;

-Avaliar os biocatalisadores na reação de hidrólise do azeite de oliva e esterificação do ácido oléico, utilizadas como reações padrão;

-Avaliar o comportamento dos biocatalisadores em relação à variação de temperatura do meio e de pH;

-Avaliar da estabilidade operacional das enzimas imobilizadas/biocatalisadores em teste de lixiviação de proteínas e reuso na reação de hidrólise do azeite de oliva.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nabo Forrageiro (*Raphanus sativus* L.)

A oleaginosa *Raphanus sativus* L., conhecida popularmente por Nabo Forrageiro, é uma planta crucífera, alógama, pertencente à família *Brassicaceae*, e tem sua aplicação como cultura para adubação de inverno, em que há pouca utilização de terras agriculturáveis, principalmente, nas regiões sul e centro-oeste do Brasil incluindo o Estado de São Paulo (CREMONEZ et al., 2013; LIMA et al., 2007).

Quanto ao seu cultivo, o Nabo Forrageiro tem ciclo anual com florescimento em torno de 80 dias, alcançando a maturação em 120 dias, e o período de produção é de 3 meses. A produtividade em grãos está entre 0,5 t/ha a 1,5 t/ha e a sua semente possui em média um teor de óleo de 35%, com rendimento de 150 kg/ha a 550 kg/ha de material graxo (EMBRAPA, 2014).

De acordo com Sha e colaboradores (2013), o teor de óleo das sementes do Nabo Forrageiro é maior que o relatado para a soja, o algodão e outras fontes de matéria lipídica, apresentando vantagens em relação ao método de extração, que pode ser feito por meio de prensagem mecânica.

O óleo de Nabo Forrageiro tem como principal componente em sua composição o ácido oléico (C18:1), que possui uma única insaturação. Esta característica é de grande importância do ponto de vista da estabilidade, pois os óleos compostos com maiores quantidades de ácidos mono-insaturados são mais estáveis ao processo de oxidação, degradação e polimerização do que os constituídos com porções maiores de ácidos poli-insaturados (ÁVILA e SODRÉ, 2012; CORSINI e JORGE, 2006). Outro ácido graxo encontrado no óleo de Nabo Forrageiro é o erúico (C22:1), que possui características antinutricionais, impossibilitando sua utilização como fonte de nutrição humana ou animal (CHAMMOUN; GELLER; DAS, 2013).

Por possuir melhor estabilidade oxidativa em relação ao óleo de soja, dispor de características físico-químicas adequadas para a produção, não ser um competidor do ponto de vista de matérias-primas edíveis, o óleo de Nabo Forrageiro possui grande potencial como insumo para a produção de biodiesel (DOMINGOS et al., 2008).

2.2 Biodiesel

O biodiesel pode ser definido como uma mistura de ésteres alquílicos, geralmente ésteres metílicos e etílicos, e é utilizado como substituto total ou parcial do diesel de petróleo se estiver de acordo com normas de qualidade, tais como, por exemplo, a americana ASTM D6751 e a europeia EN 14214, que são as mais conhecidas e adotadas como referência e base para outros padrões (BANKOVIĆ-ILIĆ; STAMENKOVIĆ; VELJKOVIĆ, 2012; LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

Muitas características apresentadas pelo biodiesel são vantajosas em relação às demonstradas pelo diesel de petróleo. Assim, ele exibe maior lubrificidade que o diesel S15 (<15 ppm de enxofre), possui ponto de autoignição maior, tornando-o mais seguro ao manuseio e estocagem, é um combustível biodegradável, pode ser obtido a partir de insumos regionais e renováveis e as emissões provenientes da sua combustão são menos tóxicas. O biodiesel também apresenta desvantagens em relação ao petrodiesel, assim como menor estabilidade oxidativa e de estocagem, preço mais elevado dependendo do tipo de matéria-prima utilizada, menor conteúdo volumétrico de energia e maior emissão de óxidos de nitrogênio. Porém, algumas dessas desvantagens podem ser eliminadas com o uso de antioxidantes, redução no tempo de estocagem e utilização de matérias-primas com custos menores (MOSER, 2009).

Diversas fontes de lipídeos têm sido utilizadas como matéria-prima para a produção de biodiesel. Óleos vegetais, gordura animal e também outras fontes de material graxo como óleo de microalgas, resíduos de fritura e sobras da indústria oleoquímica são alguns exemplos (ADEYEMI; MOHIUDDIN; JAMEEL, 2011).

No Brasil, de acordo com boletim mensal da ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis), durante o mês de abril de 2014, a matéria-prima com maior participação na produção nacional de biodiesel foi o óleo de soja com 75,98% (ANP, 2014). A distribuição percentual dos insumos utilizados se encontra na Figura 2.1.

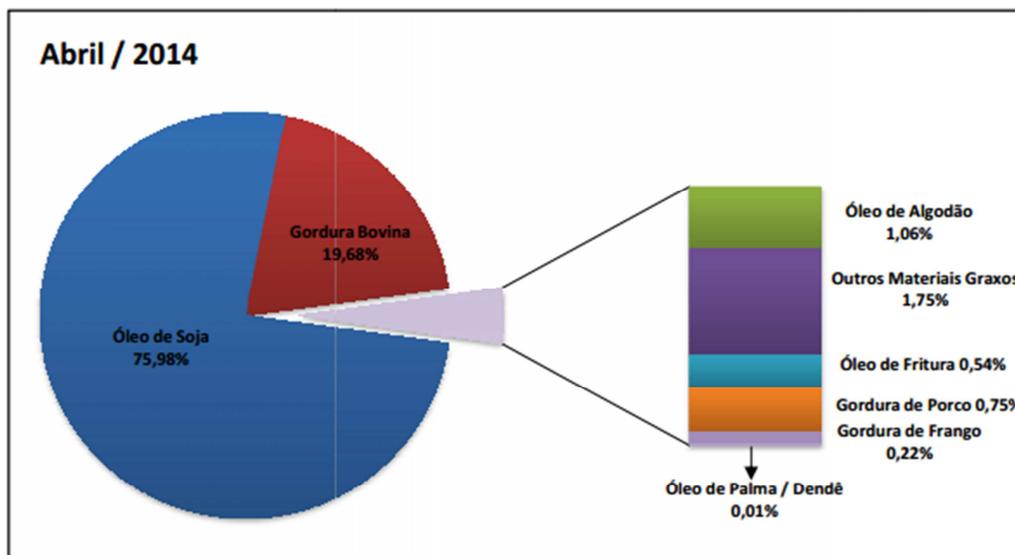


Figura 2.1 - Distribuição das Matérias-Primas Utilizadas para a Produção Nacional de Biodiesel.

FONTE: ANP (2014).

Como pode ser observado na Figura 2.1, a gordura bovina ocupa o segundo lugar como matéria-prima utilizada, com 19,68% de participação. O óleo de soja e a gordura bovina possuem características físico-químicas distintas, surgindo assim a necessidade de diferentes tipos de processos para a produção do biodiesel.

2.2.1 Processos de produção

Os processos de produção para o biodiesel são variados, podendo ser utilizadas técnicas como a reação de pirólise, esterificação e transesterificação (RAMOS *et al.*, 2011).

A pirólise consiste na quebra das ligações éster e ligações das cadeias carbônicas dos triésteres por meio do uso de temperaturas acima de 350 °C, em condições restritas de oxigênio e na presença ou ausência de catalisador (SUAREZ *et al.*, 2009).

O método da esterificação pode ser utilizado em materiais com quantidades de ácidos graxos livres tal que seja inviável o processo de transesterificação mediante catálise alcalina. Os ácidos graxos livres presentes no material são, primeiramente transformados em ésteres com o uso de um catalisador ácido, para então passar para um

segundo estágio, que é a transesterificação com a utilização de catalisador alcalino. Outra alternativa é a hidrólise dos triacilgliceróis, para posterior esterificação com a formação de ésteres alquílicos (CHONGKHONG *et al.*, 2007).

De acordo com Krishnakumar; Vekatachalapathy; Elancheliyan (2008), a transesterificação é classificada como transesterificação supercrítica, transesterificação supercrítica não catalítica e transesterificação catalítica, que é a mais utilizada para a produção de biodiesel.

A Figura 2.2 ilustra a reação de transesterificação catalítica.

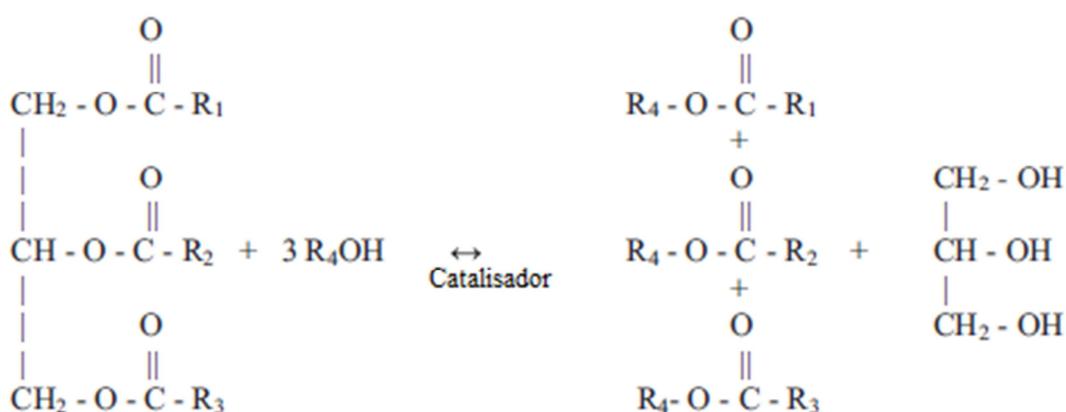


Figura 2.2 - Reação de Transesterificação Catalítica. R₁, R₂, R₃ e R₄ são as cadeias carbônicas.

FONTE: Adaptado de Atadashi *et al.*(2013).

A transesterificação catalítica consiste em transformar o triacilglicerídeo e o álcool em monoésteres alquílicos e glicerol com a utilização de um catalisador homogêneo, heterogêneo ou enzimático. Geralmente, os catalisadores utilizados para a produção de biodiesel são os homogêneos alcalinos, devido ao seu preço relativamente mais baixo e melhor desempenho catalítico que os demais catalisadores (ATADASHI *et al.*, 2013).

Apesar das vantagens dos catalisadores homogêneos alcalinos, quando estes são utilizados, existe a necessidade de estágios múltiplos para a purificação do produto final, pois há a possibilidade de formação de sabão pela presença de ácidos graxos livres, o que torna difícil a separação do produto reacional, com maior geração de resíduos.

A transesterificação com a utilização de enzimas lipases é uma opção para contornar esses tipos de problemas, pois as enzimas são capazes de converter os ácidos graxos livres em ésteres, não há formação de sabão e a temperatura de reação é menor que a usada na catálise homogênea gerando menor gasto energético (SHIMADA et al., 2002).

2.3 Lipases

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases) pertencem à classe das hidrolases e tem como função natural catalisar a reação de hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, ou seja, mais de 10 átomos de carbono. Podem atuar em meio aquoso e orgânico e exibem propriedades enantiosseletivas, o que as tornam um biocatalisador de grande interesse por parte das indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos, de síntese orgânica entre outras. (CARVALHO et al., 2005; THAKUR, 2012).

As fontes de obtenção das lipases são variadas, podendo ser extraídas de plantas, animais, bactérias, leveduras e fungos. Para aplicações industriais as lipases mais utilizadas são as derivadas de microrganismos (MESSIAS et al., 2011). A Figura 2.3 ilustra uma representação tridimensional de uma lipase microbiana de *Burkholderia cepacia*.

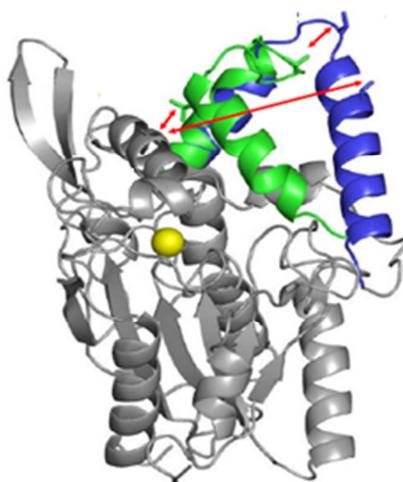


Figura 2.3 - Representação tridimensional da lipase de *Burkholderia cepacia*. A tampa “lid” que recobre o sítio ativo na forma fechada está em verde e na forma aberta em azul. O íon de cálcio está destacado em amarelo.

Fonte: Adaptado de Trodler; Schidt; Pleiss (2009).

As diferentes lipases possuem formas estruturais similares, sendo compostas por um enovelamento das α – hélices, arranjo helicoidal que uma cadeia polipeptídica assume com suas ligações peptídicas rígidas, e das folhas β , estrutura em forma de ziguezague em que as ligações de hidrogênio são formadas entre os segmentos adjacentes da cadeia de polipeptídeos. Os sítios ativos também são os mesmos para a maioria das lipases, sendo formados pela tríade catalítica serina, histidina e ácido glutâmico (NELSON e COX, 2002; TRODLER; SCIDT; PLEISS, 2009).

2.3.1 Mecanismo de ação das lipases

Em contraste com outros tipos de enzimas, as lipases podem atuar especificamente em diferentes substratos e não apenas no seu substrato natural. As reações de hidrólise, esterificação, transesterificação, alcoólise, acidólise e aminólise podem ser catalisadas eficientemente por lipases (LUIĆ et al., 2008.; TOMIĆ e KOJIĆ-PRODIĆ, 2002).

O mecanismo de ação das lipases consiste no fenômeno da ativação interfacial em que a tampa “lid”, peptídeo anfifílico que recobre o sítio ativo da lipase, em contato com a interface água/lipídeo, se movimenta expondo o sítio ativo ao substrato ocorrendo assim a ação catalítica da lipase. Entretanto, algumas lipases não apresentam o fenômeno da ativação interfacial, como, por exemplo, lipase de *Pseudomonas glumae* e *Candida Antarctica* (tipo B.) (SCHMID e VERGER, 1998)

Parâmetros como pH do meio reacional, temperatura e presença de solventes orgânicos podem afetar a estrutura conformacional das lipases, modificando-a de tal modo que o sítio ativo se torne inacessível aos substratos e, também, podem provocar a decomposição química da enzima, coagulação e agregação. Todos esses fatores contribuem para a diminuição e até a perda da atividade catalítica (IYER e ANANTHANARAYAN, 2008; ZOU et al., 2010)

Para contornar esses problemas técnicos a imobilização tem sido utilizada, pois tal processo aumenta a estabilidade em diferentes condições operacionais, tais como temperatura e pH do meio, além de proporcionar a recuperação e reuso dos biocatalisadores e aumentar a estabilidade ao armazenamento (relativa à autólise das enzimas) (MITCHELL e PÉREZ-RAMIREZ, 2011).

2.3.2 Imobilização

A imobilização é uma técnica que consiste em ancorar a enzima em um suporte restringindo parcialmente ou totalmente seu movimento no meio reacional (TAHER et al., 2011). Alguns exemplos de técnicas de imobilização utilizadas são a adsorção, a ligação covalente e a inclusão em matriz porosa (Figura 2.4).

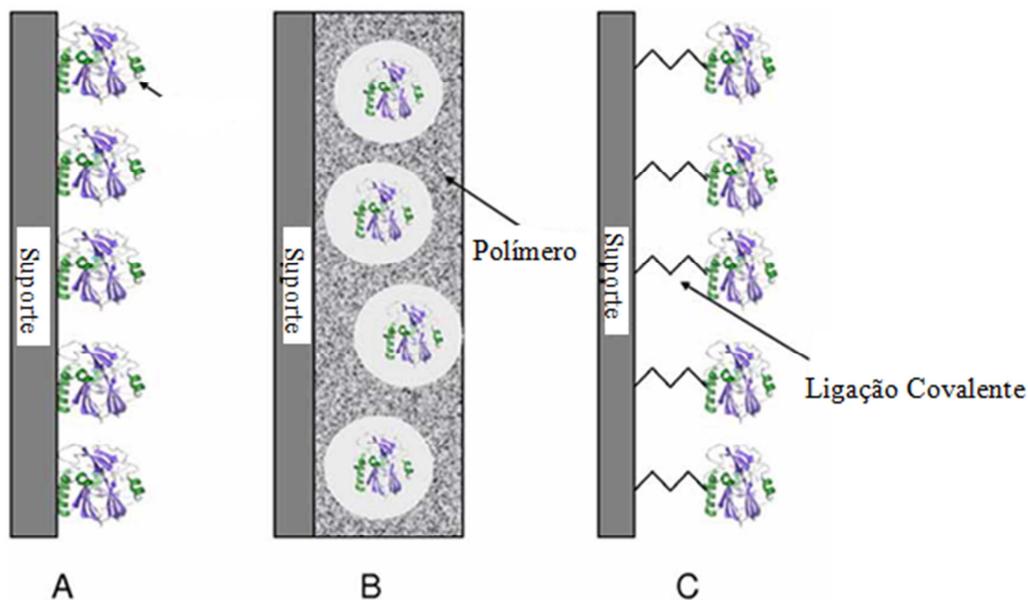


Figura 2.4 - Técnicas de Imobilização A) adsorção; B) inclusão em matriz porosa; C) ligação covalente.

Fonte: Adaptado de Spahn e Minteer (2008).

A adsorção é baseada na interação da superfície do suporte com a enzima por meio de ligações não iônicas, como forças de van der Waals, interações hidrofóbicas ou forças de dispersão. Este método é relativamente fácil de executar, não há a necessidade de aditivos químicos e as enzimas imobilizadas apresentam maior natividade catalítica quando comparada às demais técnicas. Assim o processo de adsorção tem sido mais utilizado na imobilização de enzimas. A maior desvantagem está no fato de ocorrer a lixiviação das enzimas para o meio reacional, contaminando o produto final e, também, há a perda da eficiência catalítica na reutilização do biocatalisador (ZHANG et al., 2012).

O processo de imobilização por ligação covalente consiste no compartilhamento de elétrons entre o suporte e a enzima proporcionando maior estabilidade e evitando a perda para o meio reacional. Apesar de ser uma técnica que gera um biocatalisador mais estável, em comparação ao processo de adsorção, seu custo é mais elevado, as condições de preparo são mais prejudiciais e a enzima pode perder sua atividade durante o curso da imobilização (SPAHAN e MINTEER, 2008; ZHANG *et al.*, 2012).

A inclusão em matriz porosa tem como fundamento o confinamento da enzima em uma base polimérica permeável. Esse processo de imobilização é mais estável que o de adsorção e, ao contrário da ligação covalente, as enzimas mantêm a estabilidade e atividade. Limitações de transferência de massa são os problemas apresentados por essa técnica e somente substratos com baixa massa molar podem ser efetivamente catalisados pelas enzimas (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013).

Diversos elementos influenciam o desempenho das lipases imobilizadas, incluindo os métodos de imobilização anteriormente citados, o pré-tratamento das enzimas antes da imobilização e o tipo de suporte utilizado (ZHANG *et al.*, 2012).

O suporte deve ser insolúvel ao substrato e térmica, química e mecanicamente estável ao meio reacional. Outras características que o suporte deve apresentar são a afinidade pela ligação com a enzima e não provocar sua desnaturação e inativação (HARTMANN e KOSTROV, 2013). Materiais orgânicos como alginato, quitosana, colágeno, celulose e polímeros sintéticos têm sido usados no ancoramento de enzimas, assim como materiais inorgânicos, tais como as zeólitas, cerâmicas, celite e sílicas (DATTA *et al.*, 2013).

As sílicas mesoporosas, com poros que variam de 1,5 até 30 nm, dependendo do surfatante utilizado ou condições de síntese, permitem que proteínas com diâmetros maiores que o tamanho de poros das zeólitas tenham acesso à sua superfície interna que possui área específica relativamente alta. Além disso, as sílicas mesoporosas são insolúveis em água, térmica e quimicamente estáveis, resistentes a ataques de microrganismos e possuem grupos funcionais em sua superfície capazes de se ligarem às enzimas e, também, sofrerem modificações. Todas essas características tornam esse material um suporte com propriedades adequadas para ser utilizado na imobilização enzimática (ZHOU e HARTMANN, 2013).

2.3 Sílicas porosas

As sílicas porosas são materiais inorgânicos resultantes da policondensação de diferentes fontes de sílica (silicato de sódio, sílicas fundidas ou tetraetilortossilicato), na presença ou ausência de surfatantes e as que apresentam diâmetro médio de poros que variam entre 2 e 50 nm e mais de 50 nm podem ser classificadas como sílicas meso e macroporosas, respectivamente. Os parâmetros que determinam as características estruturais, como diâmetro, volume e geometria de poros e área específica, são: fonte de sílica, o tipo de surfatante, temperatura, pH e composição da mistura reacional (GIRALDO *et al.*, 2007).

Dentre as sílicas porosas existem as que possuem poros altamente ordenados, uniformes e que se encontram dentro da faixa da mesoporosidade como é o caso da MCM-41 e SBA-15 (CORMA, 1997; WAN e ZHAO, 2006).

2.3.1 MCM-41

A MCM-41 é a sílica mesoporosa mais estudada e pode ser sintetizada em diversas condições, mais comumente em meio alcalino e com o uso de Brometo de Cetiltrimetilamônio como surfatante. É uma peneira molecular com arranjo hexagonal de poros, que podem variar entre 1,5 e 10 nm e o diâmetro de poros pode ser controlado com a escolha do surfatante, adição de substâncias orgânicas, que atuam como agentes expansores, e mudanças nas condições reacionais (WAN e ZHAO, 2006; ZHAO; ;LU; MILLAR, 1996).

Os mecanismos de formação propostos para a MCM-41 são os seguintes:

1) Mecanismo de Molde por Cristal Líquido, em que as moléculas do surfatante se organizam formando micelas que agem como molde para a formação de um esqueleto de silicato, possuindo as mesmas características do molde formado pelas micelas após a sua remoção. Dois possíveis caminhos para esse mecanismo são: (i) as moléculas do surfatante se organizam em forma de cristal líquido hexagonal e posteriormente as espécies inorgânicas se polimerizam na superfície hidrofílica do cristal líquido; e (ii) existe a autocooperação entre as espécies do surfatante e do material inorgânico na formação da estrutura hexagonal (ZHAO; LU; MILLAR, 1996);

2) Mecanismo de Transformação da fase Lamelar para a Hexagonal, o qual tem como princípio a formação de oligômeros de sílica que atuam como ligantes

multidentados. Os oligômeros permitem a configuração lamelar do surfatante devido à sua elevada densidade de carga e, quando ocorre a polimerização da sílica, existe a diminuição dessa densidade de carga e, então, há um aumento da área da “cabeça” hidrofílica do surfatante. Isso leva a uma ondulação das camadas de silicato, resultando na precipitação da mesofase hexagonal (SCWANKE e PERGHER, 2012).

3) Mecanismos de Organização Cooperativa entre o Surfatante e a Espécie Inorgânica ou entre o Surfactante, Espécie Inorgânica e um Contra-íon. As rotas propostas são: (i) surfatantes catiônicos (S^+) são direcionadores de estrutura das espécies inorgânicas (I^-); e (ii) contra íons negativos (X^-) auxiliam as interações entre espécie inorgânica catiônica (I^+) e o surfatante catiônico (S^+) (HUO et al., 1994; SCWANKE e PERGHER, 2012).

2.3.2 SBA-15

A SBA-15 é uma sílica mesoporosa, com poros ordenados, estrutura hexagonal e que apresentam diâmetro de poros na faixa de 4,6 a 30 nm. Na sua síntese podem ser utilizados diversos copolímeros anfifílicos como surfatantes acompanhados de moléculas de cossolventes orgânicos (ZHAO et al., 1998a; WAN e ZHAO, 2006).

O mecanismo de síntese proposto por Zhao e colaboradores (1998b) baseia-se na interação da interface orgânico-inorgânico das espécies abaixo do ponto isoelétrico da sílica (pH 2-6). Com a utilização de um surfatante catiônico e a síntese ocorrendo em meio ácido, ajustado com o uso de HCl, as interações acontecem entre o surfatante catiônico (S^+), o ânion cloreto (Cl^-) e as espécies de sílica catiônicas, ou seja, grupos Si-OH protonados (I^+). A partir desse mecanismo de síntese é possível obter diversos tipos de estruturas, como estruturas cúbicas, tridimensional hexagonal e bidimensional hexagonal.

Ainda, segundo Zhao e colaboradores (1998b), o surfatante é a espécie que possui maior influência na formação das mesoestruturas ordenadas e para obtenção da estrutura característica da SBA-15 (estrutura hexagonal bidimensional) é necessária a utilização de copolímeros triblocos como surfatantes.

Diversas técnicas têm sido empregadas para identificar a composição, a estrutura e as características morfológicas das sílicas mesoporosas, tais como, por exemplo, a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, análises por difração de Raios X e isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio.

2.3.3 Caracterização das sílicas mesoporosas MCM-41 e SBA-15

2.3.3.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier baseia-se na interação da radiação eletromagnética na região do infravermelho com as ligações covalentes dos diversos grupos e moléculas presentes no material (SCHMAL, 2011).

Os espectros no infravermelho para as amostras de MCM-41 e SBA-15, após a remoção do surfatante, estão representados na Figura 2.5.

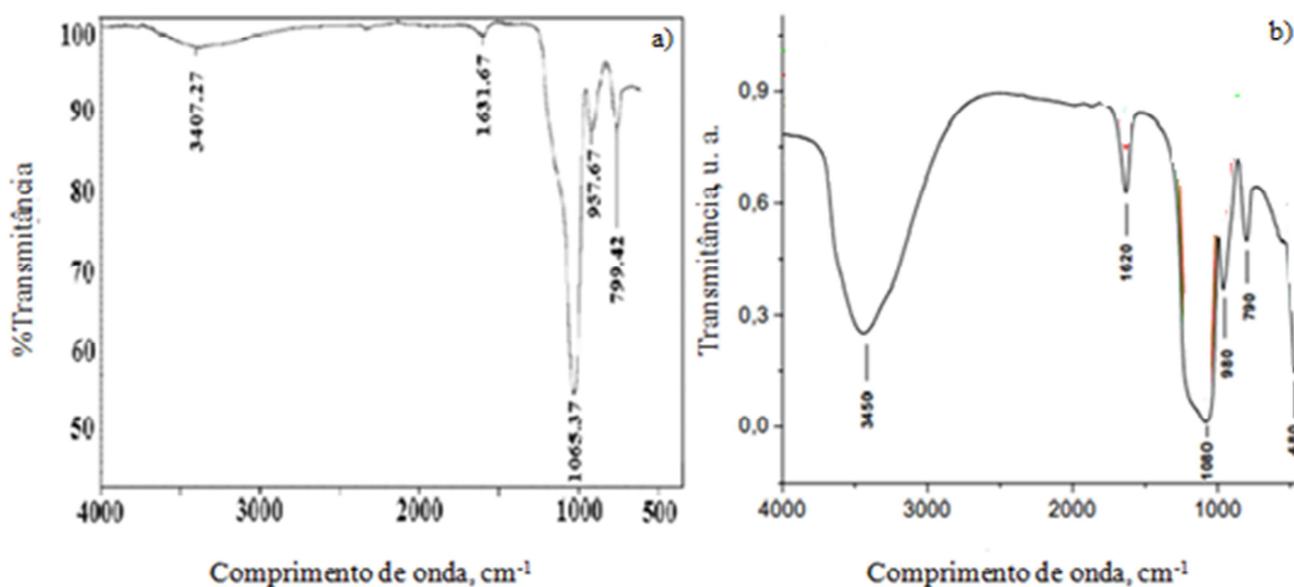


Figura 2.5 - Espectros no IVTF: a) MCM-41 ; e b) SBA-15.

Fonte: Adaptado de Ergun et al. (2013) e Azimov et al. (2012).

Pode ser observado na Figura 2.5a que as bandas características apresentadas nos comprimentos de onda de 3407 e 3450 cm^{-1} correspondem às ligações entre hidrogênio da água e os grupos Si-OH, em 1631 e 1620 cm^{-1} às vibrações das ligações de hidrogênio nos grupos OH e em 1064,37 e 1080 cm^{-1} à extensão das vibrações assimétricas das ligações Si-O-Si. Na Figura 2.5b a banda correspondente ao

comprimento de onda de 480 cm^{-1} pertence às vibrações das ligações Si-O-Si. As bandas nos comprimentos de onda de 790 e 799 cm^{-1} representam o estiramento assimétrico das ligações Si-O-Si e as bandas em 957 e 980 cm^{-1} podem ser associadas às vibrações dos grupos Si-OH presentes na superfície (AZIMOV *et al.*, 2012; ERGÜN *et al.*, 2013).

2.3.3.2 Difração de raios X

Esta técnica tem como fundamento a interação do material analisado com uma onda eletromagnética da ordem de grandeza das ligações entre os átomos e serve para analisar as características estruturais dos materiais, tamanho de cristalitos, medir microdeformação e tensão em amostras de diferentes materiais entre outras. (SCHMAL, 2011).

Para as sílicas MCM-41 e SBA-15 a difração de raios X, a baixo ângulo, serve para determinar o grau de organização do arranjo hexagonal dos mesoporos (MARLER *et al.*, 1996). A Figura 2.6 representa um difratograma de raios X típico da MCM-41, juntamente com a distância interplanar d_{100} e o parâmetro de cela unitária a_0 . Este padrão de difração também é encontrado para a SBA-15, porém, para ângulos ainda menores (ZHAO *et al.*, 1998b), devido a maior distância interplanar, correspondente ao maior diâmetro de poros desta estrutura.

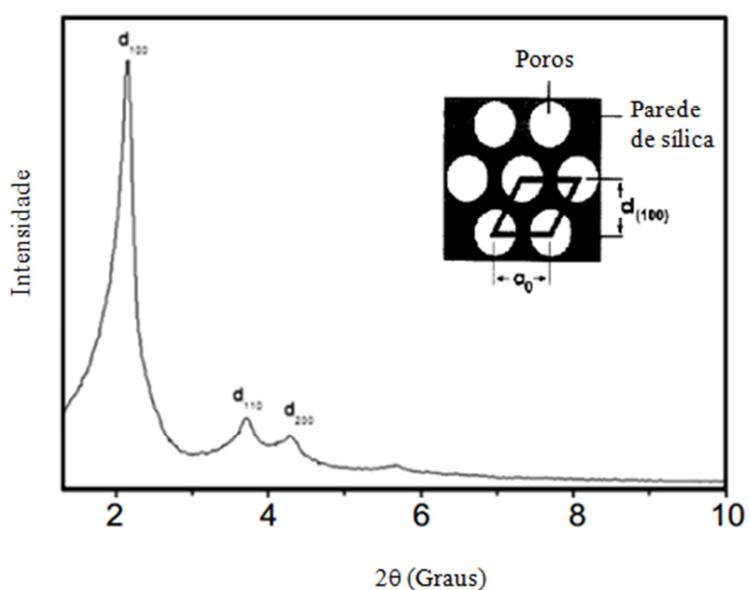


Figura 2.6 - Difratograma de raios X da amostra de MCM-41.

Fonte: Adaptada de Schwanke *et al.* (2013) e Marler *et al.* (1996).

O pico mais intenso representa o ângulo de Bragg indexado ao índice de Miller (100) e por meio desse ângulo é possível determinar a distância interplanar (d_{100}) entre os poros tanto da MCM-41 como da SBA-15. A intensidade desse pico depende do “contraste de espalhamento” entre as paredes dos materiais e a espécie que preenche os seus poros (HAMMOND *et al.*, 1999).

2.3.3.2 Adsorção/dessorção de nitrogênio

A fisissorção de nitrogênio é uma análise caracterizada por interações fracas (forças de van der Waals) entre o adsorbato no estado gasoso e um adsorvente sólido e serve para determinar as características texturais como porosidade, área específica, diâmetro médio de poros entre outros. (SCHMAL, 2011).

A Figura 2.7 ilustra as isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio para amostras de MCM-41 e SBA-15.

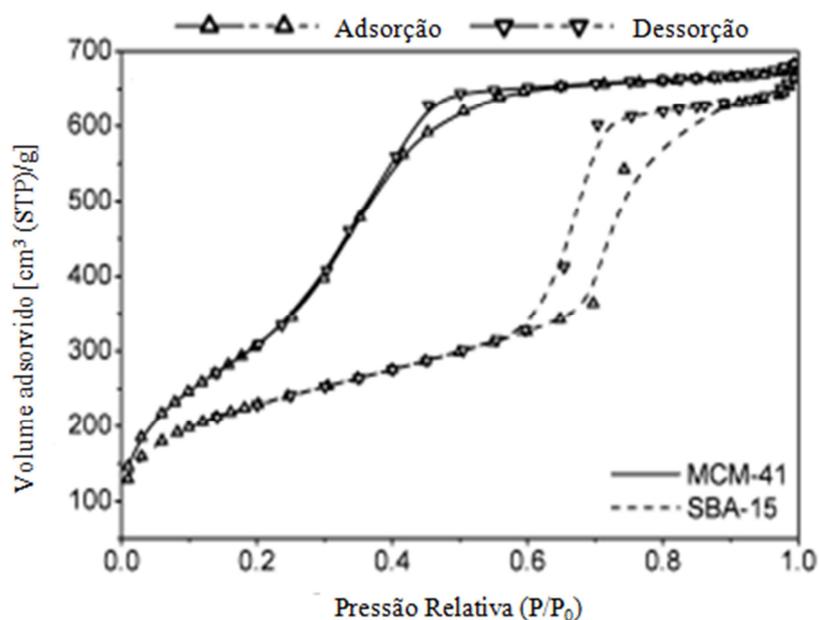


Figura 2.7 - Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio para amostras de MCM-41 e SBA-15.

Fonte: Figura modificada de Hukkamäki *et al.* (2004).

Como pode ser observado na Figura 2.7 as isotermas são do tipo IV, com histerese indicando materiais mesoporosos e faixa estreita de distribuição de tamanho de poros. As histereses são do tipo H1 para MCM-41 as quais representam poros cilíndricos com extremidades abertas (HUKKAMÄK *et al.*, 2004).

2.4 Enzimas imobilizadas em sílicas porosas

No processo de imobilização os suportes afetam a cinética, as propriedades seletivas bioquímicas e mecânicas da enzima e a escolha de um material que proporcione menor restrição espacial e resistência à transferência de massa é muito importante na imobilização. Um suporte apropriado que gere um biocatalisador eficiente pode ser obtido por meio do aumento da área superficial, a possibilidade de ajuste da estrutura e tamanho dos poros e também da morfologia do cristal. As sílicas macro e mesoporosas oferecem essas qualidades para a imobilização de macromoléculas, como é o caso das enzimas, e suas características devem ser avaliadas para escolha dos parâmetros que melhor se adaptam ao processo de ancoragem de proteínas (ZHOU e HARTMAN, 2013).

Serra e colaboradores (2008) avaliaram o efeito dos parâmetros texturais e estruturais de materiais mesoporosos ordenados na imobilização por adsorção de lipase. A partir dos resultados obtidos concluíram que o parâmetro que mais influencia a imobilização é o diâmetro de poros e que outras propriedades texturais, como volume de poros e área específica, não são fatores limitantes. Quanto ao tipo de poro, o que menos oferece restrição difusional para a imobilização da enzima possui maior eficiência na imobilização, porém, a lixiviação também é maior.

O diâmetro de poros da SBA-15 foi o parâmetro que mais teve influência na imobilização e na atividade catalítica, conforme relatado por Kang e colaboradores (2007). As lipases de pâncreas suíno (globulares com diâmetro esférico de 4,6 nm) puderam se acomodar melhor nos poros da SBA(8), com 8 nm de diâmetro enquanto para a SBA(6) que apresentou diâmetro de poros de 6,7 nm, estas tiveram dificuldade em entrar nos canais mesoporosos. Para o material que apresentou diâmetro de poros de 13 nm, os autores afirmaram que não há dificuldade para as enzimas entrarem em seus canais, porém, as enzimas também podem ser mais facilmente difundidas para o exterior dos mesmos.

Gao e colaboradores (2010) imobilizaram lipase de *Candida rugosa* pelo método da adsorção, utilizando como suporte a SBA-15 com diferentes tamanhos de poros (6,8 nm; 9,1 nm; 13,2 nm; 15,6 nm e 22,4 nm) e avaliaram a influência dos mesmos na capacidade de retenção das enzimas e na eficiência catalítica do biocatalisador. Os resultados demonstraram que entre os materiais SBA-15 analisados, os que apresentaram diâmetro de poros de 9,1 nm, 13,2 nm e 15,6 nm foram os que retiveram maior quantidade de lipase. Em relação à atividade catalítica, o suporte com poros de 15,6 nm foi o que demonstrou maior eficiência devido à menor restrição difusional do substrato na reação.

Outra característica que afeta a eficiência da imobilização e da atividade catalítica dos biocatalisadores é o tamanho de partículas apresentado pelo suporte. Gustafsson e colaboradores (2012) testaram as características de três sílicas mesoporosas com tamanho de partícula de 1000 nm, 300 nm e 40 nm e com diâmetro médio de poros de 9 nm, considerado o diâmetro que apresentou melhores condições para imobilização e maior atividade catalítica em trabalho anterior. As lipases que foram imobilizadas na sílica que apresentou diâmetro de partícula de 300 nm foram as que demonstraram maior atividade catalítica. A variação do tamanho de partículas provocou a mudança na morfologia dos poros das sílicas e, segundo os autores, os materiais com tamanho de partículas de 30 nm demonstraram maiores frações de poros menores na distribuição de poros que as sílicas com 1000 nm, fazendo com que a enzima se ancorasse na entrada dos poros, tornando-as mais acessíveis ao substrato, ao contrário das lipases que foram adsorvidas no interior dos poros do material que apresentou diâmetro de partícula de 1000 nm. Quanto à sílica com tamanho de partícula de 40 nm, esta apresentou menor eficiência catalítica comparada aos demais materiais devido à formação de poros tipo fenda e menor fração de poros com diâmetro de 9 nm.

Lei e colaboradores (2004) imobilizaram lisozima em sílicas mesoporosas com diferentes morfologias e constataram que a SBA-15 com partículas de 1 a 2 μm adsorveu maior quantidade de proteína (533 mg/grama de suporte contra 70 mg/grama de suporte) e em menor tempo (menos de 10 minutos contra mais de 13 horas), quando comparada a outro tipo de SBA-15 com tamanho médio de partícula de 20 μm . De acordo com os autores, a quantidade de enzima imobilizada aumenta com a diminuição do tamanho da partícula, levando a uma melhoria na capacidade de imobilização.

As propriedades superficiais das sílicas mesoporosas também apresentam influência na imobilização e atividade do biocatalisador e suas características dependem

do tipo de surfatante utilizado na síntese, da composição química e da modificação com materiais orgânicos (ZHOU e HARTMANN, 2013).

Murai e colaboradores (2012) avaliaram a imobilização da enzima de *Bacillus licheniformis* em sílicas mesoporosas e sílicas mesoporosas modificadas com grupos orgânicos. A atividade hidrolítica das sílicas funcionalizadas com grupos etila foi maior que a atividade apresentada pela enzima livre, devido ao maior contato do substrato e da enzima com o aumento da hidrofobicidade na presença do suporte.

Hu e colaboradores (2012) modificaram amostras da peneira molecular SBA-15 por meio de líquidos iônicos baseados em imidazol com grupos funcionais alquila, amino e carboxila, e avaliaram a influência dos suportes modificados e a SBA-15 sem modificação na imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia*. Os biocatalisadores preparados com líquidos iônicos demonstraram maior atividade específica, maior estabilidade térmica, ao reuso e à estocagem. Tais fatos estão associados com a mudança na estrutura dos poros e maior interação entre a lipase e o suporte.

2.4.1 Produção de ésteres por lipases imobilizadas

O grande problema na utilização das lipases para a produção de biodiesel é o seu elevado custo, na casa de 100 dólares por kg (Novozyme 435), quando comparado aos catalisadores homogêneos químicos. A imobilização enzimática permite que a sua atividade catalítica seja recuperada e esta seja reutilizada no processo minimizando assim os custos operacionais (STOYTCHIEVA et al, 2011).

Da Rós e colaboradores (2010) imobilizaram, por meio de ligação covalente, a enzima de *Burkholderia cepacia* em matriz inorgânica de óxido de nióbio e matriz híbrida de polisiloxano-álcool polivinílico, a fim de comparar a eficiência dos biocatalisadores imobilizados em relação à utilização da enzima livre na reação de transesterificação do óleo de babaçu e sebo bovino. Os resultados obtidos foram mais favoráveis para o sistema imobilizado em polisiloxano-álcool polivinílico, que apresentou maior rendimento em ésteres (89%).

Talamampudi e colaboradores (2008) realizaram um estudo comparativo entre uma lipase comercial imobilizada em resina acrílica macroporosa (Novozyme 435) e enzima intracelular imobilizada em biomassa (ROL) na transesterificação do óleo de Pinhão-Manso. O primeiro biocatalisador apresentou rendimento em éster de 76%, após

90 horas de reação, enquanto o segundo foi mais eficiente com rendimento de 80%, em 60 horas de reação. Testes de reuso foram conduzidos e os dois biocatalisadores imobilizados apresentaram retenção de 90% da atividade inicial após cinco ciclos. A adição de água no meio reacional foi analisada e o biocatalisador ROL, exibiu maior atividade, com a adição de 5% (v/v), enquanto a adição de água foi prejudicial para a eficiência catalítica da enzima comercial Novozyme 435 (TAMALANPUDI *et al*, 2008).

A aplicação de catalisadores enzimáticos suportados em sílicas mesoporosas para a produção de biodiesel foi primeiramente publicado em 2009. Neste trabalho estudaram a imobilização de lipase de *Rizomucor miehei* em MCM-41 por meio de método sol-gel, para a transesterificação de trioleína e metanol. O biocatalisador imobilizado apresentou rendimento em trioleato de metila seis vezes maior do que os apresentados pela enzima livre (ZHOU e HARTMAN, 2013).

Katlar e Ali (2012) imobilizaram lipase de *Candida rugosa* em MCM-41 por adsorção física e verificaram que em pH 6,0 maior quantidade de proteína foi adsorvida. Este biocatalisador foi utilizado na reação de transesterificação do óleo de algodão e metanol. Nas melhores condições de pH do meio reacional, da temperatura e da relação molar óleo:álcool, obtiveram rendimento em éster de 98,3%.

Thörn *et al.* (2011) estudaram a reação de transesterificação do ferulato de metila em 1-butanol utilizando SBA-15 com poros de diâmetros de 5,01 e 9,32 nm. A enzima imobilizada na SBA-15 com 9,32 nm de diâmetro médio de poros apresentou maior atividade na reação do que o biocatalisador preparado com a SBA-15 com poros de 5,01 nm. A partir dos resultados foi possível concluir também, que as enzimas imobilizadas eram mais específicas para a reação de transesterificação do que para a reação de hidrólise, comportamento contrário ao apresentado pela enzima livre. A mudança da especificidade pode ser devido à interação da enzima com a superfície da sílica.

Canilho e colaboradores (2013) avaliaram o comportamento da SBA-15 e SBA-15 funcionalizada com isocianato para a imobilização de lipase de *Mucor mieie*, por adsorção e ligação covalente, na reação de transesterificação de óleo de canola com metanol. A sílica hidrofílica SBA-15 não modificada apresentou menor estabilidade de reuso, sendo eficiente por apenas dois ciclos operacionais. Por outro lado, a enzima imobilizada em SBA-15 funcionalizada manteve sua eficiência durante seis reusos consecutivos.

De acordo com o que foi descrito pela literatura, as lipases apresentam potencial para atuarem como biocatalisadores na produção de ésteres alquílicos tendo como matéria-prima materiais graxos.

A grande vantagem apresentada pelas lipases em relação aos catalisadores convencionais alcalinos atualmente utilizados é que não existe a necessidade de purificação para retirada de ácidos graxos livres presentes nos insumos por não ocorrer o risco do processo de saponificação, já que as mesmas têm a capacidade de atuarem tanto na reação de transesterificação como na esterificação.

Sendo assim, óleos brutos, como é o caso do óleo de Nabo Forrageiro utilizado na pesquisa, podem ser utilizados para a produção de ésteres diminuindo os custos relacionados à matéria-prima.

Por outro lado, as enzimas apresentam valor elevado e sua utilização na forma livre torna o produto final demasiadamente caro e, portanto, inviável de ser produzido para uso como biocombustível. Além dos custos, a enzima livre apresenta problemas técnicos quando utilizada em meio orgânico e na presença de alcoóis de cadeia curta como a desnaturação e perda de atividade catalítica.

Com o objetivo de diminuir os problemas anteriormente descritos técnicas de imobilização têm sido adotadas e diversos suportes têm sido utilizados com destaque para as sílicas porosas devido às suas características de elevada área superficial interna e possibilidade no controle do tamanho dos poros, permitindo o acesso das enzimas ao seu interior e melhorando as condições para a atuação dessas enzimas na biocatálise em meio orgânico.

Logo, a presente dissertação avalia o comportamento dos biocatalisadores imobilizados em sílicas porosas com diferentes características texturais e também da enzima na sua forma livre na reação de transesterificação do óleo de Nabo Forrageiro (*Raphanus sativus* L.), sendo este pouco estudado em relação à biocatálise para a produção de ésteres alquílicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização do óleo de Nabo Forrageiro

O óleo de Nabo Forrageiro foi caracterizado pela determinação do índice de acidez, umidade e composição em ácidos graxos.

3.1.1 Índice de acidez e umidade

O índice de acidez foi determinado por meio do método descrito em Adolf Lutz (1998).

Deste modo, foram pesadas em um Erlenmeyer de 125 mL, cerca de 2 g de amostra de óleo. Em seguida, foram adicionados 25 mL de solução éter:etanol (2:1 v/v), mais duas gotas do indicador Fenolftaleína. Esta mistura foi titulada com solução Hidróxido de Sódio 0,1 mol/L padronizada até a mudança para coloração rósea.

O índice de acidez foi calculado de acordo com a Equação (1):

$$\text{Índice de Acidez} = \frac{v * f * 5,61}{p} \quad (1)$$

Sendo que v é o volume (mL) da solução de hidróxido de sódio gasto, f é o fator de correção da solução de hidróxido de sódio padronizada e P é a massa (g) da amostra.

A análise foi realizada em triplicata.

O teste de umidade do óleo de Nabo Forrageiro foi determinado mediante análise em um titulador automático Karl Fischer, marca Orion, modelo AF8.

3.1.2 Composição em ácidos graxos e determinação da massa molar do óleo

Para a determinação da composição em ácidos graxos do óleo de Nabo Forrageiro foi adotado o método de derivatização de Hartman e Lago (1973).

Inicialmente, pesaram-se 100 mg da amostra de óleo em tubo de ensaio e, em seguida foram acionados 4 mL de solução de hidróxido de sódio em metanol 0,5 mol/L. O tubo foi levado a um banho com temperatura de aproximadamente 80 °C, em que permaneceu até a dissolução dos glóbulos de óleo. Em seguida, o tubo foi resfriado em água corrente e 5 mL de metanol foram adicionados. O tubo foi novamente aquecido por 2 minutos, seguido de resfriamento em água corrente, e posterior adição de 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio. O sistema foi agitado e, então, adicionaram-se 5 mL de hexano. O tubo foi levado para um refrigerador onde permaneceu em repouso por mais de duas horas.

O sobrenadante foi utilizado para a análise, em que as amostras foram preparadas com pesagem de aproximadamente 0,02 g, em balão volumétrico de 10 mL, seguido de diluição com hexano até completar o volume. Assim, alíquotas de 1 µL foram empregadas na análise cromatográfica.

As amostras preparadas para a determinação da composição em ácidos graxos foram analisadas mediante cromatografia gasosa, utilizando-se Cromatógrafo Varian, modelo CP – 380, equipado com ionizador de chama (DIC), coluna Agilent Technologies, modelo DB-23 com dimensões de 30 m (comprimento) x 0,25mm (diâmetro) x 0,25 µm (filme). A programação da temperatura da coluna iniciou-se em 140 °C, com aquecimento até 250 °C, a uma taxa de 5 °C/min. A temperatura do detector foi de 220 °C e do injetor de 260 °C.

Os cromatogramas obtidos foram comparados com um padrão de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (*Fatty Acid Methyl Esters*, SUPELCO), para identificação e quantificação dos ácidos graxos presentes.

A composição em ácidos graxos foi determinada de acordo com a Equação (2):

$$\text{Porcentagem do ácido graxo X(\%)} = \frac{A_x}{A_T} \quad (2)$$

Sendo que A_x é a área do pico que representa determinado ácido graxo X e A_T é a soma de todas as áreas obtidas no cromatograma.

A determinação da massa molar média dos ácidos graxos presentes no óleo de Nabo Forrageiro foi determinada pela Equação (3):

$$MM_{ag} = \sum MM_{xag} * (\%)Y_{ag} \quad (3)$$

Sendo que MM_{xag} representa a massa molar do ácido graxo X (por exemplo, massa molar do ácido oleico) presente no óleo e $(\%)Y_{ag}$ é a sua porcentagem determinada a partir do perfil de ácidos graxos.

A massa molar do óleo de Nabo Forrageiro foi determinada por meio do perfil de ácidos graxos, de acordo com a metodologia de Fillières; Benjelloun-Mlayah; Delmas, (1995) empregando-se a Equação (4).

$$MM_{\text{óleo}} = 3 \cdot \left[\sum_i (MM_{\text{agi}}) \cdot Y_{\text{agi}} \right] + MM_{\text{glicerol}} - 3 \cdot MM_{\text{H}_2\text{O}} \quad (4)$$

Sendo que $MM_{\text{óleo}}$ é a massa molar do óleo, MM_{agi} é a massa molar média do ácido graxo i presentes no óleo, Y_{agi} é a porcentagem de ácido graxo i presente na amostra, MM_{glicerol} é a massa molar do glicerol (87 g/mol) e $MM_{\text{H}_2\text{O}}$ é a massa molar da água (18 g/mol).

3.2 Síntese da MCM-41

Para a síntese da sílica mesoporosa do tipo MCM-41 foram utilizados Tetraetilortossilicato (TEOS, SIGMA 98%), como fonte de silício, Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTABr, 99% VETEC) como surfatante, solução de Hidróxido de Amônio (NH_3OH , 27% Synth) e água deionizada.

O método adotado foi o descrito por Grün e colaboradores (1999), com gel de síntese de composição molar: 1,0 TEOS: 0,152 CTABr: 2,8 NH_3OH : 141,2 H_2O . No procedimento de síntese, primeiro o surfatante foi dissolvido em água deionizada, com agitação magnética durante 5 minutos. Em seguida, adicionou-se a solução de Hidróxido de Amônio e o sistema permaneceu com agitação por mais 10 minutos. O TEOS foi inserido posteriormente na solução resultante, gota a gota, durante um período de 15 minutos, e então a mistura foi agitada por mais 1 hora. O precipitado resultante foi recuperado por meio de filtração a vácuo e lavagens sucessivas com água deionizada foram realizadas até que o pH do filtrado atingisse o valor de 7,0. O sólido foi levado para secagem, em estufa a 105 °C, durante 12 horas.

As amostras foram calcinadas em forno tubular com vazão de nitrogênio, rampa de aquecimento de 5 °C/min, até temperatura de 550 °C, na qual permaneceu por 2 horas seguido de mudança para ar sintético permanecendo a 550 °C, por mais 2 horas.

A MCM-41 foi classificada como MCM/CF e a amostra seca e calcinado apresentou característica de pó branco.

3.3 Síntese da SBA-15

Os reagentes utilizados na síntese da sílica mesoporosa do tipo SBA-15 foram o Copolímero Pluronic P123 (P123, SIGMA), como agente direcionador de estrutura, solução de HCl (2 mol/L), Tetraetilortossilicato (TEOS, SIGMA 98%) como fonte de silício e água deionizada.

O método utilizado para a síntese da SBA-15 foi baseado no trabalho desenvolvido por Zhao e colaboradores (2000) com gel de síntese de composição molar: 1,0 TEOS: 0,016 P123: 5,65 HCl: 185,1 H₂O. Assim, misturou-se o Pluronic P123 (SIGMA), a solução de HCl (2 mol/L) e a água deionizada até a dissolução do copolímero. Em seguida, foi adicionado o Tetraetilortossilicato (TEOS, 98% SIGMA). O sistema foi mantido sob agitação a 40 °C, durante 24 horas. Posteriormente, a mistura foi colocada em autoclave de aço inox revestida de Teflon e levada para uma estufa, onde passou por tratamento hidrotérmico a 100 °C, por 24 horas. Após este período, o material foi filtrado a vácuo e lavado com água deionizada até que o pH da solução atingisse o valor de 7,0. O sólido obtido foi seco em estufa a 100 °C, por 15 horas, e calcinado em forno mufla sob condições estáticas a 550 °C com rampa de aquecimento de 1 °C/min.

A SBA-15 calcinada foi classificada como SBA-15/CE e a amostra seca e calcinada apresentou característica de pó branco.

3.4 Sílica de porosidade controlada

A sílica de porosidade controlada é uma sílica comercial produzida pela Corning Glass Works, Corning NY. Trata-se de um material derivado dos diferentes métodos de síntese de sílicas porosas com baixa condutividade térmica, controle no tamanho de poros (10 a 100 nm) e elevada estabilidade térmica, podendo ser utilizado por longos períodos em temperaturas em torno de 100 °C. Tais métodos foram patenteados por essa empresa no ano de 1980.

Essa sílica consiste em microesferas com volume de poros de 0,64 cm³/g, área específica de 56,49 m²/g e diâmetro médio de poros de 50,2 nm (TREVISAN; MEI; ZANIN, 2000).

3.5 Imobilização da lipase

A enzima utilizada foi a Lipase de *Burkholderia cepacia* (Amano Lipase PS, ≥ 30.000 U/g). Uma solução tampão fosfato pH 7,0 foi usada como meio de dispersão e os suportes para imobilização foram a MCM/CF, SBA/CE e Sílica de Porosidade Controlada (SPC, CORNYNG, NY).

A imobilização seguiu o método adotado por Soares e colaboradores (1999), com algumas modificações. Assim, foi preparada uma solução enzimática em tampão fosfato pH 7,0, com concentração 0,03 g de lipase liofilizada por mL de solução. Em um Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados a solução enzimática e o suporte (1 g de suporte para 10 mL de solução enzimática). O sistema foi levado a um banho termostaticado, mantido com agitação, durante 2 horas, a 25 °C e, em seguida permaneceu por 24 horas a 4 °C. Por fim, o suporte com a enzima já adsorvida foi lavado com 60 mL de solução tampão fosfato pH 7,0, filtrado e seco em um dessecador, por 30 horas.

Os biocatalisadores imobilizados foram identificados como MCM/Imob., SBA/Imob. e SPC/Imob., dependendo do suporte utilizado.

3.6 Caracterização das sílicas e biocatalisadores imobilizados

As sílicas e os biocatalisadores imobilizados foram avaliados em relação à composição, análises de infravermelho com Transformada de Fourier, características estruturais, análise por Difração de Raios X, e propriedades texturais por meio da Adsorção/Dessorção de nitrogênio.

3.6.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (IVTF)

As análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia localizado no Bloco H-57 da Universidade Estadual de Maringá.

As sílicas MCM-41, SBA-15, antes e após a calcinação, a SPC, bem como os biocatalisadores imobilizados MCM/Imo, SBA/Imo, SPC/Imo. e a enzima liofilizada foram analisados em Espectrofotômetro da marca Bruker – Vertex 70 com resolução de 4 cm^{-1} , sendo os espectros obtidos na faixa de comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} , para 100 varreduras por análise. O KBr foi utilizado como referência, 100% de transmitância, e para as análises 0,002 g de amostra foram pesadas e dissolvidas em 0,198 g de KBr. O KBr utilizado como referência e as amostras foram pastilhadas para leitura no Espectrofotômetro.

3.6.2 Difração de raios X

As amostras foram analisadas no Complexo de Apoio à Pesquisa (COMCAP/UEM) utilizando um difratômetro Bruker D-8 Advanced, com radiação $\text{Cu-K}\alpha$ e varredura de $0,5$ a $5^\circ 2\theta$, para as amostras SBA-15 e SBA/Imob. e varredura de 1 a $10^\circ 2\theta$ para MCM-41, MCM-41/Imob. e SPC.

A distância interplanar foi calculada baseando-se na Lei de Bragg, de acordo com a Equação (5).

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d_{100} \cdot \sin(\theta) \quad (5)$$

Em que λ é o comprimento de onda da radiação $\text{Cu-K}\alpha$ ($1,54 \text{ \AA}$), n é o índice de refração do ar considerado 1 e d_{100} é a distância interplanar para os índices de Miller $h=1$, $k=1=0$ e θ o ângulo de Bragg.

A partir da distância interplanar, identificada no difratograma da amostra analisada para o pico mais elevado com maior intensidade em $x^\circ 2\theta$ para MCM/CF e $y^\circ 2\theta$ para SBA/CE, calculou-se o parâmetro de cela unitária (a_0), segundo relação mostrada na Equação (6) (CULLITY e STOCK, 2001):

$$a_0 = 2 \cdot d_{100} / \sqrt{3} \quad (6)$$

Sendo que d_{100} é a distância interplanar (nm) para o plano cristalográfico (100) e a_0 é o parâmetro de cela unitária (nm).

3.6.3 Adsorção/dessorção de nitrogênio

As análises de fisissorção de nitrogênio foram conduzidas no LATI (Laboratório de Troca Iônica e Adsorção) localizado no Departamento de Engenharia Química, na Universidade Estadual de Maringá. O equipamento utilizado foi da marca Micrometrics, modelo ASAP 202. Os parâmetros texturais foram determinados por meio das isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio. As amostras SBA/CE e MCM/CF passaram por um pré-tratamento a 300 °C, sob vácuo, durante 3 horas, e as amostras SBA/Imob. e MCM/Imob. foram pré-tratadas a 80 °C, durante 6 horas, sob vácuo. A área específica foi determinada pelo método BET e o volume de poros juntamente com a distribuição de tamanho de poros foram obtidos por meio do método BJH. Utilizou-se o método t-plot para a determinação da área externa da MCM/CF.

3.7 Umidade

Os biocatalisadores imobilizados foram submetidos à análise de umidade em um titulador automático Karl Fischer, marca Orion, modelo AF8.

3.8 Análise de proteína

O método adotado para determinar a quantidade (mg) de proteína adsorvida nos suportes, na solução enzimática, nos filtrados resultantes da lavagem dos biocatalisadores imobilizados e nos testes de lixiviação foi o desenvolvido por Bradford (1976).

Neste método, o reagente de Bradford foi preparado com a dissolução de 0,1 g de Coomassie Brilliant Blue em 50 mL de etanol 95%. Em seguida, foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85% e a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL. Então, água deionizada foi usada para completar o volume. Posteriormente o reagente foi filtrado com vácuo.

Uma curva de calibração foi preparada com Albumina Bovina (SIGMA A-2153, 1,6% de Água), como padrão de proteína. As amostras foram lidas em um espectrofotômetro SHIMADZU, modelo UV MINI-1240, com comprimento de onda de 595 nm, e a concentração de proteína foi medida por meio dos valores de absorvância obtidos. A partir desta curva de calibração os valores de concentração de proteína da

solução enzimática, dos filtrados resultantes da lavagem dos biocatalisadores imobilizados e das soluções obtidas no teste de lixiviação foram medidos.

Os valores de proteína adsorvida nos suportes foram calculados de acordo com a Equação (7).

$$\text{Proteína no suporte (mg prot/g bio. seco)} = \frac{C_e * V_e - C_f * V_f}{m_b} \quad (7)$$

Sendo que C_e é a concentração (mg/mL) de proteína na solução enzimática fornecida para a imobilização, V_e (mL) é o volume de solução enzimática fornecido, C_f é a concentração de proteína (mg/mL), do filtrado resultante da lavagem do biocatalisador, V_f é o volume total de solução de lavagem e m_b é a massa seca (g) do biocatalisador medida após a imobilização.

A quantidade de proteína presente na enzima liofilizada foi calculada conforme a Equação (8).

$$\text{Proteína enzima liofilizada} = \frac{C_{en} * V_{en}}{m_e} \quad (8)$$

Sendo C_{en} a concentração (mg/mL) de proteína na solução enzimática, V_{en} volume da solução enzimática m_e é a massa de enzima liofilizada usada para o preparo da solução.

3.9 Atividade de hidrólise

A determinação da atividade específica da enzima na hidrólise do Azeite de Oliva baseado no trabalho desenvolvido por Soares e colaboradores (1999) foi escolhida para determinar a atividade específica conforme descrito a seguir.

Uma emulsão contendo 50 mL de solução 7 % (m/v) de Goma Arábica e 50 mL de Azeite de Oliva foi preparada. Em um erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 5 mL da emulsão com 2 mL de Tampão Fosfato pH 7,0. Ao erlenmeyer foram adicionados, após 15 minutos de incubação a 50 °C, 0,1 g de biocatalisador imobilizado ou 1 mL da solução enzimática (0,03 g/mL). A reação prosseguiu por 10 minutos a 50 °C e, após esse período foram adicionados 2 mL de solução acetona:água:etanol

(1:1:1, v:v:v). Os ácidos graxos formados foram analisados por titulação com KOH 0,02 N (0,02 mol/L) com indicador fenolftaleína. Preparou-se um controle nas mesmas condições da reação para o biocatalisador imobilizado e enzima livre, porém, 1 mL de água foi adicionado ao meio reacional. Cabe ressaltar que todas as reações foram feitas em triplicata.

A Equação (9) foi empregada para o cálculo da atividade específica.

$$U (\text{mmol min}^{-1}) / \text{mg} = \frac{(V_A - V_B) * 10^{-3} * N}{t * m} \quad (9)$$

Sendo que U (atividade) é a quantidade de mmol de ácido graxo formado por minuto, V_A é volume de KOH gasto na titulação da reação com o biocatalisador imobilizado ou enzima livre, V_B é o volume de KOH gasto na titulação do controle, N representa a normalidade da solução de KOH, t o tempo da reação e m a massa de proteína presente no biocatalisador imobilizado ou enzima livre.

3.10 Atividade de esterificação

A atividade de esterificação foi determinada por meio da reação do ácido oléico com etanol em tubos de ensaio, conforme metodologia proposta por Macedo e Pastore (1997), com algumas modificações. Para este procedimento, foram colocados em tubos de ensaio 3,4 g de ácido oléico, juntamente com 2,7 g de etanol (0,02 mol de ácido para 0,04 mol de álcool). Os tubos de ensaio foram incubados a 50 °C, durante quinze minutos, e, então 0,061 g de biocatalisador imobilizado ou enzima liofilizada (1% em relação à massa total de reagentes) foram adicionados. A reação prosseguiu por quatro horas. Após esse período, os tubos foram retirados, resfriados em banho de gelo e alíquotas de 0,05 mL foram retiradas e pesadas. As alíquotas foram dissolvidas em 5 mL de etanol e tituladas com 3 gotas de fenolftaleína 1% e solução 0,5 mol/L de hidróxido de potássio. Uma reação sem adição de biocatalisador foi realizada servindo como controle. O volume gasto na titulação de cada alíquota foi convertido para o volume que seria gasto na massa reacional total conforme descrito pela Equação (10).

$$\text{Volume gasto na massa total (mL)} = \frac{V_{al} * m_{total}}{m_{al}} \quad (10)$$

Sendo que V_{al} é o volume da solução de hidróxido de potássio gasto na titulação da alíquota, m_{total} é a massa dos reagentes utilizados na reação (6,1 g) e m_{al} é a massa pesada da alíquota (g).

A atividade foi calculada a partir da quantidade de ácido graxo consumido na reação conforme a Equação (11).

$$U \text{ (mmol min}^{-1}\text{) / mg} = \frac{(V_{TV} - V_{TB}) * 10^3 * N}{t * m} \quad (11)$$

Sendo que U (atividade) representa a quantidade de ácido graxo (mmol) consumido por minuto, V_{TV} é o volume da solução (mL) de hidróxido de potássio 0,5 mol/L gasto na titulação com a massa total dos reagentes na reação sem adição de biocatalisador, V_{TB} é o volume (mL) de solução de hidróxido de potássio gasto na titulação da massa reacional total com o uso dos biocatalisadores imobilizados e enzima livre, t representa o tempo de reação, m a massa (mg) de proteína presente no suporte ou na enzima livre e N a normalidade da solução (0,5) de hidróxido de potássio.

3.11 Influência da temperatura e do pH do meio reacional na atividade enzimática

A hidrólise do azeite de oliva foi a reação utilizada para avaliar a influência da temperatura e do pH do meio reacional conforme item 3.9.

Para avaliar a influência da temperatura, 5 mL de emulsão juntamente com a solução tampão foram incubados por 15 minutos e, então, os biocatalisadores foram adicionados. Os experimentos foram realizados nas temperaturas de 30, 37, 50 e 60 °C.

Os ensaios para avaliação da influência do pH do meio reacional foram conduzidos com a incubação dos biocatalisadores nas soluções tampão por 15 minutos e, então, a emulsão pré incubada a 50 °C foi adicionada, com a reação prosseguindo de acordo com o procedimento descrito no item 3.9. Os tampões utilizados foram pH 3,0, 6,0, 7,0 e 9,0 na temperatura de 50 °C pois, nesta temperatura os biocatalisadores apresentaram melhor desempenho catalítico.

A maior atividade hidrolítica foi considerada como referência para o cálculo das demais atividades relativas conforme a Equação (12).

$$\text{AtividadeRelativa(\%)} = \frac{\text{Atividadeem diferentes temperaturas}}{\text{Maioratividadecalculada}} * 100 \quad (12)$$

3.12 Estabilidade operacional dos biocatalisadores

3.12.1 Teste de dessorção de proteína

Para analisar a quantidade de proteína dessorvida, 0,2 g de biocatalisador foram colocados em erlenmeyer de 50 mL e, então, foram adicionados 8 mL de tampão fosfato pH 7,0 (diluição de 1 mL de tampão para 0,025 g de sólido), a 50 °C. Os erlenmeyers foram levados para um banho com agitação orbital e, em intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas de 1 mL foram retiradas, resfriadas, centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos e, então, o sobrenadante foi analisado conforme método de Bradford (1976). As alíquotas foram retiradas nos tempos de 10, 50, 90 e 120 minutos (SERRA *et al.*, 2008).

A porcentagem de proteína dessorvida foi calculada pela Equação (13).

$$\text{Proteína dessorvida (\%)} = \frac{c_{\text{ali}} * V_{\text{sol}}}{m_{\text{bio}}} \quad (13)$$

Sendo que m_{bio} é a massa de proteína (mg) presente no biocatalisador inserida no ensaio, c_{ali} é a concentração (mg/mL) de proteína da alíquota retirada e V_{sol} é o volume (mL) de solução tampão contida no erlenmeyer.

3.12.2 – Teste de reuso do biocatalisador na reação de hidrólise do azeite de oliva

Os biocatalisadores imobilizados SBA/Imob. e MCM/Imob. foram peletizados, por estarem na forma de pó, e sua granulometria foi selecionada com a utilização de peneiras com abertura de 0,42 mm (Mesh 40) de modo a serem utilizados na reação dentro de uma cesta com tela de aço inoxidável com abertura de 0,149 mm (Mesh 100) sendo isolados do meio reacional ao final da reação, para que a titulação e a adição da

solução acetona:água:etanol (1:1:1, v:v:v) não tivesse influência no desempenho catalítico. O biocatalisador SPC/Imob. não sofreu nenhuma modificação por ser formado de partículas esféricas que ficaram retidas no interior das cestas.

A reação de hidrólise do azeite de oliva foi conduzida como em **III.9** e, ao final da reação, as cestas foram retiradas, os produtos analisados por titulação e os biocatalisadores, no interior das cestas, foram lavados com solução tampão fosfato pH 7,0 seguida de lavagem com hexano. Em seguida as cestas foram colocadas em dessecador, onde permaneceram por 30 horas, para secagem. Após esse período, os biocatalisadores no interior das cestas eram inseridos em um novo meio reacional. Foram realizados quatro ciclos operacionais para avaliar o comportamento em relação à atividade hidrolítica.

A atividade do ciclo de operação inicial foi tomada como referência para o cálculo das atividades residuais dos biocatalisadores nos ciclos operacionais subsequentes conforme Equação (14).

$$\text{AtividadeResidual(\%)} = \frac{\text{Atividade do ciclo } i}{\text{Atividade do ciclo inicial}} * 100 \quad (14)$$

Sendo que $i = 1, 2, 3$ e 4 .

3.13 Síntese de ésteres etílicos a partir do óleo de nabo forrageiro.

Foram adotados os parâmetros apresentados no trabalho desenvolvido por Tamalampudi e colaboradores (2008), no qual se utilizou-se 2 g de óleo, 0,45 mL de etanol (razão molar óleo:etanol 1:3), e 0,1 de biocatalisador.

As reações foram conduzidas em tubos de ensaio, em que o óleo e o etanol foram incubados a 50 °C, por 15 minutos, antes da adição dos biocatalisadores. As reações foram realizadas, então a 50 °C e, em intervalos de tempos de 2, 4, 8 12 e 24 horas, os tubos foram retirados, resfriados em banho de gelo. Após esta etapa, adicionaram-se 5 mL de água a 70 °C e os tubos foram centrifugados para a separação dos biocatalisadores, etanol e glicerol do óleo e ésteres formados. Assim, o sobrenadante foi utilizado para análise dos produtos reacionais. Um controle foi preparado nas mesmas condições, porém, sem adição de biocatalisador.

3.13.1 Análise dos produtos reacionais

Para analisar e quantificar os ésteres etílicos provenientes da reação de transesterificação do óleo de Nabo Forrageiro foram utilizados os métodos descritos por Visentainer e Franco (2006) e Visentainer (2012). O padrão interno (PI) usado foi o éster metílico tricosanóico (99%, SIGMA).

As massas de ésteres contidas nas amostras foram determinadas de acordo com a Equação (15).

$$m_{\text{éster}} = \frac{m_p * A_{\text{éster}} * F_{\text{CT}}}{A_p} \quad (15)$$

Sendo que $m_{\text{éster}}$ é a massa do éster identificado no cromatograma, m_p é a massa do padrão $A_{\text{éster}}$ é a área do pico correspondente a este éster, F_{CT} é o fator de correção teórico e A_p é a área do pico do padrão interno (PI) identificado no cromatograma.

Os fatores de correção teórico dos diferentes ésteres foram retirados do trabalho de Visentainer (2012).

Os valores das massas de ésteres obtidos nas reações catalíticas foram subtraídos dos valores determinados na reação controle, de modo a se obter a massa de éster formada somente pela ação da enzima.

De posse das massas dos ésteres formados pela ação enzimática, com a finalidade de uma comparação igualitária entre os desempenhos dos biocatalisadores, foi calculada a eficiência catalítica dos mesmos em relação aos ésteres formados (g éster/mg prot.) conforme a Equação (16).

$$\text{Eficiência Catalítica (g éster/mg prot.)} = \frac{m_{\text{total de éster}}}{m_{\text{prot.}}} \quad (16)$$

Sendo que $m_{\text{total de éster}}$ representa a soma de todas as massas (g) de ésteres formados na reação e $m_{\text{prot.}}$ é a quantidade de proteína oferecida para a reação, para cada tipo de biocatalisador

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do óleo de Nabo Forrageiro

Os resultados para o índice de acidez e umidade são apresentados a seguir.

4.1.1 Índice de acidez e umidade

O valor obtido para o índice de acidez do óleo de Nabo Forrageiro foi de $4,25 \pm 0,08$ mg KOH/g. Este valor é maior do que os valores relatados por Sha e colaboradores (2013) com $2,56 \pm 0,03$ mg KOH/g, Domingos et al. (2008), com 0,12 mg KOH/g, e Ávila e Sodré (2012), com 3,84 mg KOH/g, indicando que o óleo de Nabo Forrageiro utilizado possui maior quantidade de ácidos graxos livres. A maior degradação apresentada pelo óleo pode ser devida às condições de armazenamento, tais como exposição à luz, ao ar atmosférico, ao calor e a um maior período de estocagem (ÁVILA e SODRÉ, 2012).

Cabe ressaltar que índices de acidez maiores que 2 mg KOH/g podem gerar problemas para a produção de biodiesel por meio de catálise alcalina, como a formação de sabão e outros produtos secundários, aumentando assim a viscosidade ou dificultando a separação do glicerol do produto reacional (CANAKCI e VAN GERPEN, 2001; FREEDMAN; PRYDE; MOUNTS, 1984).

O teor de umidade do foi de 0,228% (m/m). Valores de teor de umidade maiores que 0,06% podem influenciar negativamente a reação de transesterificação alcalina, porém, não tem influência na transesterificação ácida em valores < 2%. Quanto ao desempenho com o uso da transesterificação enzimática, a quantidade de água presente no óleo pode ou não ter influência, pois o efeito que a umidade exerce depende do tipo de lipase, do suporte utilizado e do meio reacional (presença ou ausência de solvente) (ATADASHI et al., 2012).

4.1.2 Composição em ácidos graxos e massa molar

A composição em ácidos graxos obtida por análise cromatográfica, conforme descrito na seção 3.1.2, é apresentada na Tabela 4.1, bem como os valores na literatura para efeito de comparação.

Tabela 4.1 - Composição em Ácidos Graxos do Óleo de Nabo Forrageiro.

Ácido Graxo	Nomenclatura	Composição (%)				
		Domingos et al. (2008)	Valle et al. (2010)	Soares et al. (2010)	Dambski (2007)	Presente Trabalho
Mirístico	C14:0	-	-	6,0	-	-
Palmítico	C16:0	5,67	7,0	7,9-10,0	8,1	5,53 ± 0,106
Estearico	C18:0	2,23	3,6	2,2-3,1	3,0	2,09 ± 0,0410
Vacênico	C18:1 (cis9)	-	-	1,4	-	-
Oleico	C18:1	34,53	27,9	4,5-29,1	34,5	22,6 ± 0,631
Linoleico	C18:2	17,78	7,6	4,5-16,3	22,4	14,9 ± 0,534
Linolênico	C18:3	12,46	4,6	12,7	15,5	8,97 ± 0,250
Araquidônico	C20:0	0,97	2,2	0,97-8,2	1,0	1,32 ± 0,024
Gadoleico	C20:1	9,99	11,2	-	-	10,9 ± 0,429
Beênico	C22:0	-	-	14,1	-	-
Erúxico	C22:1	16,37	33,3	1,2-16,3	15,4	31,4 ± 1,82
Lignocérico	C24:0	-	0,6	-	-	0,734 ± 0,00400
Nervônico	C24:1	-	2,0	-	-	1,63 ± 0,188

FONTE: Adaptada de Ávila e Sodré (2012).

De acordo com os resultados obtidos, o óleo de Nabo Forrageiro utilizado possui maior porcentagem de ácido erúxico com 31,4 ± 1,82%, seguido do ácido oleico com 22,6 ± 0,631%. Além disso, a massa molar calculada a partir da composição em ácidos graxos foi de 863,7 ± 2,758 g/mol. A composição em ácido graxo determinada é mais próxima à descrita por Valle e colaboradores (2010), embora haja discrepância entre os valores apresentados na literatura. A massa molar determinada por estes autores foi de 900,3 g/mol, superior ao valor determinado no presente trabalho e, isso pode estar associado às maiores quantidades de ácido graxos com maiores massas molares (ácido erúxico, araquidônico, gadoleico e nervônico), obtidas no trabalho de Valle e colaboradores (2010).

As diferenças da composição em ácidos graxos, bem como as semelhanças, podem ser justificadas devido às formas de cultivo da planta, o clima, o tipo de solo e, também, a variedade das sementes (SHA et al., 2013).

A presença de grande porcentagem de ácido erúxico torna o óleo de Nabo Forrageiro um material impróprio para o consumo, sendo este, então, potencial fonte de

matéria-prima para produtos não alimentares, tais como, por exemplo, biocombustíveis (CHAMMOUN; GELLER; DAS, 2013).

A composição em ácido graxo encontrada para o óleo indica que ele é mais estável ao processo de oxidação comparado ao óleo de soja, pois possui menos ácidos graxos poli-insaturados em sua composição (CREMONEZ *et al.*, 2013).

4.2 Caracterização das sílicas e dos biocatalisadores imobilizados

4.2.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (IVTF)

4.2.1.1 Sílicas utilizadas como suporte

Os espectros no infravermelho obtidos para a MCM-41, antes da calcinação, e para a amostra calcinada MCM/CF são mostrados na Figura 4.1.

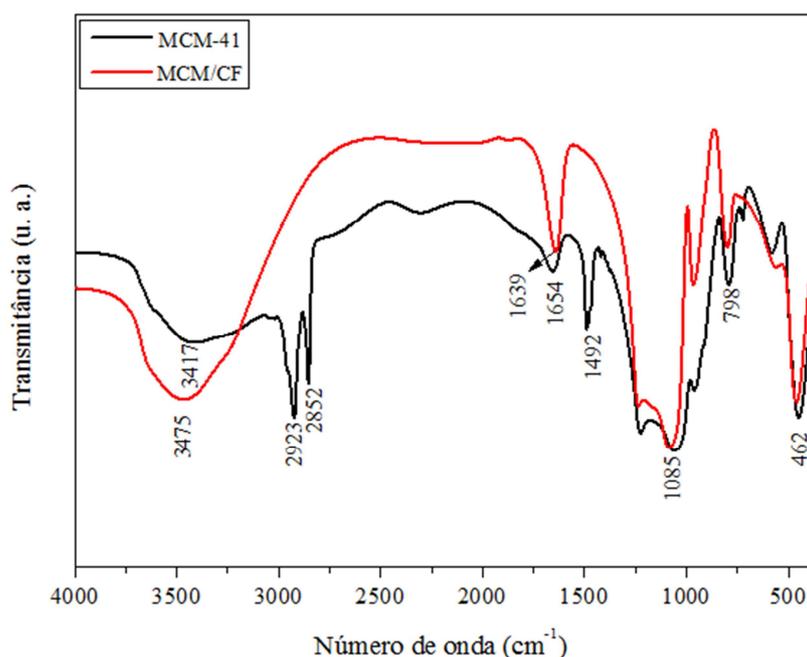


Figura 4.1 - Espectros no IVTF obtidos para MCM-41 antes da calcinação e MCM/CF.

Na Figura 4.1, para a MCM-41, as bandas obtidas nos comprimentos de onda de 3417 e 1654 cm⁻¹ representam as vibrações das ligações de Si-OH e moléculas de água ligadas ao grupo hidroxila pertencentes aos grupos silanóis. As bandas presentes em 2923, 2852 e 1492 cm⁻¹ pertencem ao estiramento simétrico das ligações CH₂, estiramento assimétrico das ligações CH₂ e deformação da vibração assimétrica dos

grupos $\text{CH}_3\text{-(N}^+)$, respectivamente. Esses grupos são derivados do surfatante CTABr (Brometo de Cetiltrimetilamônio) utilizado na síntese da MCM-41 (HOLMES *et al.*, 1998; ERGÜN *et al.*, 2013).

A extensão assimétrica das vibrações dos grupos Si-O-Si pode ser identificada em 1085 cm^{-1} e a banda presente em 798 cm^{-1} representa o estiramento simétrico das ligações Si-O-Si. Para a banda observada em 462 cm^{-1} a absorção corresponde à flexão das ligações Si-O-Si (YU e ZHAI, 2008).

Após a calcinação (MCM/CF) todas as bandas que representavam a presença dos grupos pertencentes ao surfatante desapareceram. As bandas remanescentes nos comprimentos de onda de 3475 e 1639 cm^{-1} referem-se às vibrações das ligações de Si-OH e água adsorvida, respectivamente, em 1085 cm^{-1} às vibrações assimétricas das ligações Si-O-Si, em 798 cm^{-1} ao estiramento simétrico das ligações Si-O-Si e em 462 cm^{-1} à vibração de flexão das ligações Si-O-Si. Isso confirma a remoção do surfatante e a eficiência do método de calcinação utilizado.

Os espectros no infravermelho obtidos para a amostra de SBA-15 e para a amostra calcinada SBA/CE estão representados na Figura 4.2.

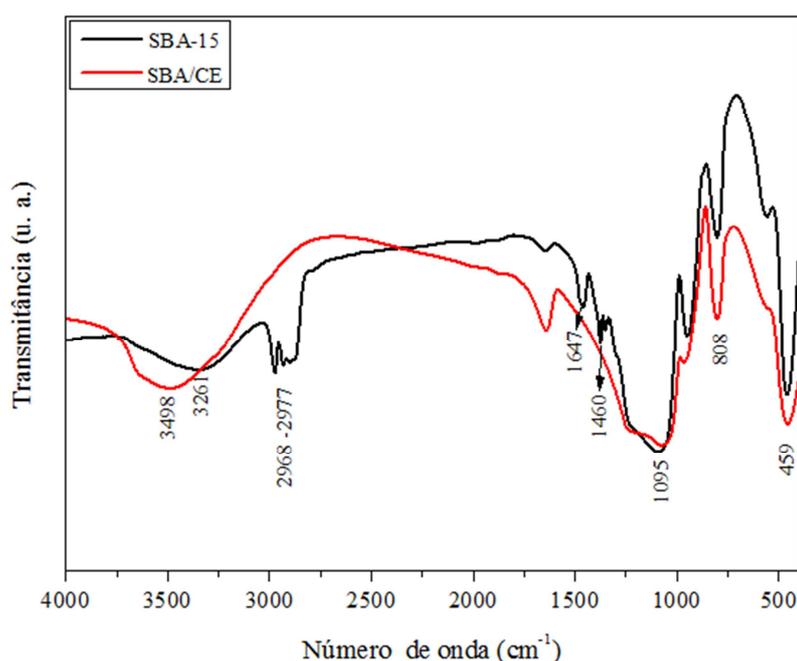


Figura 4.2 - Espectros no IVTF obtidos para SBA-15 e para amostra calcinada SBA/CE.

Para as duas amostras analisadas, as regiões de comprimentos de onda em 3498 e 3261 cm^{-1} representam a absorção para ligações Si-OH e água adsorvida, respectivamente. A banda em 1095 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento assimétrico

das ligações Si-O-Si, a banda em 808 cm^{-1} à vibração simétrica Si-O-Si e em 459 cm^{-1} ao estiramento das ligações Si-O (SCALERA *et al.*, 2012).

Além disso, a SBA-15 apresentou bandas nas regiões entre 2968 e 2977 cm^{-1} , em 1647 e 1460 cm^{-1} . Tais bandas são atribuídas ao estiramento, deformação e dobramento angular das ligações CH_2 , respectivamente. Essas bandas não foram detectadas no material após a calcinação (SBA/CE), indicando que o direcionador de estrutura foi removido durante o processo de calcinação realizado (LI *et al.*, 2013; KRIMM; LIANG; SUTHERLAND, 1956).

A sílica de Porosidade Controlada também foi submetida a análise por espectroscopia no infravermelho, para avaliar a sua composição superficial, sendo que esta não sofreu nenhum tipo de pré-tratamento. O espectro no infravermelho obtido está ilustrado na Figura 4.3.

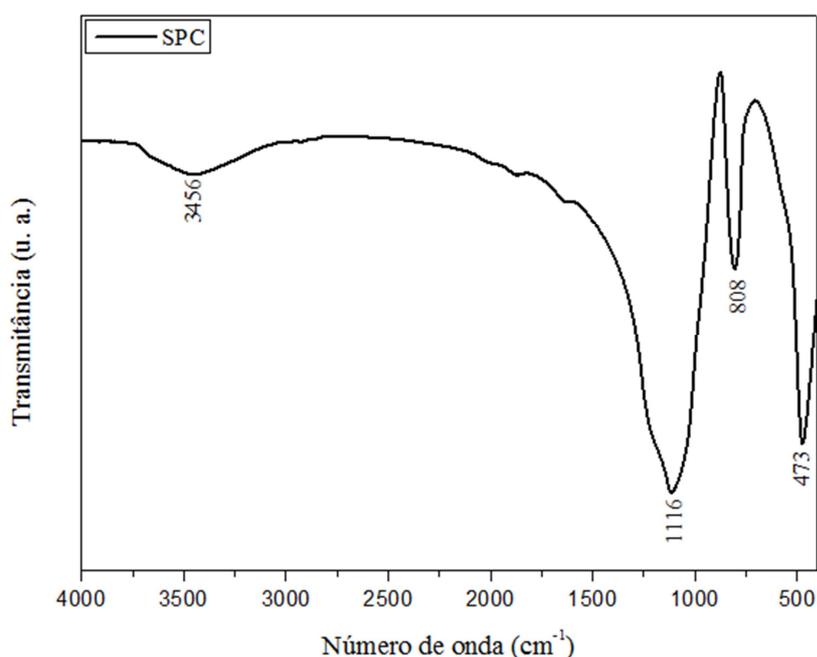


Figura 4.3 - Espectro no IVTF da Sílica de Porosidade Controlada (SPC).

A Sílica de Porosidade Controlada exibe bandas semelhantes às da MCM/CE e SBA/CF em relação aos tipos de grupos presentes, como os grupos Si-OH e ligações de hidrogênio em 3456 cm^{-1} , vibrações assimétricas das ligações Si-O-Si em 1116 cm^{-1} , vibração simétrica das ligações Si-O-Si em 808 cm^{-1} e flexão das ligações Si-O-Si em 473 cm^{-1} (CHARAN e RAO, 2013).

4.2.1.2 Biocatalisadores imobilizados

A Figura 4.4 apresenta os espectros obtidos para a enzima livre e os diferentes biocatalisadores imobilizados.

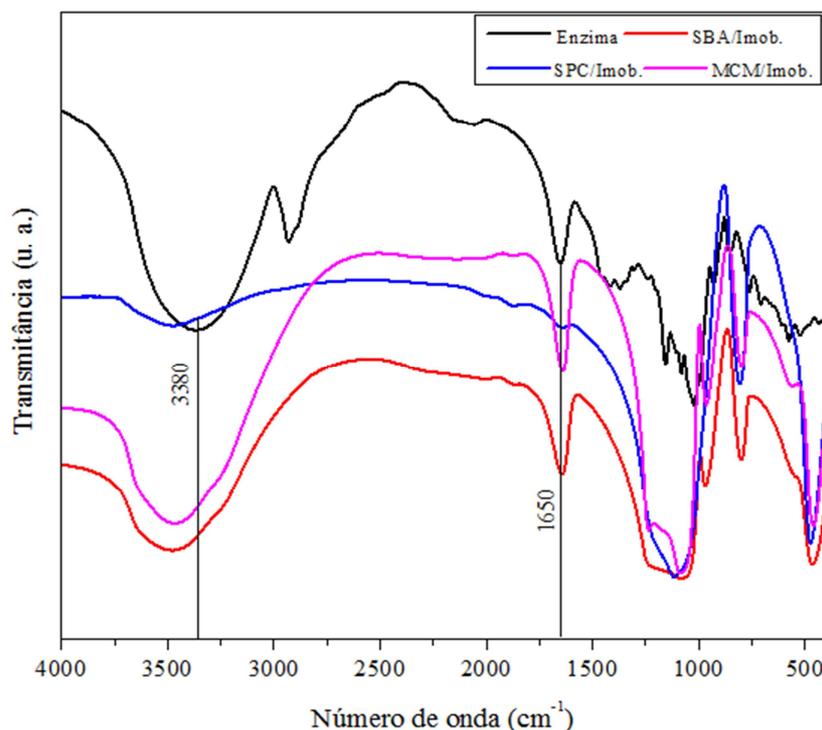


Figura 4.4 - Espectros IVTF obtidos para enzima livre e biocatalisadores imobilizados.

Como descrito na literatura as lipases possuem duas bandas características em 1650 cm^{-1} (aminas primárias) e 3380 cm^{-1} (aminas secundárias) (SOARES *et al.*, 2004).

Essas bandas não puderam ser identificadas nos espectros dos biocatalisadores imobilizados. Os comprimentos de onda em torno de 1650 cm^{-1} para os biocatalisadores representam as moléculas de água adsorvida nos suportes SBA/CE, MCM/CF e SPC, conforme descrito anteriormente, e tal banda pode ter se sobreposto àquela característica da amina primária dificultando sua identificação. Quanto à amina secundária, a banda que se forma em 3380 cm^{-1} também pode ter sido sobreposta pela ampla banda gerada devido à presença dos grupos superficiais Si-OH hidratados dos suportes (SCALERA *et al.*, 2012). Além disso, a quantidade de enzima imobilizada é pequena em relação à massa do suporte fazendo com que a intensidade dos espectros e as bandas características também sejam muito pequenas em relação à intensidade das bandas características do suporte.

4.2.2 Difractometria de raios X

4.2.2.1 Sílicas utilizadas como suporte

De acordo com os difratogramas as estruturas hexagonais do arranjo de poros tanto da MCM-41 como da SBA-15 podem ser confirmados por meio dos três picos identificados, Figura 4.5, e que são indexados aos planos (100), (110) e (200) (GRUN *et al.*, 1999; ZHAO; SUN; STUCKY, 2000). Mesmo após a calcinação (MCM/CF e SBA/CE) as sílicas mantiveram tais picos, indicando que o processo de calcinação não afeta de forma significativa suas intensidades, havendo apenas um pequeno deslocamento nos picos para ângulos levemente maiores, o que indica uma pequena contração na abertura dos poros da amostra.

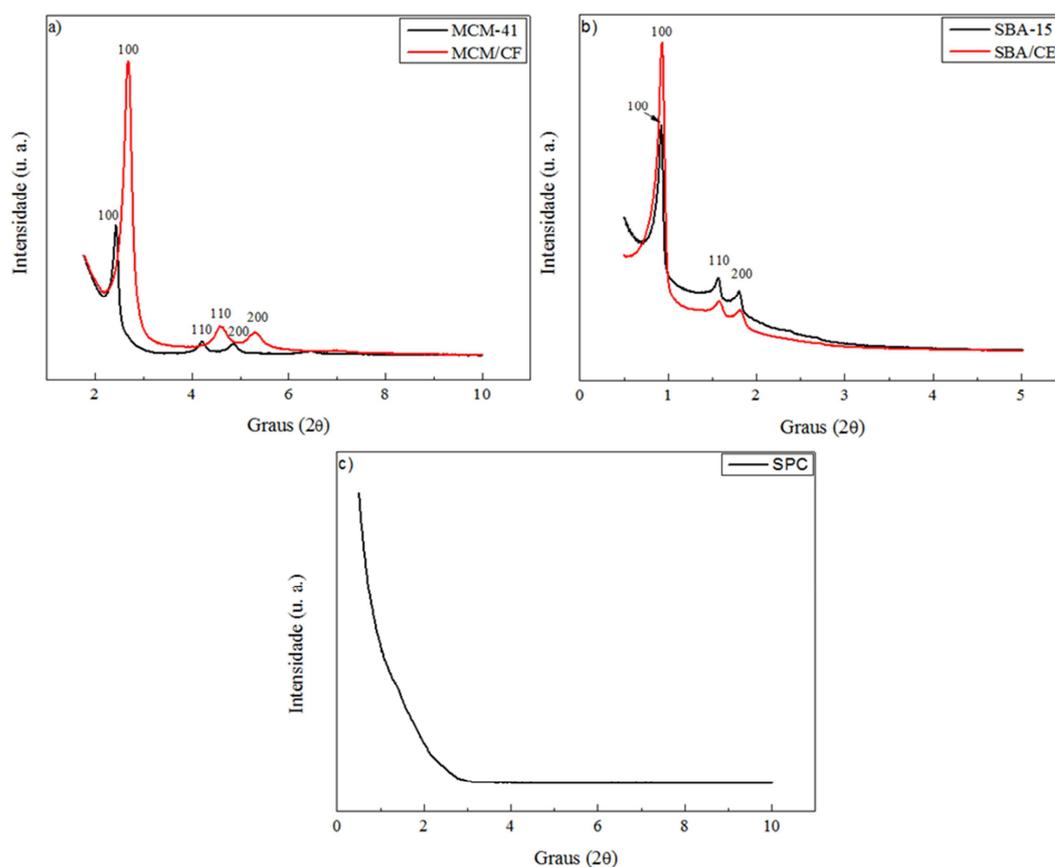


Figura 4.5 - Difractogramas das sílicas utilizadas como suporte a) MCM-41 e MCM/CF; b) SBA-15 e SBA/CE e c) SPC.

Cabe ressaltar que a amostra SPC não apresentou picos de difração na faixa analisada, indicando que esta sílica não apresenta organização estrutural como as demais amostras.

De posse dos difratogramas, foram determinadas as distâncias interplanares (d_{100}) e os parâmetros de cela unitária (a_0) para as amostras sintetizadas de partida e após a calcinação. Os valores obtidos para os parâmetros estruturais são mostrados Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Distâncias interplanares e parâmetros de cela unitária das amostras de partida e calcinada.

Amostra	d_{100} (nm)	a_0 (nm)
MCM-41	3,7	4,40
MCM/CF	3,5	4,00
SBA-15	9,8	11,3
SBA/CE	9,7	11,2

A diminuição do valor de cela unitária para a MCM-41 antes e após a calcinação foi de aproximadamente 9,1%, enquanto para a SBA-15 foi de 0,09% indicando uma maior contração de poros para a amostra MCM/CF.

De acordo com Huo e colaboradores (1994) a síntese da MCM-41 em meio alcalino ocorre devido à cooperação entre a solução aniônica do silicato e o surfatante catiônico (S^{+T}). As interações entre essas espécies, interações iônicas, são mais fortes que as que ocorrem na síntese da SBA-15 em condições ácidas, em que o polímero é protonado, levando a interações eletrostáticas como ligações de hidrogênio entre o surfatante (P123) e o precursor inorgânico. Esta razão pode explicar o fato da SBA-15 ser mais estável mesmo com o uso de um método de calcinação sem fluxo de nitrogênio e ar sintético. Além disso, deve-se considerar que as paredes da SBA-15 são mais espessas (5,08 nm) do que as da MCM-41 (1,5 nm), que pode ter como resultado a maior estabilidade térmica durante o processo de calcinação para eliminação do direcionador de estrutura.

4.2.1.1 Biocatalisadores imobilizados

Os difratogramas obtidos para as sílicas calcinadas antes e após a imobilização da enzima estão ilustrados na Figura 4.6.

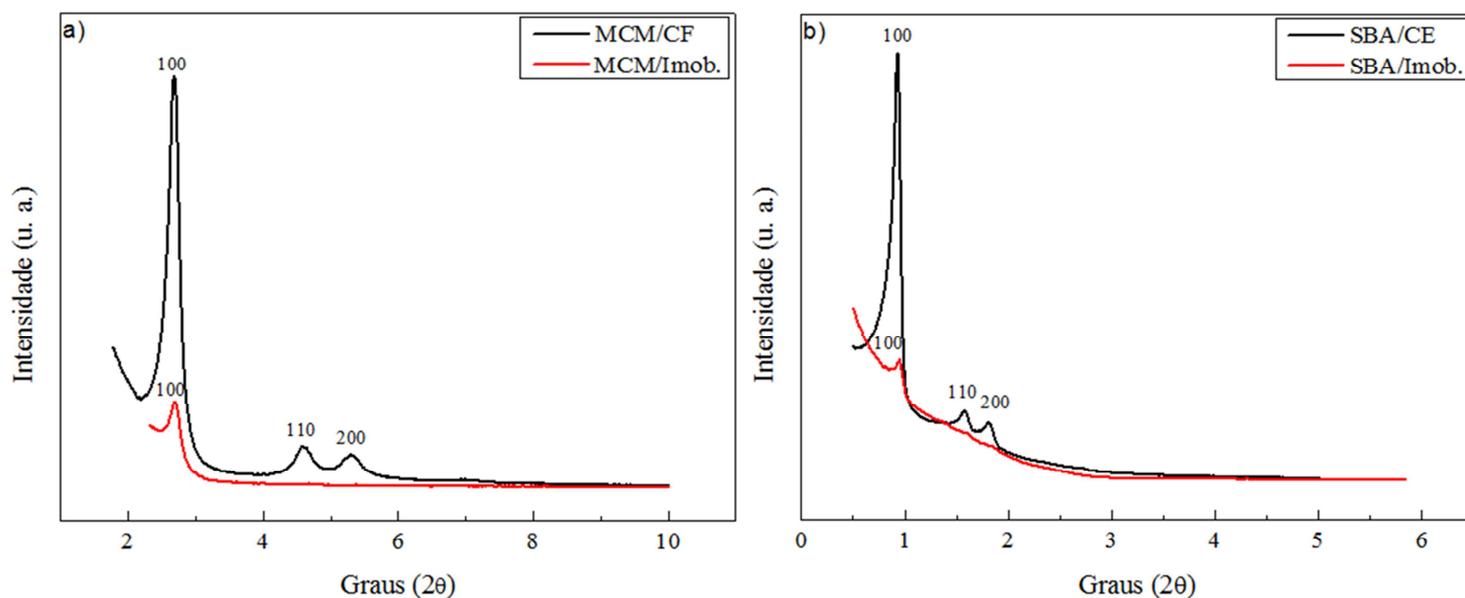


Figura 4.6: Difratogramas de raios X das sílicas utilizadas como suporte antes e após a imobilização da enzima: a) MCM/CF e MCM/Imob. e b) SBA/CE e SBA/Imob..

De acordo com os difratogramas obtidos apenas os planos indexados ao Índice de Miller (100) estão presentes após o processo de imobilização das lipases.

A formação dos picos nas análises por difratometria de raios X resulta na diferença entre o “contraste de espalhamento” entre as paredes de silicato e do material que compõe os poros e a diminuição dos picos não implica necessariamente na perda da estrutura hexagonal tanto da MCM-41 quanto da SBA-15 (MARLER *et al.*, 1996). Tal comportamento foi relatado no trabalho desenvolvido por Vinu e colaboradores (2004), em que o citocromo c foi imobilizada em MCM-41 e SBA-15. Segundo os autores, a diminuição da intensidade dos picos está associada ao maior contraste entre a densidade eletrônica das paredes de silício e os poros vazios em relação à densidade eletrônica das paredes de silício e dos poros preenchidos com a enzima.

A fim de investigar se a enzima utilizada no presente trabalho seria capaz de ser adsorvida no interior dos poros dos suportes, foram realizadas análises de fisissorção de nitrogênio para determinação das propriedades texturais das sílicas calcinadas e após a imobilização da enzima.

4.2.3 Adsorção/dessorção de nitrogênio

4.2.3.1 Sílicas utilizadas como suporte

A Figura 4.7 apresenta as isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio para a amostra MCM/CF.

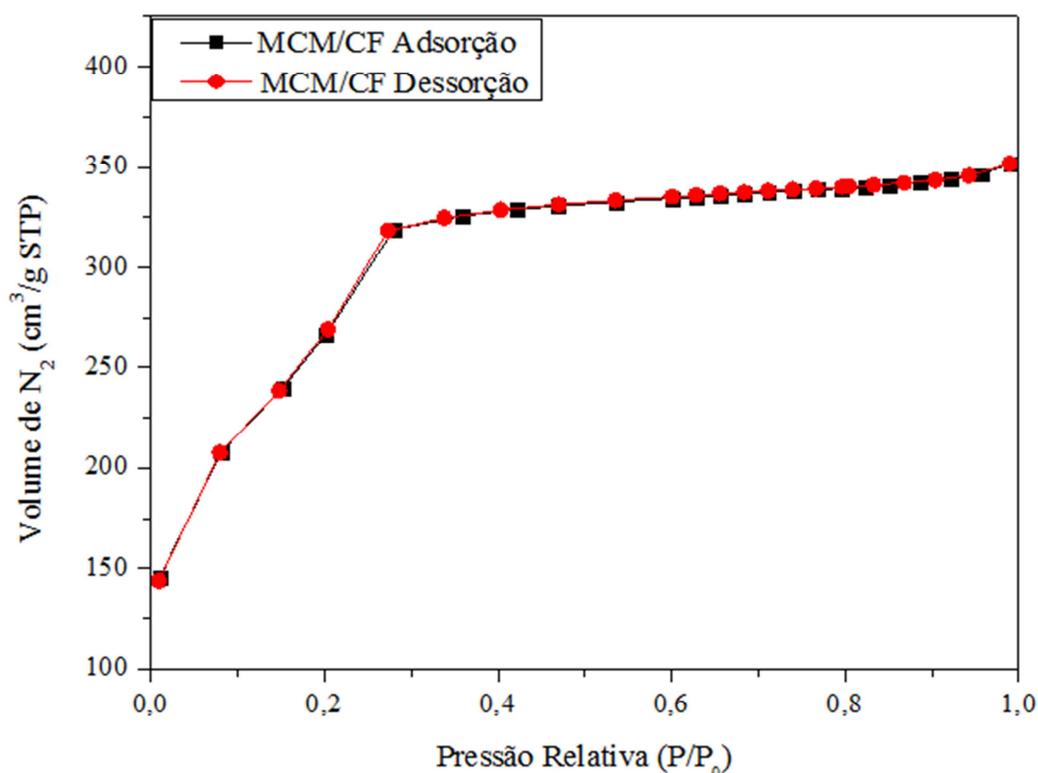


Figura 4.7 - Isotermas de Adsorção/Dessorção de nitrogênio para MCM/CF.

A isoterma mostrada na Figura 4.7, de acordo com Llewellyn e colaboradores (1994), seria um tipo de isoterma de transição entre o tipo I para materiais microporosos e tipo IV para materiais mesoporosos e ocorrem para MCM-41 com poros de diâmetro inferior a 2,5 nm. Não existe a condensação capilar com histerese, o que pode indicar a formação de monocamada em baixas pressões relativas ($P/P_0 = 0,1$), seguida de preenchimento de poros como se fossem microporos.

Thommes; Khon; Froba, (2002) não encontraram a formação de histerese para MCM-41 com poros inferiores a 4 nm e com a utilização de nitrogênio como adsorbato.

Segundo os autores, a formação de histerese depende do tamanho dos poros, dos materiais adsorventes, do adsorvato utilizado e da temperatura de análise.

Comportamento diferente das isotermas encontradas para a MCM/CF foi demonstrado pelas isotermas da SBA/CE, que estão ilustradas na Figura 4.8.

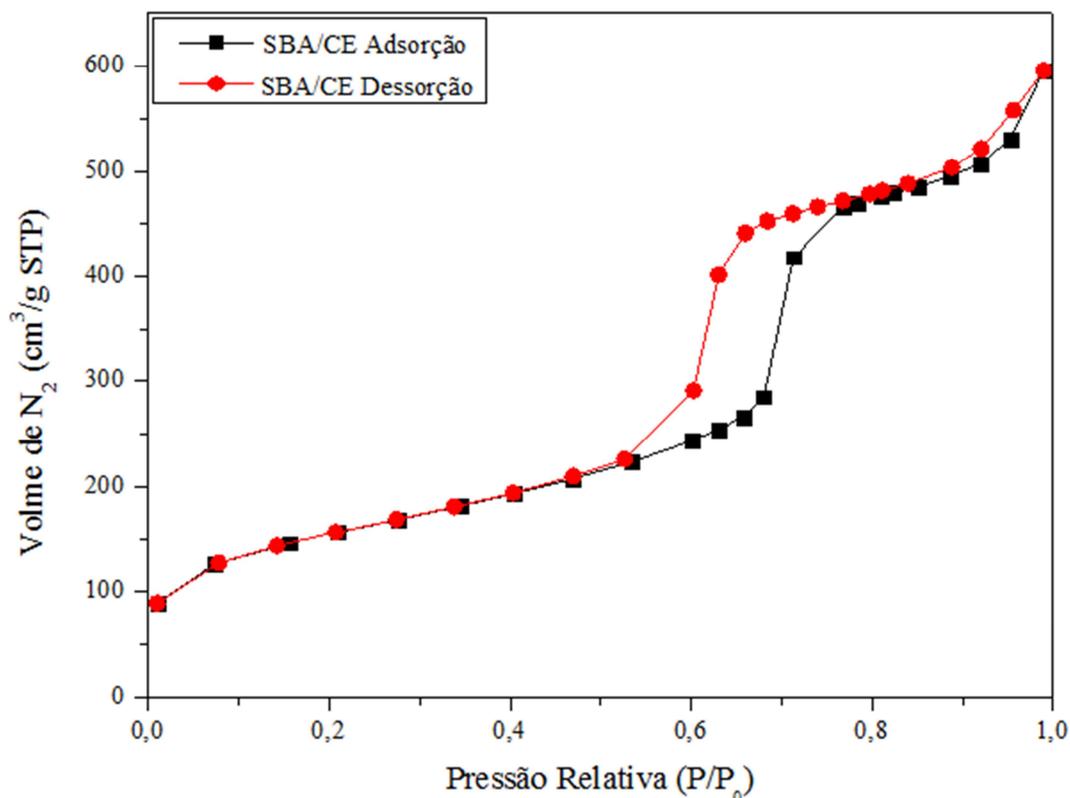


Figura 4.8 - Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio SBA/CE.

A isoterma mostrada na Figura 4.8 é do tipo IV, com histerese associada à condensação capilar nos mesoporos, representando mesoporosidade com poros com faixa estreita de distribuição de tamanho. A adsorção inicial ocorre com a formação de monocamada de adsorbato seguido do preenchimento dos poros em multicamadas. Após o preenchimento existe a condensação capilar com o aumento repentino do volume de nitrogênio adsorvido seguido da saturação do poro e, então, o nitrogênio é adsorvido nas paredes externas. A histerese é do tipo H1 característica de poros cilíndricos (SING *et al.*, 1985; SCHWANKE e PERGHER, 2012).

A Sílica de Porosidade Controlada também foi caracterizada por meio da fisissorção de nitrogênio, porém, não foi possível determinar suas características texturais, já que o equipamento se limita a analisar materiais com poros de até 30 nm.

As características texturais foram então tomadas do trabalho de Trevisan; Mei; Zanin, (2000) que utilizaram esta mesma sílica comercial macroporosa.

4.2.3.2 Biocatalisadores imobilizados

As isotermas de fisissorção de nitrogênio para as amostras imobilizadas são mostradas na Figura 4.9. Pode-se verificar que, após a imobilização, a MCM/Imob. apresentou característica de material microporoso, com isoterma do tipo I. Por outro lado, a isoterma da SBA/Imob. manteve o mesmo comportamento anterior, porém, com menor quantidade de nitrogênio adsorvido/dessorvido, como pode ser observado a partir da Figura 4.9 b.

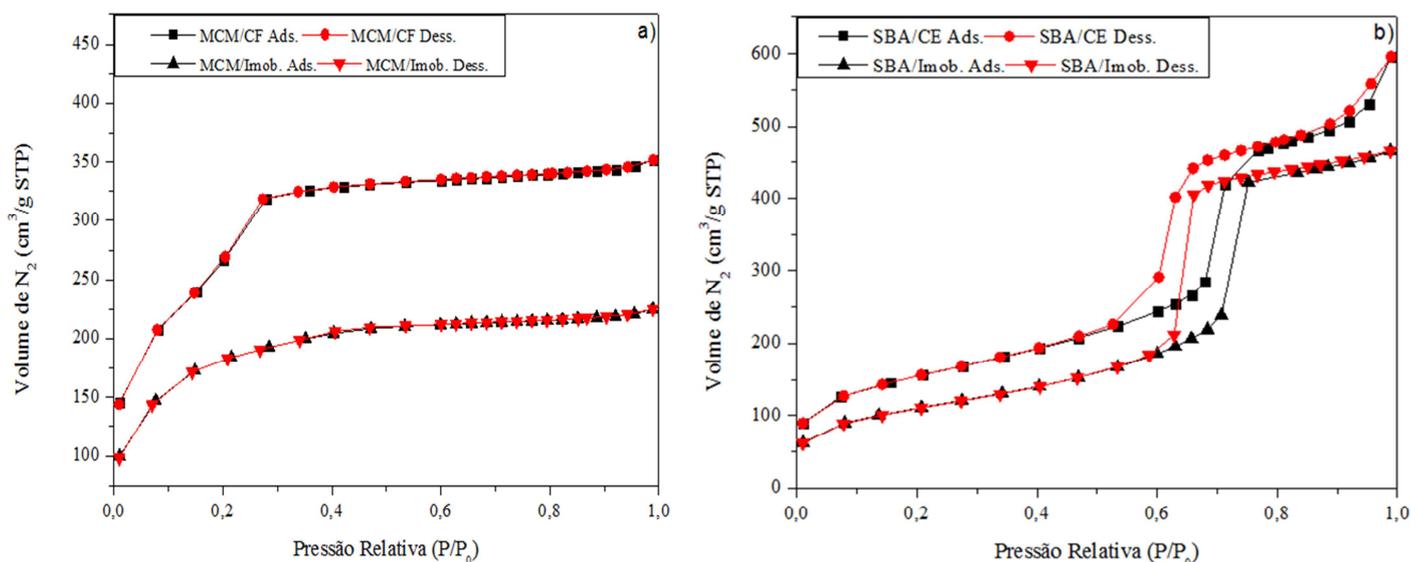


Figura 4.9 - Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio para: a) MCM/CF e MCM/imob. e b) SBA/CE e SBA/Imob.

Por meio dos dados obtidos na análise adsorção/dessorção de nitrogênio foi possível determinar os parâmetros texturais das sílicas e biocatalisadores imobilizados, que estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Características texturais das sílicas e biocatalisadores imobilizados.

Tipo de Material	Volume de poros (cm³/g)	Área específica^b (m²/g)	Diâmetro médio de poros (nm)	Espessura de parede (nm)
MCM/CF	0,36 ^a	1059	2,25 ^a	1,50
MCM/Imob.	0,14 ^a	605	2,58 ^a	Nd
SBA/CE	0,82 ^a	540,4	6,12 ^a	5,08
SBA/Imob.	0,7 ^a	388,77	5,96 ^a	Nd
*SPC	0,64	56,49	50,2	-

a: BJH; b: BET; Nd: não determinado.

*Parâmetros retirados de Trevisan; Mei; Zanin, (2000).

Nota-se pelos valores apresentados na Tabela 4.3 que os mesoporos são muito pequenos, próximos ao limite superior da classificação de microporos, para a MCM/Imob., o que está de acordo com as curvas de adsorção/dessorção de nitrogênio. Também é possível notar que sua área específica e seu volume de poros diminuíram mas o diâmetro médio de poros aumentou. Deve-se considerar que o diâmetro médio das lipases de *Burkholderia cepacia* está entre 4 e 5 nm e por isso, não podem ser adsorvidas no interior dos mesoporos da MCM/CF, sendo então fisissorvidas na superfície externa deste material (HUMPPHREY e WRIGHT, 2005; LI et al., 2010). Assim, o bloqueio parcial dos mesoporos pequenos pode ter levado à diminuição do volume de poros e da área específica.

A SBA/CE apresentou diâmetro médio de poros de 6,12 nm, tamanho suficiente para que as lipases utilizadas no presente trabalho fossem adsorvidas no interior de seus poros. A fisissorção no interior da SBA/CE pôde ser confirmada por meio das análises de adsorção de nitrogênio obtidas da amostra SBA/Imob., em que houve diminuição não tão pronunciada do volume de poros e, também, diminuição da área específica e diâmetro médio de poros, sem a perda de sua característica de material mesoporoso, com estreita faixa de distribuição de poros, conforme indicam as isotermas mostradas na Figura 4.9 b (HARTMANN, 2005).

A área externa específica da MCM/CF foi de 37 m²/g determinada pelo método t-plot a partir dos dados de adsorção/dessorção de nitrogênio e considerou-se como sendo a disponível para a ligação das lipases.

4.3 Umidade e quantidade de proteína nos biocatalisadores imobilizados

Os resultados obtidos para análise de proteína adsorvida e para o teor de umidade presente nos biocatalisadores são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Umidade presente nos biocatalisadores e quantidade de proteína adsorvida.

Tipo de Biocatalisador	Umidade (%)	(mg prot./g bio. seco)
SBA/Imob.	26,11 ± 5,76	2,09 ± 0,0699
MCM/Imob.	38,88 ± 3,53	1,76 ± 0,0707
SPC/Imob.	8,38 ± 2,96	1,31 ± 0,0307

Os resultados apresentados na Tabela 4.4 mostram que o teor de umidade das amostras aumenta com a diminuição do diâmetro de poros e aumento da área específica (Tabela 4.3). A SBA/Imob. apresentou a maior quantidade de proteína adsorvida por grama de biocatalisador seco, seguida da MCM/Imob. e, por fim a SPC/Imob.

De acordo com Serra e colaboradores (2008), o diâmetro de poros é o parâmetro que mais tem influência na eficiência de adsorção de enzimas, principalmente, a relação entre diâmetro de poros e o tamanho das moléculas da enzima. Outras características como volume total de poros e área específica não possuem efeitos significativos na imobilização de enzimas. Deste modo, é possível justificar a maior quantidade de enzima adsorvida sobre o suporte SBA/CE em relação ao suporte MCM/CF. Porém os resultados obtidos não estão totalmente de acordo com estes autores, pois a SPC que possui o maior diâmetro de poros foi a amostra que adsorveu menor quantidade de proteína.

No trabalho publicado por Trevisan; Mei; Zanin, (2000) foi verificado que com o aumento no diâmetro de poros, existe maior quantidade de enzima imobilizada. No entanto, quando o diâmetro de poro é tal que existe grande redução da área específica ocorre diminuição na quantidade de enzima imobilizada. Kang e colaboradores (2007) verificaram que poros maiores que duas vezes o tamanho da lipase têm influência negativa na eficiência de imobilização, pois, ao mesmo tempo que permitem o livre acesso da enzima ao interior do suporte, também existe maior difusividade para o exterior do suporte.

Mesmo com menor área disponível para a imobilização, a quantidade de proteína adsorvida na MCM/CF foi maior do que a SPC. Neste caso, o que pode ter influenciado a adsorção da lipase não foi a área disponível para imobilização, mas as características superficiais dos suportes. A lipase de *Burkholderia cepacia* apresenta ponto isoelétrico (pI) de 5,2 e a imobilização foi conduzida em pH 7,0, tornando a superfície dessa enzima carregada negativamente. A MCM-41 apresenta pI de 3,6 e a SPC de 2,0 e ambas também tiveram a sua superfície e carregada negativamente durante a imobilização (DEERE et al., 2003; REBELO et al., 2010; SZCZYPA; KAJDEWICZ; KOSMULSKI, 1989). De acordo com Gustafsson e colaboradores (2012), as enzimas podem ser adsorvidas em superfícies carregadas negativamente por adotar uma conformação em que os seus grupos carregados positivamente fiquem expostos aos grupos com cargas negativas da superfície da sílica. O que pode ter favorecido a imobilização na MCM/CF seria o fato de as repulsões eletrostáticas entre a enzima e esse suporte serem menores que a repulsão entre a SPC e as lipases, devido ao menor ponto isoelétrico da SPC.

4.4 Atividade hidrolítica

A Figura 4.10 apresenta os valores de atividade hidrolítica específica em função do tipo de biocatalisador estudado, para a reação de hidrólise do óleo de oliva.

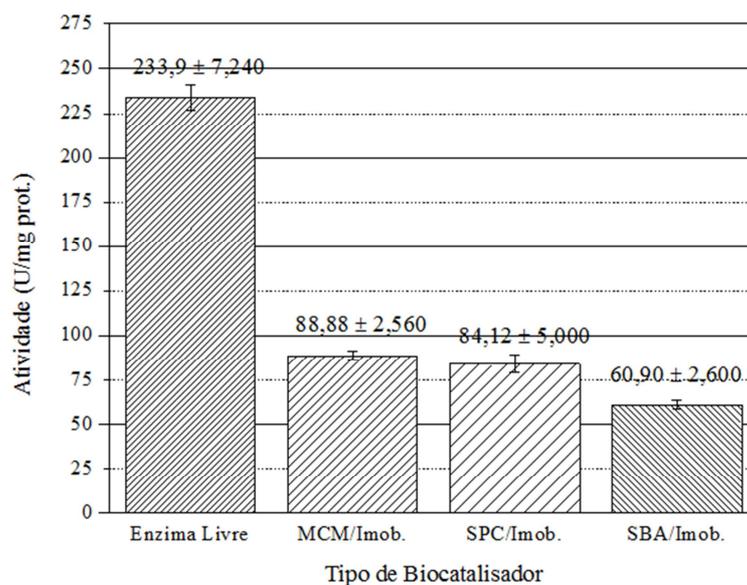


Figura 4.10 - Atividade Hidrolítica Específica em função do biocatalisador, para a temperatura de 50 °C.

Mesmo com a maior quantidade de proteína adsorvida no suporte e teoricamente disponível para catalisar a reação de hidrólise do óleo de oliva, a SBA/Imob. apresentou a menor atividade hidrolítica, dentre as amostras estudadas. Também pode ser observado que a atividade hidrolítica para a amostra SPC/Imob. foi ligeiramente inferior àquela observada para a MCM/Imob. quando não considerados erros associados aos valores obtidos. Assim, considerando-se que a molécula do óleo é volumosa, os poros do suporte SBA/CE podem ter limitado a livre difusão das moléculas reagentes para o interior do cristal até as enzimas adsorvidas (limitações estéricas), disponíveis para promover a reação de hidrólise. Por outro lado, como as enzimas estão adsorvidas, preferencialmente na superfície externa do suporte MCM/CF, este sistema não apresentaria limitações estéricas às moléculas reagentes do óleo, assim como também não ocorreria com o suporte macroporoso SPC. Deste modo, a pequena diferença na atividade seria devida apenas à diferença de quantidade de proteína adsorvida nestes suportes. Aparentemente o teor de umidade do suporte não apresentou influência sobre a atividade de hidrólise das amostras estudadas.

Segundo Gao e colaboradores (2000), também é possível presumir que a quantidade de proteína no interior do suporte SBA/CE gerou agregados enzimáticos e não a distribuição uniforme das enzimas ao longo da superfície interna dificultando o acesso do substrato ao sítio ativo.

O que também pode ter ocorrido é a maior lixiviação das enzimas dos biocatalisadores MCM/Imob. e SPC/Imob.. As enzimas desorvidas na forma livre são mais ativas em relação às lipases imobilizadas.

4.5 Atividade de esterificação

A atividade de esterificação do ácido oléico em função do tipo de biocatalisador é apresentada na Figura 4.11.

Conforme pode ser verificado por meio da Figura 4.11 o biocatalisador SPC/Imob. apresentou maior atividade, na reação de esterificação do ácido oleico, seguido da SBA/Imob. MCM/Imob. e da enzima livre.

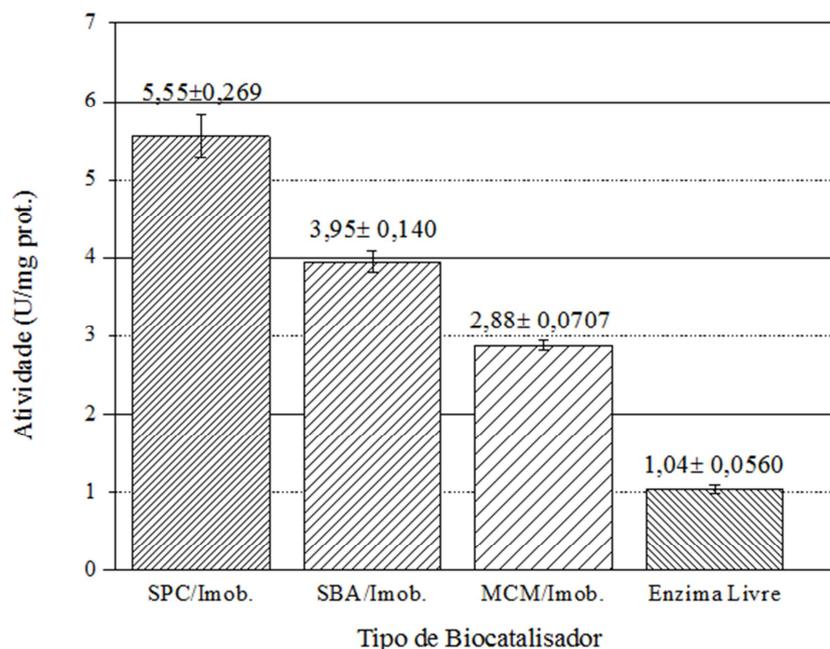


Figura 4.11 - Atividade de Esterificação do ácido oleico em função do tipo de biocatalisador, para a temperatura de 50 °C.

A quantidade de umidade da SPC/Imob. foi a menor dentre os biocatalisadores imobilizados. De acordo com Foresti e Ferreira (2007), a quantidade de água tem grande influência na catálise enzimática em meio orgânico, pois o excesso de água (mais que 3% m/m) pode favorecer a reação de hidrólise ao invés da reação de esterificação. Por outro lado, existe a necessidade de uma quantidade de água mínima para que a enzima mantenha sua conformação tridimensional e, assim, sua atividade catalítica. A quantidade de água que possui efeitos positivos na eficiência reacional, para a maioria das lipases, está entre 0,5 e 1% (VILLENEUVE, 2007). Tais fatos podem explicar o melhor desempenho catalítico da SPC/Imob. em relação aos demais biocatalisadores imobilizados.

A enzima livre na presença do etanol pode sofrer perda da capacidade catalítica e a imobilização aumenta a estabilidade em solventes orgânicos. Isso pode estar associado à maior atividade apresentada pelos biocatalisadores imobilizados. Outra característica apresentada pelas enzimas livres em forma de pó em meio não aquoso é a formação de agregados que pode ser prejudicial ao seu desempenho na reação (LEE; LIN; MOU, 2009; LI *et al.*, 2013b; SALIS *et al.*, 2009).

É interessante notar que a dimensão dos poros do suporte SBA/CE não apresenta restrições à difusão das moléculas reagentes de ácido oléico, que é muito

menor em relação à molécula do óleo. Assim, todos os sistemas reacionais não apresentaram restrições à difusão da molécula reagente até os sítios catalíticos das enzimas adsorvidas sobre o suporte.

4.6 Influência da temperatura e do pH na atividade de hidrólise

O comportamento dos catalisadores enzimáticos em relação à variação da temperatura na reação de hidrólise do azeite de oliva e também os dados obtidos para os ensaios encontram-se na Figura 4.12 e Tabela 4.5 respectivamente.

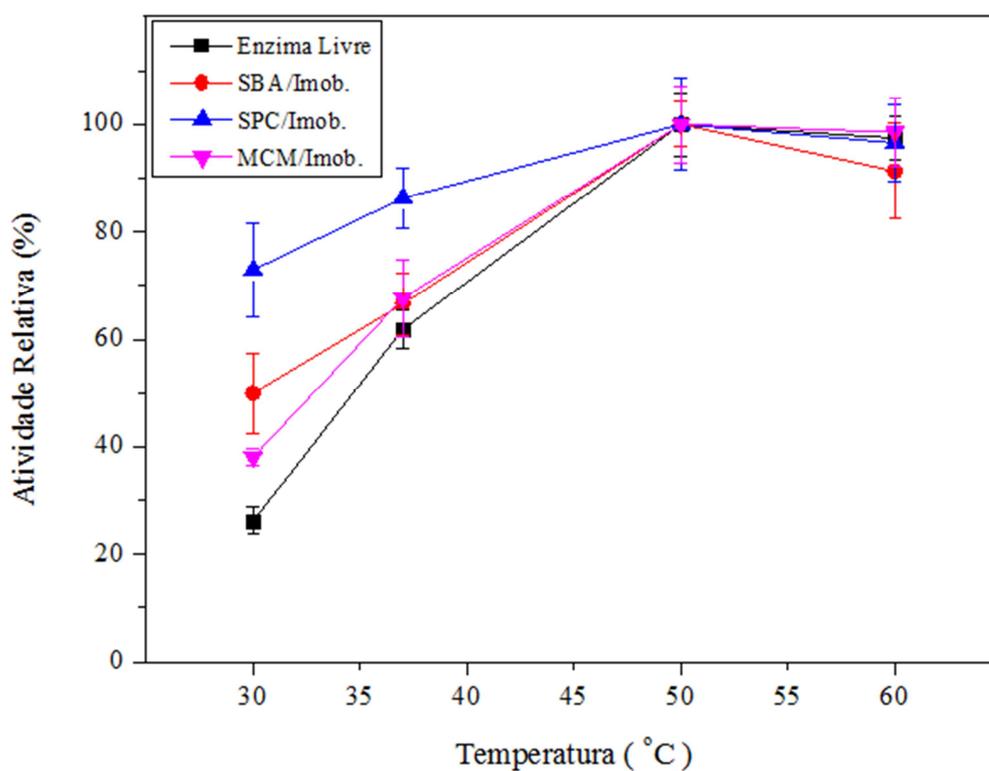


Figura 4.12 - Atividade Relativa dos biocatalisadores em função da variação da temperatura na reação de hidrólise do azeite de oliva.

Tabela 4.5: Atividade específica e atividade relativa dos biocatalisadores em função da variação da temperatura na reação de hidrólise do azeite de oliva.

Biocatalisador	Temperatura (°C)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Relativa (%)
Enzima Livre	30	61,25 ± 5,906	26,19 ± 2,526
	37	144,8 ± 5,535	61,91 ± 3,516
	50	233,9 ± 7,243	100 ± 5,940
	60	228,002 ± 2,002	97,47 ± 4,183
SBA/Imob.	30	30,45 ± 4,368	50,00 ± 7,475
	37	40,55 ± 1,273	66,60 ± 3,493
	50	60,89 ± 2,558	100 ± 4,201
	60	55,59 ± 4,899	91,30 ± 8,913
SPC/Imob.	30	61,35 ± 6,253	72,93 ± 8,637
	37	40,55 ± 4,368	86,30 ± 9,471
	50	84,12 ± 5,072	100 ± 8,528
	60	81,21 ± 3,643	96,53 ± 7,255
MCM/Imob.	30	33,88 ± 0,3556	37,89 ± 1,641
	37	60,16 ± 5,512	67,69 ± 7,081
	50	88,88 ± 4,487	100 ± 7,140
	60	87,58 ± 3,3402	98,53 ± 6,235

Conforme pode ser verificado a partir das curvas apresentadas na Figura 4.12 e dos dados da Tabela 4.5, os biocatalisadores imobilizados mostraram atividade relativa mais alta para temperaturas inferiores a 50 °C em relação à enzima livre e todos os catalisadores enzimáticos apresentaram melhor desempenho catalítico na temperatura de 50 °C (100% da atividade relativa). Porém, a atividade relativa diminuiu levemente para os biocatalisadores na temperatura de 60 °C (97,47% enzima livre; 91,30% SBA/Imob.; 96,53% SPC/Imob.; 98,53% MCM/Imob.).

Segundo Hu e colaboradores (2012), as ligações de hidrogênio dos grupos silanóis presentes nos suportes entre as aminas dos resíduos de aminoácidos da enzima faz com que a lipase mantenha sua estrutura rígida prevenindo mudanças conformacionais da estrutura ativa da enzima com a variação de temperatura e a maior estabilidade dos biocatalisadores estudados pode ser relacionada com este fato.

A Figura 4.13 e a Tabela 4.6 representam a variação da atividade relativa, específica e relativa, função do pH do meio reacional, preparado com diferentes soluções tampão, na hidrólise do azeite de oliva.

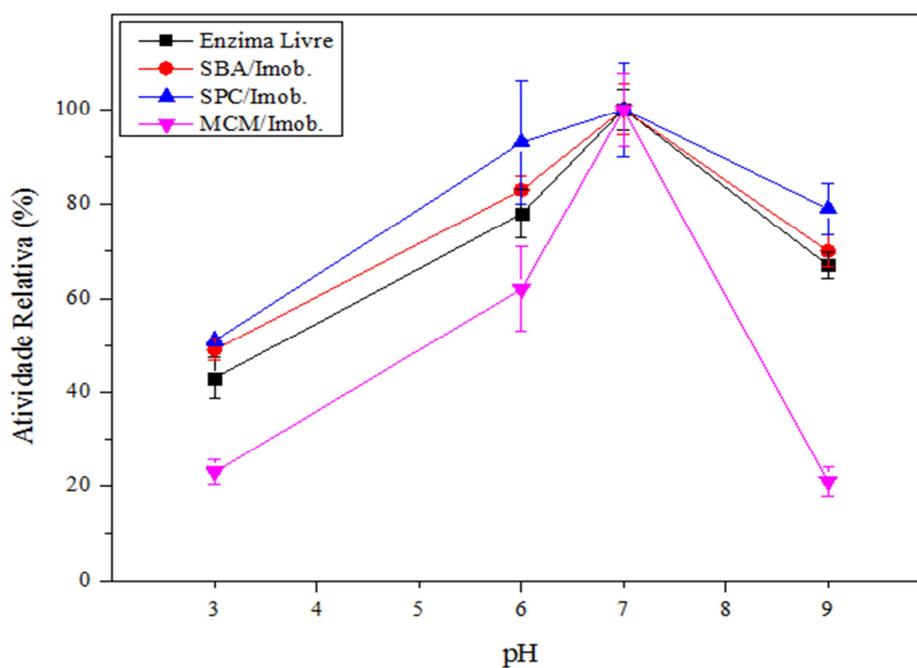


Figura 4.13 - Efeito da variação do pH do meio reacional para a reação de hidrólise do azeite de oliva a 50 °C.

Tabela 4-6 - Efeito da variação do pH do meio reacional na atividade específica e relativa para a reação de hidrólise do azeite de oliva a 50 °C.

Biocatalisador	pH	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Relativa (%)
Enzima Livre	3	102,3 ± 19,14	43,71 ± 8,182
	6	195,7 ± 3,833	83,68 ± 3,878
	7	233,9 ± 7,243	100 ± 5,940
	9	158,2 ± 5,392	67,64 ± 3,659
SBA/Imob.	3	30,09 ± 4,476	49,41 ± 7,639
	6	47,57 ± 0,951	78,13 ± 3,634
	7	60,89 ± 2,558	100 ± 4,201
	9	40,64 ± 2,441	67,64 ± 4,891
SPC/Imob.	3	43,18 ± 2,869	48,91 ± 4,509
	6	78,81 ± 2,542	93,68 ± 6,407
	7	84,12 ± 5,072	100 ± 8,528
	9	66,73 ± 2,648	79,33 ± 5,726
MCM/Imob.	3	33,88 ± 0,3786	23,12 ± 1,060
	6	55,08 ± 8,346	61,97 ± 9,897
	7	88,87 ± 4,487	100 ± 7,140
	9	18,79 ± 2,649	21,15 ± 3,167

As curvas apresentadas na Figura 4.13 e os dados da Tabela 4.6 mostram que a SPC/Imob. apresentou maior estabilidade enquanto a MCM/Imob. demonstrou estabilidade inferior ao da enzima livre. Também é possível mostrar que a solução com pH 7,0 foi a que proporcionou maior atividade catalítica para todos os catalisadores. De fato, Jegannathan; Chan; Ravindra, (2009) utilizaram lipase de *Burkholderia cepacia* livre e imobilizada e avaliaram sua estabilidade quanto à variação do pH do meio reacional. A maior atividade alcançada por ambas foi em solução com pH 7,0 conforme o observado no presente trabalho.

Jacoby e colaboradores (2013) estudaram as mudanças dos grupos silanóis presentes nas superfícies da SBA-15 e MMF (sílica mesoporosa) em relação à diferentes valores de pH. A partir dos resultados obtidos concluíram que houve um colapso na estrutura da MMF devido à dissolução e reprecipitação desses grupos em soluções com pH 3,0 e 10,0. Tal comportamento não foi observado para a SBA-15 devido à espessura de suas paredes internas, que eram 3 vezes maiores que as da MMF. A SBA/CE apresentou espessura de parede de 5,08 nm e a MCM/CF de 1,5 nm conforme apresentado na Tabela 4.3.

Cabe ressaltar que esse tipo de estudo não foi conduzido neste trabalho, porém, é possível que a baixa estabilidade encontrada para o biocatalisador MCM/Imob. possa ser explicada pela mudança da superfície do mesmo frente às variações do pH do meio reacional, influenciando assim a atividade enzimática.

Em relação à SPC, Weetall (1969) afirma que esse tipo de material não sofre modificação significativa na sua estrutura para uma ampla faixa de variação de pH.

4.7 Estabilidade operacional

A quantidade relativa de proteína desorvida em função da variação do tempo de permanência dos biocatalisadores em uma solução tampão fosfato pH 7,0, a 50 °C, estão representadas na Figura 4.14 e na Tabela 4.7.

As curvas apresentadas na Figura 4.14 mostram que a SBA/Imob. tem uma perda gradual de proteína ao longo do tempo de exposição no meio, estabilizando em valores de aproximadamente 35 % após 90 minutos.

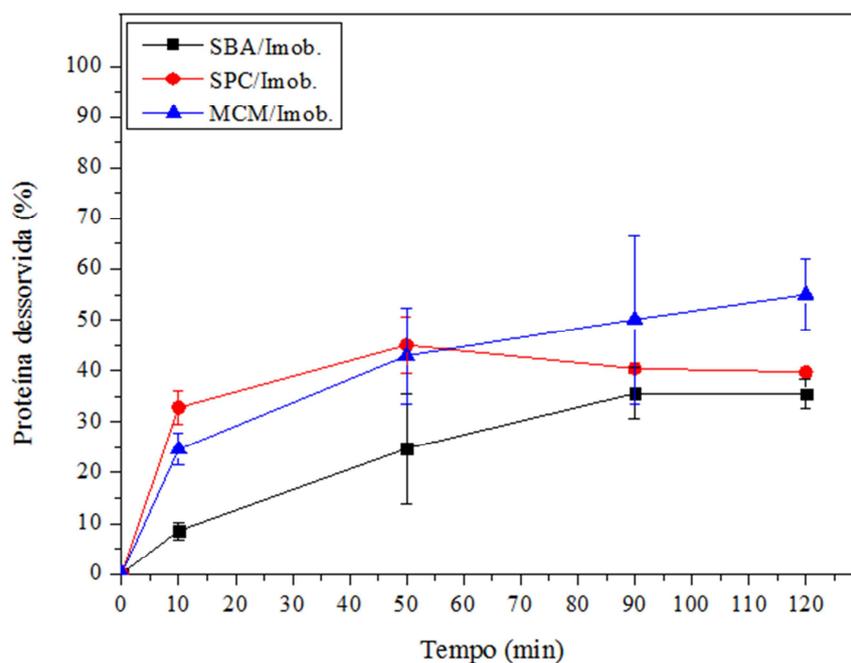


Figura 4.14 - Porcentagem de proteína desorvida dos biocatalisadores desorvidas em função do tempo de permanência em uma solução tampão em pH 7,0, a 50 °C.

Tabela 4.7 - Porcentagem de proteína desorvida dos biocatalisadores em função do tempo de permanência em uma solução tampão em pH 7,0, a 50 °C.

Biocatalisador	Tempo (min)	Proteína desorvida (%)
SBA/Imob.	10	8,562 ± 1,730
	50	24,77 ± 10,81
	90	35,61 ± 4,915
	120	35,47 ± 2,883
SPC/Imob.	10	32,83 ± 3,283
	50	45,00 ± 5,600
	90	40,42 ± 0,8704
	120	39,72 ± 0,4643
MCM/Imob.	10	24,59 ± 3,161
	50	42,92 ± 9,483
	90	50,07 ± 16,44
	120	54,99 ± 6,955

Verifica-se que para o biocatalisador SPC/Imob., há uma dessorção rápida de proteína até os primeiros 10 minutos ($32,83 \pm 3,283$ %), sendo que após 50 minutos essa taxa de dessorção permanece estável, alcançando valores próximos a 40%.

Para o biocatalisador MCM/Imob., nos primeiros 10 minutos há uma maior velocidade de perda de proteína. Após este tempo a velocidade de dessorção diminui, mas segue crescendo até atingir valores de aproximadamente 55% em 120 minutos de exposição ao meio.

Conforme o comportamento apresentado pelos biocatalisadores em relação à lixiviação das lipases, não se pode descartar a hipótese de que as atividades mais altas apresentadas por MCM/Imob. e SPC/Imob. na reação de hidrólise do azeite de oliva tenham sido influenciadas pela maior quantidade de proteína dessorvida desses catalisadores enzimáticos para o meio reacional.

A Figura 4.15 apresenta os valores de atividade residual para o reuso dos biocatalisadores imobilizados na reação de hidrólise do azeite de oliva, a 50 °C.

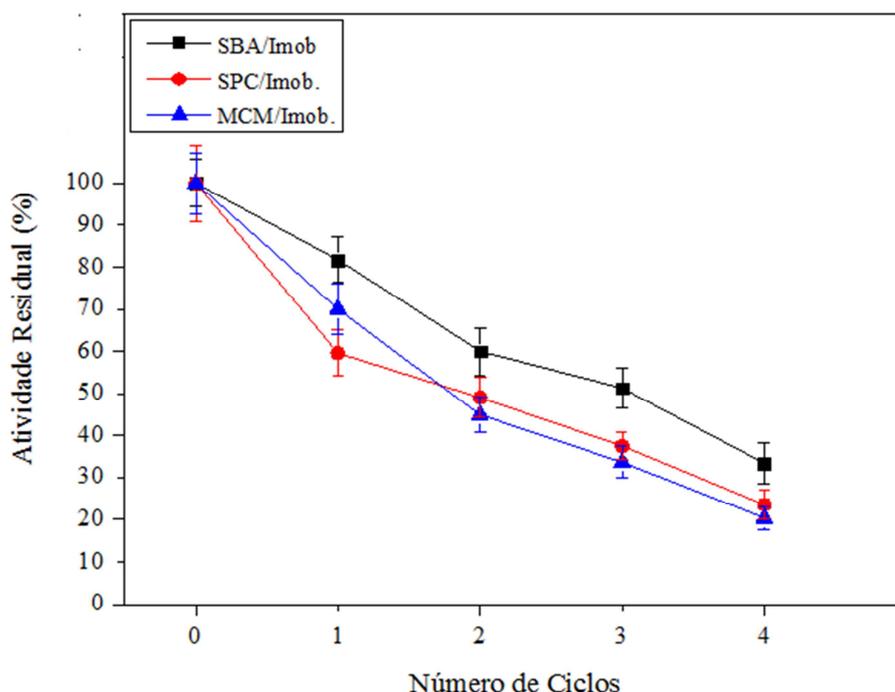


Figura 4.15 - Atividade residual dos biocatalisadores imobilizados em relação aos ciclos operacionais, para a reação de hidrólise do azeite de oliva a 50 °C e em pH 7,0.

A SBA/Imob. apresentou maior estabilidade operacional em relação aos demais biocatalisadores imobilizados, apresentando atividade menor que 50% da sua

atividade inicial no quarto reuso, enquanto a SPC/Imob. e a MCM/Imob. perderam 50% do valor da sua atividade inicial já no terceiro ciclo operacional. A perda de atividade mais acentuada do ciclo inicial para o ciclo 1 de reuso pode ser explicada pela maior dessorção de proteínas, conforme verificado no teste de lixiviação.

4.8 Síntese de ésteres etílicos a partir do óleo de Nabo Forrageiro

Os ésteres etílicos produzidos (g) em relação à quantidade de proteína presente nos biocatalisadores (mg) (eficiência catalítica), em função do tempo de reação, à temperatura de 50 °C, com razão molar álcool óleo de 1:3 e 0,2 g de catalisador enzimático, está ilustrada na Figura 4.16.

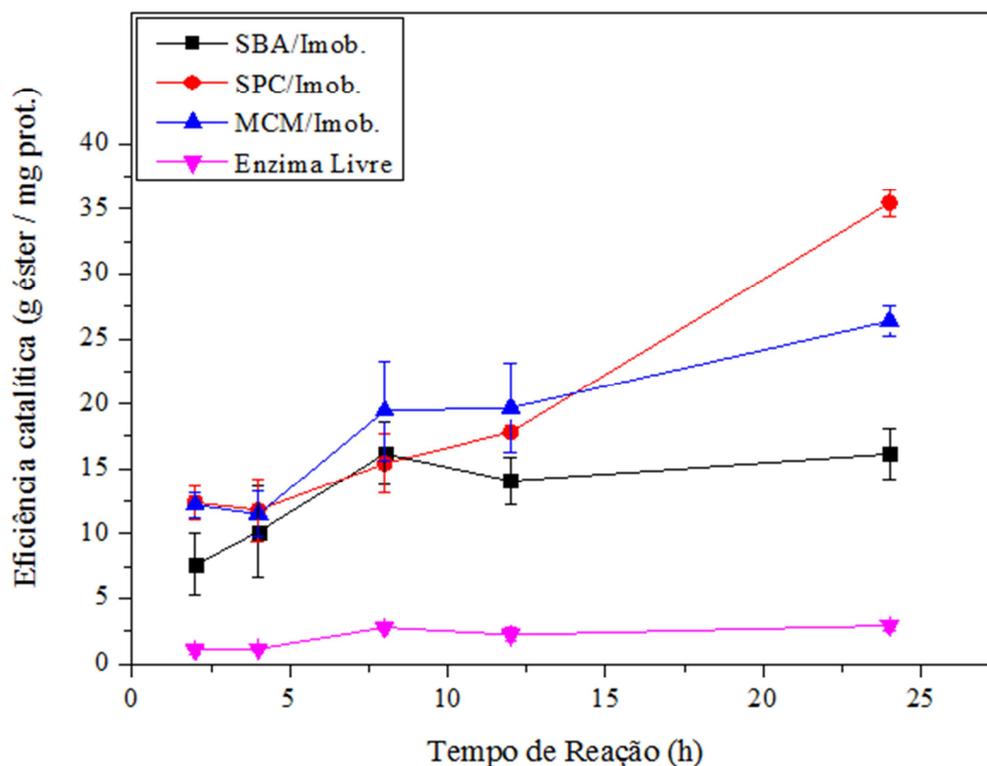


Figura 4.16 - Eficiência catalítica dos biocatalisadores na produção de ésteres etílicos, para a reação de transesterificação do óleo de Nabo Forrageiro, razão molar álcool:óleo 3:1, utilizando 0,2 g de biocatalisador, para temperatura de 50 °C.

As curvas apresentadas na Figura 4.16 mostram que todos os biocatalisadores imobilizados apresentaram eficiência catalítica (g éster/mg prot.) mais elevada do que a enzima livre.

De acordo com Penccreac'h e Baratti (1999) existe o aumento na atividade da enzima imobilizada em relação à enzima livre na presença de solventes orgânicos. Uma possível explicação para este fato é que a enzima imobilizada tem sua forma “aberta”, ou seja, a tampa “lid” não cobre o seu sítio ativo. Isso pode ter ocorrido na reação de transesterificação do óleo de Nabo Forrageiro. Enquanto as enzimas livres estavam, em sua maioria, na forma “fechada”, a maioria das enzimas imobilizadas estava na sua conformação “aberta”, favorecendo assim a ação catalítica das mesmas.

Shimada e colaboradores (2002) em revisão sobre a alcoólise enzimática para a produção de biodiesel constataram que as enzimas livres não são estáveis na presença de alcoóis de cadeia curta como o metanol e etanol e isso prejudica o desempenho catalítico na produção de ésteres. O fato dos biocatalisadores imobilizados MCM/Imob., SBA/Imob. e SPC/Imob. terem apresentado maior eficiência catalítica, pode indicar que a imobilização tornou os biocatalisadores menos suscetíveis aos álcoois de cadeia curta. Ainda segundo Shimada e colaboradores (2002), a utilização de óleo de soja não degomado na reação prejudica o desempenho das enzimas imobilizadas (Novozyme 435) devido à presença de fosfolipídios no óleo que interagem com o suporte.

Segundo Cremonez e colaborades (2013) o óleo de Nabo Forrageiro não apresenta lecitina na sua composição e, os biocatalisadores imobilizados utilizados no presente trabalho não podem ter sido prejudicados pela presença dos fosfolipídios, pois, estes não estão presentes no meio reacional.

A Tabela 4.8 representa os rendimentos em éster obtidos após 24 horas de reação e a eficiência catalítica dos biocatalisadores.

Tabela 4.8 - Rendimento em éster % e eficiência catalítica em g éster/mg de proteína após 24 horas de reação a 50°C.

Biocatalisador	Rendimento % éster (g éster/g óleo)*100	Eficiência Catalítica (g éster/mg prot.)
SPC/Imob.	21,27 ± 0,7	35,5 ± 1,01
MCM/Imob.	14,19 ± 0,64	26,37 ± 1,18
SBA/Imob.	11,97 ± 1,5	16,14 ± 1,96
Enzima Livre	8,95 ± 1,34	2,92 ± 0,44

Os valores apresentados na Tabela 4.8 indicam que o biocatalisador SPC/Imob. apresentou melhor desempenho na reação em relação ao biocatalisador MCM/Imob.

Possivelmente o que pode ter proporcionado essa diferença seria o fato de que as proteínas se mantiveram na superfície externa do suporte MCM/CF, que apresentou menor área disponível para a imobilização que o suporte SPC, porém adsorveu maior quantidade de proteína. Isso pode ter gerado agregados de enzimas e um menor espaçamento entre as lipases. Por outro lado, o diâmetro de poros do suporte SPC permite que as proteínas tenham acesso ao seu interior, com maior área específica, e isso pode ter contribuído para que elas tenham sido melhores distribuídas e mais espaço entre as enzimas pode favorecer a atividade catalítica além de favorecer a difusão do substrato (THÖRN; GUSTAFSSON; OLSSON, 2011).

O catalisador enzimático SBA/Imob. demonstrou desempenho inferior aos demais biocatalisadores imobilizados na síntese de ésteres etílicos.

De acordo com Hudson; Cooney; Magner, (2008), a hidrofobicidade do substrato tem grande influência na atividade catalítica de enzimas imobilizadas em sílicas hidrofílicas, como as utilizadas no presente trabalho. Segundo os autores, se o substrato é hidrofóbico, sua difusão interna através dos canais do suporte é lenta e isso prejudica o desempenho da enzima imobilizada em seu interior. Suportes com poros maiores podem compensar esta restrição favorecendo a taxa de difusão interna. Esta explicação pode ser aplicada ao fato do biocatalisador imobilizado SBA/Imob. ter apresentado desempenho inferior à SPC/Imob., devido à difusão do substrato no interior dos seus poros ser mais restrita quando comparada à difusão nos canais da SPC/Imob..

Lee e colaboradores (2005) estudaram quatro tipos de suporte para a imobilização de citocromo c em MAS-9 (9nm), MCM-48-S (2,7 nm) e MCM-41-S (2,5 nm) e zeólita Y (0,74 nm). A enzima imobilizada na MAS-9 apresentou maior atividade catalítica na reação de oxidação com pireno e antraceno, dois substratos hidrofóbicos. O pireno e o antraceno, segundo os autores, puderam se difundir rapidamente na MAS-9 devido ao seu diâmetro de poros superior. A conclusão dos autores reforça o fato da difusão do substrato ser o fator que gerou menor rendimento da SBA/Imob. na reação de transesterificação.

Tripisina foi imobilizada em MCM-41, MCM-48, SBA-15, sílica gel por Yiu; Wright; Botting, (2001) e os biocatalisadores foram aplicados na reação de hidrólise. A conclusão do estudo realizado foi que o aumento do diâmetro de poros dos materiais pode resolver o problema da difusão interna e, também, do bloqueio dos poros por meio do substrato e tal fato pode explicar a diferença entre o desempenho da SPC/Imob. e a SBA/Imob..

A MCM/Imob. também foi mais ativa na reação que a SBA/Imob.. Como as enzimas foram imobilizadas na superfície externa desse suporte, a restrição difusional do substrato, mesmo com a possível agregação das lipases, pode ter sido menor que a restrição imposta pelos poros da SBA/Imob.. Estes resultados não estão de acordo com o que foi observado por Zheng e colaboradores (2006), que testaram a eficiência catalítica das enzimas imobilizadas em MCM-41, MCM-48 e SBA-15 na hidrólise da tributirina (MM 302,36 g/mol). A SBA-15 apresentou-se como suporte com melhor eficiência e, segundo os autores, isso foi devido ao seu diâmetro médio de poros (6,1 nm) ser superior ao da MCM-41 (1,6 nm), permitindo o acesso da enzima e do substrato ao interior do biocatalisador. No presente trabalho, o substrato utilizado foi o óleo de Nabo Forrageiro, o qual possui massa molar superior (863 g/mol) ao da tributirina e o tamanho das moléculas dos triacilgliceróis presentes podem levar a uma maior dificuldade de difusão no interior da SBA/Imob. afetando a ação catalítica das lipases, conforme discutido anteriormente.

A dessorção das lipases não foi capaz de influenciar o desempenho reacional dos diferentes biocatalisadores, pois conforme visto anteriormente, no caso da reação de transesterificação a enzima livre é menos ativa que a enzima imobilizada.

5. CONCLUSÕES

O óleo de Nabo Forrageiro utilizado apresentou índice de acidez e umidade que o torna inadequado para a reação de transesterificação via catálise alcalina homogênea.

O processo de calcinação adotado para a MCM-41 e SBA-15 demonstrou-se eficiente, pois todos os resíduos orgânicos foram eliminados restando apenas os grupos inorgânicos na composição desses materiais de acordo com as análises no Infravermelho com Transformada de Fourier.

As análises de Difração de Raios X detectaram a presença do arranjo hexagonal de poros tanto para a MCM-41 e SBA-15, o que indica que a estrutura desses materiais foi alcançada.

A MCM-41 é uma peneira molecular que possui poros com diâmetros menores, porém, maior área específica quando comparada à sílica mesoporosa SBA-15.

As análises de Difração de Raios X para os biocatalisadores imobilizados em MCM-41 e SBA-15 não podem confirmar a difusão das proteínas no interior dos mesoporos dos suportes, pois mesmo as enzimas estando adsorvidas em sua superfície há alteração nos picos característicos do arranjo hexagonal de poros.

A técnica de adsorção/dessorção de nitrogênio confirmou a entrada das proteínas no interior da SBA-15 e, também, que as enzimas ficaram adsorvidas apenas na superfície da MCM-41.

O material que mais reteve proteína foi a SBA-15 devido ao acesso das enzimas ao interior dos poros e, também, à sua área interna muito superior aos demais suportes.

O biocatalisador SBA-15 apresentou menor atividade na reação de hidrólise do azeite de oliva devido, provavelmente, à dificuldade de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima.

Os biocatalisadores imobilizados apresentaram melhor desempenho na reação de esterificação do ácido oléico em relação à enzima livre, demonstrando que a imobilização previne a perda de atividade catalítica em solventes orgânicos.

Os biocatalisadores imobilizados foram mais estáveis à variação da temperatura na reação de hidrólise do azeite de oliva quando comparados à enzima livre. A estabilidade dos biocatalisadores imobilizados também foi maior na reação com

variação do pH do meio, exceto para a enzima imobilizada em MCM-41, que pode ter sofrido mudanças na sua estrutura afetando a atividade enzimática.

O biocatalisador obtido por meio de imobilização em SBA-15 foi mais estável no teste de lixiviação e de reuso reacional, provavelmente, devido ao seu diâmetro de poro (6,1 nm) ter dimensões próximas ao tamanho da enzima de *Burkholria cepacia* (4-5 nm), dificultando, assim, a difusão externa da lipase, diferentemente da SPC que possui poros muito superiores (50 nm) ao tamanho da enzima.

A enzima livre levou a uma menor quantidade de éster produzido na reação de transesterificação, e as enzimas imobilizadas levaram a uma maior quantidade de éster na reação.

Por fim, o biocatalisador (SPC/Imob.), que apresentou características texturais tais que permitissem menor restrição à difusão dos substratos ao seu interior, se mostrou mais ativo na reação de transesterificação com Óleo de Nabo Forrageiro e etanol.

Sugestões para trabalhos futuros:

- Avaliar o comportamento estrutural e morfológico dos suportes de sílica na imobilização e nos testes de atividade hidrolítica, de esterificação e na reação de transesterificação.

- Sintetizar a peneira molecular SBA/15 com diferentes tamanhos de poros e utilizá-las como suporte para as lipases e analisar a influência dos mesmos conforme descrito no parágrafo acima.

- Efetuar um planejamento fatorial 3^3 com variação da quantidade de biocatalisador, relação molar óleo/álcool e temperatura na reação de transesterificação e determinar quais são as variáveis que mais têm influência e quais os valores das mesmas para se obter um rendimento máximo na reação.

- Analisar a influência da adição de água e solventes orgânicos na reação de transesterificação.

REFERÊNCIAS

ADEYEME, N. A.; MOHIUDDIN, A. K. M.; JAMEEL, A. T.. Biodiesel Production: A Mini Review. **International Journal Energy**. vol. 12, p. 15-28, 2011.

ADOLFO LUTZ. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. Óleos e Gorduras. **Versão Eletrônica**, *Cap. IV*, 2008.

ANP. **Boletim Mensal do Biodiesel**.

<<http://www.anp.gov.br/?pg=70553&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1400693077178>>. Acesso em: 20 mai. 2014.

ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; ZIZ, A. R. A.; SULAIMAN, N. M. N.. The Effects of Water on Biodiesel Production and Refining Technologies: A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. vol. 16, p. 3456-3470, 2012.

ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; AZIZ, A. R. A.; SULAIMAN, N. M. N.. The Effects of Catalysis in Biodiesel Production: A Review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. vol. 19, p. 14-26, 2013.

ÁVILA, R. N. A.; SODRÉ, J. R.. Physical –Chemical Properties and Thermal Behavior of Fodder Radish Crude Oil. **Industrial Crops and Products**. vol. 38, p. 54-57, 2012.

AZIMOV, F.; MARKOVA, I.; STEFANOVA, V.; SHARIPOV, K.. Synthesis and Characterization of SBA-15 and Ti-SBA-15 Nanoporous Materials for DME Catalysts. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**. vol. 47, p. 333-340, 2012.

BANKOVIĆ-ILIĆ, I. B.; STAMENKOVIĆ, O. S.; VELJKOVIĆ, V. B.. Biodiesel Production from Non-Edible Plant Oils. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. vol. 16, p. 3621-3647, 2012.

BRADFORD, M. M.. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CANAKCI, M.; VAN GERPEN, J.. Biodiesel Production From Oils and Fats with High Free Fatty Acids. **Transactions of the ASAE**. vol. 44, p. 1429-1436, 2001.

CANILHO, N.; JACOBY, J.; PASC, A.; CARTERET, C.; DUPIRE, F.; STÉBÉ, J. L.. Isocyanate-Mediated Covalent Immobilization of *Mucor miehei* Lipase onto SBA-15 for Transesterification Reaction. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. vol. 112, p. 139-145, 2013.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; DA SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.. Potencial de Biocatálise Enantiosseletiva de Lipases Microbianas. **Química Nova**. vol. 28, p. 614-621, 2005.

CHAMMOUN N.; GELLER, D. P.; DAS, K. C.. Fuel Properties, Performande Testing and Economic Feasibility of *Raphanus sativus* (oilseed readish) Biodiesel. **Industrial Crops and Products**. vol. 45, p. 155-159, 2013.

CHARAN, P. H.; RAO, G. R.. Investigation of Chromium Oxide Clusters Grafted on SBA-15 Using Cr-polycation Sol. **Journal of Porous Materials**. vol. 20, p. 81-94, 2013.

CHONGKHONG, S.; TONGURAI, C.; CHETPATTANANONDH, P.; BUNYAKAN, C.. Biodiesel Production by Esterification of Palm Fatty Acid Distillate. **Biomass and Bioenergy**. vol. 31, p. 563-568, 2007.

CORMA, A.. From Microporous to Mesoporous Molecular Sieve Materials and their Use in Catalysis. **Chemical. Reviews**. vol. 97, p. 2373-2419, 1997.

CORSINI, M. S.; JORGE, N.. Estabilidade Oxidativa de Óleos Vegetais Utilizados em Frituras de Mandioca Palito Congelada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol. 36, p. 27-32, 2006.

CREMONEZ, P. A.; FEIDEN, A.; CREMONEZ, F. E.; ROSSI, E.; ANTONELLI, J.; NADALETI, W. C.; TOMASSONI, F.. Nabo Forrageiro: do cultivo a produção de biodiesel. **Acta Iguazu**, vol. 2, p. 64-72, 2013.

CULLITY, B. D.; STOCK, S. R. **Elements of X-Ray Diffraction**. 2 ed. Prentice Hall: New Jersey, 2001.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F.. Evaluation of the Catalytic Properties of *Burkholderia cepacia* Lipase

Immobilized on Non-Commercial Matrices to be Used in Biodiesel Synthesis from Different Feedstocks. **Bioresource Technology**. vol. 101, p. 5508-5516, 2010.

DAMBISKI, L.; Synthesis of Biodiesel from Fodder Radish Oil Employing Supercritical Methanol. **Federal Technical of Parana**, Brazil, 2007.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S.. Enzyme Immobilization: an Overview on Techniques and Support Materials. **Biotech**. vol. 3, p. 1-9, 2013.

DEERE, J.; MAGNER, E.; WALL, J. G.; HODNETT, B. K.. Adsorption and Activity onto Mesoporous Silica. **Catalysis Letters**. vol. 85, p. 19-23, 2003.

DOMINGOS, A. K.; SAAD, E. B., WILHELM, H. M.; RAMOS, L. P. Optimization of the Ethanolysis of Raphanus sativus (L Var.) Crude Oil Applying the Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**. vol. 99, p. 1837-1845, 2008.

EMBRAPA,

<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fbl23vn002wx5eo0sawqe38tspejq.html>> Acesso em: 06 jun. 2014.

ERGÜN, A. N.; KOCABAŞ, Z. O.; BAYSAL, M.; YÜRÜM, A.; YÜRÜM, Y.. Synthesis of Mesoporous MCM-41 Materials with Low-Power Microwave Heating. **Chemical Engineering Communication**. vol. 200, p. 1057-1070, 2013.

FILLIÈRES, R.; BENJELLOUN-MLAYAH, B.; DELMAS, M.. Ethanolysis of Rapeseed Oils: Quantitation of Ethyl Esters, Mono, Di-, and Triglycerides and Glycerol by High-Performance Size-Exclusion Chromatography. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. vol. 72, p. 427-432, 1995.

FORESTI, M.L. FERREIRA, M. L.. Chitosan-Immobilized Lipases for the Catalysis of Fatty Acid Esterification. **Enzyme Microbiology Technology**. vol. 40, p. 769-777, 2007.

FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L.. Variables Affecting the Yields of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, vol. 61, p. 1638-1643, 1984.

GAO, S.; WANG, Y.; DIAO, X.; LUO, G.; DAI, Y.. Effect of Pore Diameter and Cross-Linking Method on the Immobilization Efficiency of *Candida rugosa* Lipase in SBA-15. **Bioresource Technology**. vol. 101, p. 3830-3837, 2010.

GIRALDO, L. F.; LÓPEZ, L.; PÉREZ, URREGO, S.; SIERRA, L.; MESA, M.. Mesoporous Silica Applications. **Macromolecular Symposia**, vol. 258, p. 129-141, 2007.

GRÜN, M.; UNGER, K. K.; MATSUMOTO, A.; TSUTSUMI, K.. Novel Pathways for the Preparation of Mesoporous MCM-41 Materials: Control of Porosity and Morphology. **Microporous and Mesoporous Materials**, vol. 27, p. 207-216, 1999.

GUSTAFSSON, H.; JOHANSSON, E. M.; BARRABINO, A.; ODÉN, M.; HOLMBERG. Immobilization of Lipase from *Mucor miehei* and *Rhizopus oryzae* into Mesoporous Silica-The Effect of Varied Particle Size and Morphology. **Colloids and Surfaces B:Biointerfaces**. vol. 100, p. 22-30, 2012.

HAMMOND, W.; PROUZET, E.; MAHANTI, S. D.; PINNAVAIA, T. J.. Structure Factor for the Periodic Walls for Mesoporous MCM-41 Molecular Sieves. **Microporous and Mesoporous Materials**. vol. 27, p. 19-25, 1999.

HARTMAN, M.; KOSTROV, X.. Immobilization of Enzymes on Porous Silicas-Benefits and Challenges. **Chemical Society Reviews**. vol. 42, p. 6277-6289, 2013.

HARTMANN, L.; LAGO, R.C.A.. Rapid Preparation of Fatty Acid Methyl Esters from Lipids. **Laboratory Practices**. vol. 22, p. 475-477, 1973.

HARTMANN, M.. Ordered Mesoporous Materials for Bioadsorption and Biocatalysis. **Chemistry of Materials**. vol. 17, p. 4577-4593, 2005.

HARTMANN, M.; JUNG, D.. Biocatalysis with Enzymes Immobilized on Mesoporous Hosts: The Status Quo and Future Trends. **Journal of Materials Chemistry**. vol. 20, p. 844-857, 2010.

HOLMES, S. M.; ZHOLOBENKO, V. L.; THURSFIELD, A.; PLAISTED, R. J.; CUNDY, C. S.; DWYER, J.. In Situ Study of the Formation of MCM-41. **Journal of Chemistry Society, Faraday Transaction**. vol. 94, p. 2025-2032, 1998.

HU, Y., TANG, S.; JIANG, L.; ZOU, B.; YANG, J.; HUANG, H.. Immobilization of *Burkholderia cepacia* on Functionalized Ionic Liquids Modified Mesoporous Silica SBA-15. **Process Biochemistry**. vol. 47, p. 2291-2299, 2012.

HUDSON, S.; COONEY, J.; MAGNER, E.. Protein in Mesoporous Silicates. **Angewandte Chemie International Edition**, 2008.vol. 47, p. 8582-8594, 2008.

HUKKAMÄKI, J.; SUVANTO, S.; SUVANTO, M.; PAKKANEN, T. T.. Influence of the Pore Structure of MCM-41 and SBA-15 Silica Fibers on Atomic Layer Chemical Vapor Deposition of Cobalt Carbonil. **Langmuir**. vol. 20, p. 10288-10295, 2004.

HUMPHREY, H. P.; WRIGHT, P. A.. Enzymes Supported on Ordered Mesoporous Solids: a Special Case of an Inorganic-Organic Hybrid. **Journal of Materials Chemistry**. vol. 15, p. 3690-3700, 2005.

HUO, Q.; MARGOLESE, D. I.; CIESLA, U.; DEMUTH, D. G.; FENG, P.; GIER, T. E.; SIEGER, P.; FIROUZI, A.; CHMELKA, B. F.; SCHUTH, F.; STUCKY, G. D.. Organization of Organic Molecules with Inorganic Molecular Species into Nanocomposite Biphase arrays. **Chemistry of Materials**. vol. 6, p. 1176-1191, 1994.

HUO, Q.; MARGOLESE, D. I.; CIESLA, U.; DEMUTH, D. G.; FENG, P.; GIER, T. E.; SIEGER, P.; FIROUZI, A.; CHMELKA, B. F.; SCHUDT, F.; STUCKY, G. D.. Organization of Organic Molecules with Inorganic Molecular Species into Nanocomposite Biphase Array. **Chemistry of Materials**. vol. 6, p. 1176-1191, 1994.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L.. Enzyme Stability and Stabilization-Aqueous and Non-Aqueous Environment. **Process Biochemistry**. vol. 43, p. 1019-1032, 2008.

JACOBY, J.; PASC, A.; CARTERET, C.; DUPIRE, F.; STÉBÉ, M. J.; COUPARD, V. BLIN, J. L.. Ordered Mesoporous Materials Containing Mucor Mihei Lipase as Biocatalyst for Transesterification Reaction. **Process Biochemistry**. vol. 48, p. 831-837, 2013.

JEGANNATHAN, K. R.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P.. Physical and Stability Characteristics of Burkholderia cepacia Lipase Encapsulated in K-Carrageenan. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**. vol. 58, p. 78-83, 2009.

KANG, Y.; HE, J.; GUO, X.; GUO, X.; SONG, Z.. Influence of Pore Diameters on Immobilization of Lipase in SBA-15. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. vol. 46, p. 4474-4479, 2007.

KATIYAR, M.; ALI, ALI, A.. Immobilization of Candida rugosa Lipase on MCM-41 for the Transesterification of Cotton Seed Oil. **Journal of Oleo Science**. vol. 61, p. 469-475, 2012.

KRIMM, S.; LIANG, C. Y.; SUTHERLAND, Infrared Spectra of High Polymers. II. Polyethylene. **The Journal of Chemical Physics**. vol. 25, p. 549-562, 1956.

KRISHNAKUMAR, J.; VENKATACHALAPATHY, V. S. K.; ELANCHELIYAN. Technical Aspects of Biodiesel Production from vegetable Oils. **Thermal Science**. vol. 12, p. 159-169, 2008.

LEE, C. H.; LANG, YEN, C. W.; SHIH, P. C.; LIN, T. S.; MOU, C. Y.. Enhancing Stability and Oxidation Activity of Cytochrome c by Immobilization in the Nanochannels of Mesoporous Aluminosilicates. **The Journal of Physical Chemistry B**. vol. 109, p. 12277-12286, 2005.

LEE, C. H.; LIN, T. S.; MOU, C. Y.. Mesoporous Materials for Encapsulating Enzymes. **Nano Today**. vol. 4, p. 165-179, 2009.

LEI, J.; FAN, J.; YU, C.; ZHANG, JIANG, S.; TU, B.; ZHAO, D.. Immobilization of Enzymes in Mesoporous Materials: Controlling the Entrance to Nanospace. **Microporous and Mesoporous Materials**. vol. 73, p. 121-128, 2004.

LI, X.; HUANG, S.; XU, L.; YAN, Y.. Conformational and Catalytic Properties Studies of *Candida rugosa* Lip7 via Enantioselective Esterification of Ibuprofen in Organic Solvents and Ionic Liquids. **The Scientific World Journal**. vol. 2013, p. 2-7, 2013.

LI, Y.; GAO, F.; WEI, W.; QU, J. B.; MA, G. H.; ZHOU, W. Q.. Pore Size of Macroporous Microspheres Affects Lipase Immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 66, p. 182-189, 2010.

LI, Y.; SUN, N.; LI, L.; ZHAO, N.; XIAO, F.; WEI, W.; SUN, Y.; HUANG, W.. Grafting of Amines on Ethanol-Extracted SBA-15 for CO₂ Adsorption. **Materials**. vol. 6, p. 981-999, 2013.

LIMA, J. D.; ALDRIGHI, M.; SAKAI, R. K.; SOLIMAN, E. P.; MORAES, W. S.. Comportamento do Nabo Forrageiro (*Raphanus sativus* L.) e da Nabiça (*Raphanus raphanistrum* L.) como adubo Verde. Pesquisa Agropecuária **Tropical**. vol. 37, p. 60-63, 2007.

LLEWELLYN, P. L.; GRILLET, Y.; SCHUT, F.; REICHERT, H.; UNGER, K. K.. Effect of Pore Size on Adsorbate Condensation and Hysteresis within a Potential Model Adsorbent: M41S. **Microporous Materials**. vol. 3, p. 345-349, 1994.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S.. Biodiesel: Parâmetros de Qualidade e Métodos Analíticos. **Química Nova**. vol. 32, p. 1596-1608, 2009.

LUIĆ, M.; ŠTEFANIĆ, Z.; CEILINGER, I.; HODOSČEK, M.; DUŠANKA, J.; LENAC, T.; ASLER, I. L.; ŠEPAC, D.; TOMIĆ, S.. Combined X-ray Diffraction and QM/MM Study of the Burkholderia cepacia Lipase-Catalyzed Secondary Alcohol Esterification. **The Journal of Physical Chemistry B**. vol. 112, p. 4876-4883, 2008.

MA, F.; HANNA, M. A.. Biodiesel Production: A Review; **Bioresource Technology**. vol. 70, p. 1-15, 1999.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.. Lipases Microbianas na Produção de Ésteres Formadores de Aromas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. vol. 17, p. 115-119, 1997.

MARLER, B.; OBERHGEMANN, U.; VORTMANN, S.; GIES, H.. Influence of the Sorbate on the XRD Peak Intensities of Loaded MCM-41. **Microporous Materials**. vol. 6, p. 375-383, 1996.

MESSIAS, J. M.; DA COSTA, B. Z.; DE LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.. Lipases Microbianas: Produção, Propriedades e Aplicações Biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. v. 32, p. 213-234, 2011.

MITCHELL, S.; PÉREZ-RAMIREZ, J. Mesoporous Zeolites as Enzyme Carriers: Synthesis, Characterization, and Application in Biocatalysis. **Catalysis Today**. vol. 168, p. 28-37, 2011.

MOSER, B.. Biodiesel Production, Properties, and Feedstocks. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. vol. 45, p. 229-266, 2009.

MURAI, K.; NANOYAMA, T.; SAITO, T.; KATO, K.. Enzyme Structure and Catalytic Properties Affected by the Surface Functional Groups of Mesoporous Silica. **Catalysis Science and Technology**. vol. 2, p. 310-315, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M., 2002. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. Ed. W. H. Freeman and Company. 955p.

PENCREAC'H, G.; BARATTI, J. C.; Properties of Free and Immobilized Lipase from Burkholderia cepacia in Organic Media. **Applied Microbiology Biotechnology**. vol. 52, p. 276-280, 1999.

RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S.. Tecnologias de Produção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química**. vol. 3, p. 385-405, 2011.

REBELO, L. P.; NETTO, C. G. C.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H.. Enzymatic Kinetic Resolution of (RS)-1-(Phenyl)Ethanol by *Burkholderia cepacia* Lipase Immobilized on Magnetic Nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. vol. 21, p. 1537-1542, 2010.

SALIS, A.; BHATTACHARYA, M. S.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V.. Role of the Support Surface on the Loading and the Activity of *Pseudomonas fluorescens* Used for Biodiesel Synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 57, p. 262-269, 2009.

SERRA, E.; MAYORAL, A.; SAKAMOTO, Y.; BLANCO, R. M.; DÍAZ, I.. Immobilization of Lipase in Ordered Mesoporous Materials: Effect of Textural and Structural Parameters. **Microporous and Mesoporous Materials**. vol. 114, p. 201-213, 2008.

SCALERA, E.; BALLEM, M. A.; CÓRDOBA, J. M.; ANTTI, M. L.; ODÉN, M.. Synthesis of Homogeneously Dispersed Cobalt Nanoparticles in the Pores of Functionalized SBA-15 Silica. **Powder Technology**. vol. 221, p. 359-364, 2012.

SCHMAL, M.. **Catálise Heterogênea**. Synergia, 2011.

SCHMID, R. D.; VERGER, R.. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. **Angewandte Chemie International Edition**. vol. 37, p. 1608-1633, 1998.

SCHWANKE, A. J.; MELO, D. M. A.; SILVA, PERGHER, S. B. C.. Use of Rice Husk Ash as only Source Silica in the Formation of Mesoporous Materials. **Cerâmica**. vol. 59, p. 181-185, 2013.

SCHWANKE, A. J.; PERGHER, S. B. C. Peneiras Moleculares Mesopórosas MCM-41: Uma Perspectiva Histórica, o Papel de cada Reagente na Síntese e sua Caracterização Básica. **PERSPECTIVA, Erechim**. vol. 36, p. 113-125, 2012.

SERRA, E.; MAYORAL, A.; SAKAMOTO, Y.; BLANCO, R. M.; DÍAZ, I.. Immobilization of Lipase in Ordered Mesoporous Materials: Effect of Textural and Structural Parameters. **Microporous and Mesoporous Materials**. vol. 114, p. 201-213, 2008.

SHAH, S.N.; IHA, O. K.; ALVES, F. C. S. C.; SUAREZ, P. A. Z.. Potential Application of Turnip Oil (*Raphanus sativus* L.) for Biodiesel Production: Physical-Chemical

Properties of Neat Oil, Biofuels and their Blends with Ultra-Low Sulphur Diesel (ULSD). **Bioenergy Resource**, vol. 6, p. 841-850, 2013.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y.. Enzymatic Alcoholysis for Biodiesel Fuel Production and Application of the Reaction to Oil Processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 76, p. 133-142, 2002.

SING, K. S. W.; EVERETT, D. H.; HAUL, R. A. W.; MOSCOU, L.; PIERROTTI, R. A.; ROUQUEROL, J.; SIEMIENIEWSKA, T.. Reporting Physisorption Data for Gas/Solid System. **International Union of Pure and Applied Chemistry**. vol. 57, p. 603-619, 1985.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN G. M.. Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore Silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. vol. 77-79, p. 745-757, 1999.

SOARES, C. M. F.; DOS SANTOS, O. A.; OLIVO, J. E.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M.. Influence of the Alkyl-Substituted Silane Precursor on Sol-Gel Encapsulated Lipase Activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 29, p. 69-79, 2004.

SOARES, C. M.; ITAVO, L. C. V.; DIAS, A. M.; ARRUDA, E. J.; DELBEN, A. A. S. T.; OLIVEIRA, S. L.; OLIVEIRA, L. C. S.. Forage Turnip, Sunflower, and Soybean Biodiesel obtained by Ethanol Synthesis: Production Protocols and Thermal Behavior. **Fuel**. vol. 89, p. 3725-3729, 2010.

SPAHN, C.; MINTEER, S. D.. Enzyme Immobilization in Biotechnology. **Recent Patents on Engineering**, vol. 2, p. 195-200, 2008.

STAMENKOVIĆ, O. S.; VELICKOVIC, A. V.; VELJKOVIC, A. B.; The Production of Biodiesel from Vegetable Oils by Ethanolysis: Current State and Perspectives. **Fuel**. vol. 90, p. 3141-3155, 2011.

STOYTICHEVA, M.; MONTERO, G.; TOSCANO, L.; GOCHEV, V.; VALDEZ, B.. The Immobilized Lipases in Biodiesel Production. **Feedstocks and Processing Technologies**. 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/biodiesel-feedstocks-and-processing-technologies/the-immobilized-lipasesin-biodiesel-production>. Acessado em: 20 jun. 2014.

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B.. Biocombustíveis a partir de Óleos e Gorduras: Desafios Tecnológicos para Viabilizá-los. **Química Nova**. vol. 32, p. 768-775, 2009.

SZCZYPA, J.; KAJDEWICZ, I.; KOSMULSKI, M.. Effect of n-Alcohols on the Electric Double Layer Formed on the Surface of Controlled Pore Glass. **Journal of Colloid and Interface Science**. vol. 137, 157-162, 1989.

TAHER, H.; AL-ZHUAIR, S.; AL-MARZOUQI, A. H.; HAIK, Y.; FARID, M. M.. A Review of Enzymatic Transesterification of Microalgal Oil-Based Biodiesel Using Supercritical Technology. **Enzyme Research**. vol. 2011, p. 1-25, 2011.

TAMALAMPUDI, S.; TALUKDER, M. R.; HAMA, S.; NUMATA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H.. Enzymatic Production of Biodiesel from Jatropha Oil: a Comparative Study of Immobilized-Whole Cell and Commercial Lipases as a Biocatalyst. **Biochemical Engineering Journal**. vol. 39, p. 185-189, 2008.

THAKUR, S.. Lipases, its Sources, Properties and Applications: A Review. **International Journal of Scientific & Engineering Research**. vol. 3, p. 1-29, 2012.

THOMMES, M.; KHON, R.; FROBA, M.. Sorption and Pore Condensation Behavior of Pure Fluids in Mesoporous MCM-48 Silica, MCM-41 Silica, SBA-15 Silica and Controlled-Pore Glass at Temperatures Above and Below the Bulk Triple Point. **Applied Surface Science**,. vol. 196, p. 239-249, 2002.

THÖRN, C.; GUSTAFSSON, H.; OLSSON, L.. Immobilization of Feruloyl Esterases in Mesoporous Materials Leads to Improve Transesterification Yield. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 72, p. 57-64, 2011.

TOMIĆ, S.; KOJIĆ-PRODIĆ, B.. A Quantitative Model for Predicting Enzyme Enantioselectivity: Application to Burkholderia cepacia Lipase and 3-(ariloxy)-1,2-propanediol Derivatives. **Journal of Molecular Graphics and Modeling**. vol. 21, p. 241-252, 2002.

TREVISAN, H. C.; MEI, L. H. I.; ZANIN, G. M.. Preparation of Silica with Controlled Pore Sizes for Enzyme Immobilization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. vol. 17, p. 71-77, 2000.

TRODLER, P.; SCHIMID, R. D.; PLEISS, J.. Modeling of Solvent-Dependent Conformational Transitions in Burkholderia cepacia Lipase. **BMC Structural Biology**. vol. 9, p. 1-13, 2009.

VALLE, P.; VELEZ, A.; HEGEL, P.; MABE, G.; BRIGNOLE, E. A.. Biodiesel Production Using Supercritical Alcohols with Non-Edible Vegetable Oil in a Batch Reactor. **The Journal of Supercritical Fluids**. vol 54, p. 61-70, 2010.

VILLENEUVE, P.. Lipases in Lipophilization Reactions. **Biotechnology Advances**. vol. 25, p. 515-536, 2007.

VINU, A.; MURUGESAN, V.; TANGERMANN, O.; HARTMAN, M.. Adsorption of Cytochrome c on Mesoporous Molecular Sieves: Influence of pH, Pore Diameter, and Aluminium Incorporation. **Chemistry of Materials**. vol. 16, p. 3056-3065, 2004.

VISENTAINER, J. V., FRANCO, M. R. B., 2006, **Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação**, Ed. Varela, São Paulo, 120p.

VISENTAINER, J. V.. Aspectos Analíticos da Resposta do Detector de Ionização em Chamas para Ésteres de Ácidos Graxos em Biodiesel e Alimentos. **Química Nova**. vol. 35, p. 274-279, 2012.

WAN, Y.; ZHAO, D.. On the Controllable Soft-Templating Approach to Mesoporous Silicates. **Chemical Reviews**. vol. 107, p. 2821-2856, 2006.

WEETALL, H. H.. Trypsin and Papain Covalently Coupled to Porous Glass: Preparation and Characterization. **Science**. vol. 166, p. 615-617, 1969.

YIU, H. H. P.; WRIGHT, P. A.; BOTTING, N. P.. Enzyme Immobilization Using Siliceous Mesoporous Molecular Sieves. **Microporous and Mesoporous Materials**. vol. 44-45, p. 763-768, 2001.

YU, H. H. P.; WRIGHT, P. A.. Enzymes Supported on Ordered Mesoporous Solids: A Special Case of an Organic-Inorganic Hybrid. **Journal of Material Chemistry**. vol. 15, p. 3690-3700, 2005.

YU, H.; ZHAI, Q. Z.. Preparation and Characterization of (SBA-15)-La₂O₃ Host-Guest Composite Materials. **Journal of Solid State Chemistry**. vol. 181, p. 2424-2432, 2008.

ZHANG, B.; WENG, Y.; XU, H.; MAO, Z.. Enzyme Immobilization for Biodiesel Production. **Applied Microbiology Biotechnology**. vol. 93, p. 61-70, 2012.

ZHAO, D.; FENG, J.; HUO, Q.; MELOSH, N.; FREDRICKSON, G. H.; CHMELKA, B. F.; STUCKY, G. D.. Triblock Copolymer Synthesis of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. **Science**. vol. 279, p. 548-552, 1998a.

ZHAO, D.; HUO, Q.; FENG, J.; CHMELKA, B. F.; STUCKY, G. D.. Nonionic Triblock and Star Diblock Copolymer and Oligomeric Surfactant Synthesis of Highly Ordered, Hydrothermally Stable, Mesoporous Silicates Structure. **Journal of American Chemical Society**. vol. 120, p. 6024-6036, 1998b.

ZHAO, D.; SUN, J.; LI, Q.; STUCKY, G. D.. Morphological Control of Highly Ordered Mesoporous Silica SBA-15. **Chemistry of Materials**. v. 12, p. 275-279, 2000.

ZHAO, X. S.; LU, G. Q.; MILLAR, G.. Advances in Mesoporous Molecular Sieves MCM-41. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. vol. 35, p. 2075-2090, 1996.

ZHENG, L.; ZHANG, S.; ZHAO, L.; ZHU, G.; YANG, X.; GAO, G.; CAO, S.. Resolution of N-(2-ethyl-6-methylphenyl)alanine via Free and Immobilized Lipase from *Pseudomonas cepacia*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 38, p. 119-125, 2006.

ZHOU, Z.; HARTMANN, M.. Progress in Enzyme Immobilization in Ordered Mesoporous Materials and Related Applications. **Chemical Society Reviews**. vol. 42, p. 3894-3912, 2013.

ZOU, B.; YU, D.; XIA, J.; TANG, S.; LIU, W.; HUANG, H.. Immobilization of Porcine Pancreatic Lipase onto Ionic Liquid Modified Mesoporous Silica SBA-15. **Biochemical Engineering Journal**. vol. 53, p. 150-153, 2010.