

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

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS PELA TRANSESTERIFICAÇÃO DOS  
ÓLEOS DE CANOLA E PINHÃO MANSO EM REATORES BATELADA E DE  
LEITO FIXO COM ENZIMA LIPASE IMOBILIZADA**

**LEANDRO DANIEL DE PARIS**

Maringá, Agosto de 2013

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

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS PELA TRANSESTERIFICAÇÃO DOS  
ÓLEOS DE CANOLA E PINHÃO MANSO EM REATORES BATELADA E DE  
LEITO FIXO COM ENZIMA LIPASE IMOBILIZADA**

Leandro Daniel De Paris

Engenheiro Químico, UNIOESTE, 2005.

Mestre em Engenharia Química, UNIOESTE, 2008.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gisella Maria Zanin (DEQ/UEM)

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor na área de Desenvolvimento de Processos, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá.

Maringá, Agosto de 2013

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária  
UNIOESTE/Campus de Toledo.  
Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

P232p Paris, Leandro Daniel De  
Produção de ésteres etílicos pela transesterificação dos óleos de canola e pinhão manso em reatores batelada e de leito fixo com enzima lipase imobilizada / Leandro Daniel de Paris. -- Toledo, PR : [s. n.], 2009.  
xv , 114 f. : il. (algumas color.), figs., tabs,  
  
Orientadora: Profa. Dra. Gisella Maria Zanin  
Tese (doutorado em Engenharia Química) -Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2013.  
  
1. Engenharia química – Teses 2. Biodiesel 3. Esterificação (Química) 4. Ésteres 5. Transesterificação 6. Enzimas 7. Lipases 8. Imobilização de enzimas 9. Energia – Fontes alternativas 10. Óleo de canola 11. Óleo de pinhão manso I. Zanin, Gisella Maria, orient. II. T


CDD 20. ed. 660.2842  
665.3

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

Esta é a versão final da tese de doutorado apresentado por Leandro Daniel De Paris perante a Comissão Julgadora como parte integrante dos requisitos ao Doutorado em Engenharia Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gisella Maria Zanin  
Orientadora / Presidente

  
Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli  
Membro

  
Prof. Dr. Salah Din Mahmud Hasan  
Membro

  
Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes  
Membro

  
Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo  
Membro

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida pela força e proteção nesta caminhada.

À professora Gisella Maria Zanin, pela oportunidade de participar de sua equipe, e pelo apoio e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Ao professor Flávio Faria de Moraes, pela grande ajuda no desenvolvimento dos trabalhos do grupo.

Às professoras Cleide Soares e Heizir de Castro, e suas equipes de pesquisadores, pela valiosa troca de experiência e informações.

Aos professores Pedro Augusto Arroyo e Lúcio Cardozo Filho, e às suas equipes de pesquisadores, pela contribuição nas atividades realizadas.

Aos grandes amigos e companheiros João Henrique e Carlos Eduardo. Todos os trabalhos que realizamos juntos foram de grande importância para o entendimento e desenvolvimento desta tese.

Aos engenheiros Lauro e Luiza, do Laboratório de Tecnologia Enzimática, do Departamento de Engenharia Química da UEM. Seu auxílio e paciência foram fundamentais neste trabalho.

À Marilza Neri, pelos bons momentos de convivência durante estes anos.

Ao aluno Ricardo Carminatti, pela ajuda na realização das atividades de laboratório.

Aos colaboradores técnicos do Departamento de Química da UEM, pelo apoio prestado na execução dos experimentos.

À CAPES pelo apoio financeiro ao projeto (Programa Pró-engenharias, processo 23038-028317/2008-44).

E um agradecimento especial aos meus pais Orlando e Marta, aos meus irmãos Lucas e Junior, que sempre confiaram e apoiaram as minhas escolhas. E à minha noiva Fabiana, que passou todos os nossos momentos difíceis ao meu lado, sempre me incentivando.

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>x</b>
<b>NOMENCLATURA</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Objetivo geral.....	4
1.2. Objetivos específicos .....	4
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
2.1. Enzimas.....	5
2.2. Enzima lipase .....	6
2.2.1. Mecanismo de ação das lipases.....	9
2.2.2. Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> .....	11
2.3. Enzimas imobilizadas .....	12
2.3.1. Imobilização de lipases.....	13
2.4. Imobilização por ligação covalente ao suporte ou ligação cruzada .....	16
2.5. Imobilização em matriz polimérica ou em cápsulas.....	16
2.6. Imobilização por adsorção .....	17
2.7. Imobilização de enzimas pelo método sol-gel .....	18
2.8. Biodiesel.....	24
2.9. Reações de transesterificação .....	24
2.9.1. Outras reações empregadas na obtenção de biodiesel.....	26
2.10. Perspectivas de consumo de biodiesel.....	27
2.11. Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel .....	28
2.11.1. Álcoois utilizados na síntese de biodiesel por transesterificação .....	33
2.12. Propriedades do biodiesel .....	34
2.13. Fatores que influenciam a síntese de biodiesel por rota enzimática.....	38
2.13.1. Influência dos álcoois empregados na transesterificação enzimática .....	39
2.14. Reações de transesterificação utilizando lipase imobilizada .....	41
2.15. Produção enzimática de biodiesel em sistema contínuo .....	44
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
3.1. Materiais.....	47

3.1.1. Equipamentos.....	47
3.1.2. Reagentes e substratos.....	48
3.2. Imobilização pelo método sol-gel .....	48
3.2.1. Imobilização da enzima com precursor TEOS .....	49
3.2.2. Imobilização da enzima com precursor TMOS .....	50
3.3. Métodos analíticos.....	50
3.3.1. Determinação do índice de acidez.....	50
3.3.2. Determinação do teor de umidade pelo método Karl Fischer .....	51
3.3.3. Caracterização da enzima livre e imobilizada .....	52
3.3.4. Determinação do teor de proteína da enzima livre .....	52
3.3.5. Determinação da atividade hidrolítica por método titulométrico empregando azeite de oliva como substrato.....	52
3.3.6. Determinação da atividade de esterificação pelo teor de ácido butírico .....	53
3.3.7. Determinação da atividade de transesterificação pela produção de 2-fenetil acetato .....	54
3.3.8. Análise de composição das amostras por CLAE obtidas da transesterificação dos óleos de canola e pinhão manso .....	55
3.3.9. Métodos de caracterização físico-química e morfológica das matrizes e da enzima imobilizada.....	55
3.3.9.1. Caracterização textural da enzima imobilizada.....	56
3.3.9.2. Microscopia eletrônica de varredura .....	56
3.3.9.3. Análise termogravimétrica e de calorimetria exploratória diferencial .....	56
3.3.10. Reação de transesterificação em reator batelada.....	56
3.3.11. Reação de transesterificação em reator de leito fixo.....	57
3.3.12. Cálculo do rendimento em ésteres .....	58
3.3.13. Cálculo da atividade de consumo dos triacilgliceróis .....	58
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
4.1. Determinação da atividade hidrolítica, de esterificação e de transesterificação da enzima livre.....	59
4.2. Determinação da atividade de esterificação da enzima imobilizada.....	59
4.3. Determinação da atividade de transesterificação da enzima livre e imobilizada e recuperação da atividade.....	60
4.4. Caracterização textural da enzima imobilizada.....	61
4.5. Microscopia eletrônica de varredura .....	62

4.6. Análise termogravimétrica e de calorimetria exploratória diferencial .....	64
4.7. Produção de ésteres etílicos em reator batelada com a enzima livre.....	68
4.8. Produção de ésteres etílicos a enzima imobilizada.....	81
4.8.1. Quantificação e identificação dos produtos da transesterificação enzimática.....	87
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>89</b>
<b>6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS .....</b>	<b>92</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>110</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Representação esquemática das reações catalisadas por lipases .....	7
<b>Figura 2.2</b> Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica .....	8
<b>Figura 2.3.</b> Mecanismo de ação catalítica da lipase.....	10
<b>Figura 2.4.</b> Representação esquemática de um possível complexo tetraédrico enzima-substrato para uma reação de hidrólise de um éster ou transesterificação de um álcool catalisada por uma lipase de <i>Candida rugosa</i> .....	10
<b>Figura 2.5.</b> Mecanismo de ativação interfacial de lipases em interfaces hidrofóbicas; equilíbrio entre as diferentes conformações de lipases em meios aquosos homogêneos .....	11
<b>Figura 2.6.</b> Estrutura geral da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> . .....	12
<b>Figura 2.7.</b> Métodos de imobilização enzimática .....	18
<b>Figura 2.8.</b> Esquema da transição sol-gel; formação do particulado e do gel polimérico .....	21
<b>Figura 2.9.</b> Reações envolvidas na transesterificação de triacilgliceróis.....	25
<b>Figura 2.10.</b> Reação de esterificação de ácidos graxos.....	26
<b>Figura 2.11.</b> Planta e sementes do pinhão manso .....	31
<b>Figura 3.1.</b> Métodos de imobilização empregados para a lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> ...	48
<b>Figura 4.1.</b> Micrografias dos suportes e biocatalisadores imobilizados com os precursores TEOS e TMOS e secos por evaporação e em meio supercrítico.....	63
<b>Figura 4.2.</b> Curvas termogravimétricas das matrizes e da enzima imobilizada .....	66
<b>Figura 4.3.</b> Curvas de calorimetria exploratória diferencial das matrizes e da enzima imobilizada .....	67
<b>Figura 4.4.</b> Resíduos do modelo para rendimento em ésteres etílicos para o óleo de canola	70
<b>Figura 4.5.</b> Rendimento em ésteres para o óleo de canola (temperatura e razão molar) .....	70
<b>Figura 4.6.</b> Rendimento em ésteres para o óleo de canola (temperatura e quantidade de enzima) .....	71
<b>Figura 4.7.</b> Resíduos do modelo para $A_{CT}$ para o óleo de canola .....	73
<b>Figura 4.8.</b> $A_{CT}$ para o óleo de canola (razão molar e temperatura) .....	73
<b>Figura 4.9.</b> $A_{CT}$ para o óleo de canola (quantidade de enzima e temperatura) .....	74
<b>Figura 4.10.</b> Resíduos do modelo para rendimento em ésteres etílicos para o óleo de pinhão manso .....	76
<b>Figura 4.11.</b> Rendimento em ésteres etílicos para o óleo de pinhão manso (temperatura e razão molar) .....	77

<b>Figura 4.12.</b> Rendimento em ésteres etílicos para o óleo de pinhão manso (temperatura e quantidade de enzima) .....	77
<b>Figura 4.13.</b> Resíduos do modelo para $A_{CT}$ para o óleo de pinhão manso.....	79
<b>Figura 4.14.</b> $A_{CT}$ para o óleo de pinhão manso (razão molar e temperatura).....	79
<b>Figura 4.15.</b> $A_{CT}$ para o óleo de pinhão manso (quantidade de enzima e temperatura) .....	80
<b>Figura 4.16.</b> Rendimento em ésteres na transesterificação do óleo de canola e etanol catalisada por lipase imobilizada em matriz sol-gel (batelada) .....	82
<b>Figura 4.17.</b> Rendimento em ésteres na transesterificação do óleo de pinhão manso e etanol catalisada por lipase imobilizada em matriz sol-gel (batelada) .....	82
<b>Figura 4.18.</b> Rendimento em ésteres na transesterificação do óleo de canola e etanol catalisada por lipase imobilizada em matriz sol-gel (leito fixo) .....	85
<b>Figura 4.19.</b> Rendimento em ésteres na transesterificação do óleo de pinhão manso e etanol catalisada por lipase imobilizada em matriz sol-gel (leito fixo) .....	85
<b>Figura 4.20.</b> Identificação e quantificação dos produtos da transesterificação enzimática dos óleos de canola e pinhão manso na presença de etanol .....	87

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Exemplos de aplicações industriais de lipase .....	9
<b>Tabela 2.2</b> Composição em ácidos graxos do óleo de canola .....	30
<b>Tabela 2.3.</b> Composição química em ácidos graxos do óleo de pinhão manso.....	31
<b>Tabela 2.4.</b> Análise físico-química do óleo de pinhão manso .....	32
<b>Tabela 2.5.</b> Principais matérias primas usadas na produção de biodiesel .....	32
<b>Tabela 2.6.</b> Percentual do conteúdo de óleo de oleaginosas.....	33
<b>Tabela 2.7.</b> Vantagens e desvantagens do metanol e etanol na produção do biodiesel .....	33
<b>Tabela 2.8.</b> Padrões de qualidade do biodiesel .....	35
<b>Tabela 2.9.</b> Comparação entre o processo enzimático e o processo alcalino para a produção de biodiesel.....	42
<b>Tabela 2.10.</b> Exemplos da produção do biodiesel em diferentes condições utilizando lipases .....	43
<b>Tabela 4.1.</b> Atividades hidrolítica e de esterificação da lipase livre .....	59
<b>Tabela 4.2.</b> Atividade de esterificação da enzima imobilizada .....	60
<b>Tabela 4.3.</b> Atividade de transesterificação da enzima livre e imobilizada .....	60
<b>Tabela 4.4.</b> Caracterização textural da lipase imobilizada em matrizes hidrofóbicas sol-gel	61
<b>Tabela 4.5.</b> Matriz do planejamento para a transesterificação etílica do óleo de canola .....	68
<b>Tabela 4.6.</b> Estimativa dos efeitos para o rendimento em ésteres etílicos do óleo de canola	69
<b>Tabela 4.7.</b> Análise de variância do rendimento em ésteres etílicos do óleo de canola .....	69
<b>Tabela 4.8.</b> Estimativa dos efeitos para $A_{CT}$ do óleo de canola.....	71
<b>Tabela 4.9.</b> Análise de variância da $A_{CT}$ para o óleo de canola.....	72
<b>Tabela 4.10.</b> Matriz do planejamento para a transesterificação etílica do óleo de pinhão manso .....	75
<b>Tabela 4.11.</b> Estimativa dos efeitos para o rendimento em ésteres etílicos do óleo de pinhão manso .....	75
<b>Tabela 4.12.</b> Análise de variância do rendimento em ésteres etílicos do óleo de pinhão manso .....	76
<b>Tabela 4.13.</b> Estimativa dos efeitos para $A_{CT}$ do óleo de pinhão manso .....	78
<b>Tabela 4.14.</b> Análise de variância da $A_{CT}$ para o óleo de pinhão manso .....	78

## NOMENCLATURA

ABIOVE – Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

$A_{\text{esp}}$  – atividade enzimática específica, por mg de proteína

$A_{\text{est}}$  – atividade enzimática de esterificação

$A_{\text{trans}}$  – atividade enzimática de transesterificação

$A_{\text{CT}}$  – atividade enzimática para o consumo de triacilgliceróis

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis

ASTM – American Society for Testing and Materials

BSA – albumina de soro bovino

$C$  – concentração de solução titulante ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )

$C_0$  – quantidade inicial de triacilgliceróis presentes na reação (mol)

CFPP – *cold-filter plugging point*

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CNPE – Conselho Nacional de Política Energética

CTMABr - brometo de cetil-trimetilamônio

CP – *cloud point*

DAG - diacilglicerol

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EN – norma europeia

$f$  – concentração da solução titulante para determinação do IA ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )

$F$  – fator do reagente de Karl Fischer ( $\text{mg H}_2\text{O}\cdot\text{mL}^{-1}$  do reagente)

$F_{\text{calc}}$  – valor calculado do teste  $F$

LBC – Lipase de *Burkholderia cepacia*

LI – líquidos iônicos

$m$  – massa da amostra

$m_{\text{enzima}}$  – quantidade de enzima no cálculo de  $A_{\text{CT}}$  (g)

MAG - monoacilglicerol

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MAPTMS -  $\gamma$ -(metacriloxipropil)-trimetoxisilano

MEV – microscopia eletrônica de varredura

OTES – octil-trietoxisilano

$P$  – massa da amostra de óleo para determinação do IA (g)

PEG - polietilenoglicol

p-NPP – palmitato de p-nitrofenila

PP – *pour point*

$q_{enzima}$  – teor de proteína da enzima no cálculo de  $A_{CT}$  (mg de proteína·g de enzima<sup>-1</sup>)

Q.E. – quantidade de enzima

RANP – Resolução da Agencia Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis

R.M. – razão molar álcool:óleo

RMN – ressonância magnética nuclear

t – tempo de reação (min)

TAG - triacilglicerol

TEOS – tetraetil-ortossilicato

TGA – análise termogravimétrica

TMOS – tetrametil-ortossilicato

V – volume de solução titulante gasto na titulação (mL)

$V_A$  – volume de KOH gasto na titulação de amostra (mL)

$V_B$  – volume de KOH gasto na titulação do controle (mL)

$\alpha$  – inclinação da reta de ajuste dos dados de consumo dos triacilgliceróis em função do tempo de reação

De Paris, Leandro Daniel. Produção de ésteres etílicos pela transesterificação dos óleos de canola e pinhão manso em reator de leito fixo com lipase imobilizada. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, 30 de Agosto de 2013.

## RESUMO

O objetivo geral desse trabalho foi a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em matriz hidrofóbica sol-gel visando à produção de ésteres etílicos pela transesterificação dos óleos de canola e pinhão manso. A enzima foi imobilizada em suportes produzidos com dois diferentes precursores de sílica (TEOS e TMOS), secos em meio supercrítico (aerogel) e por evaporação (xerogel). O resultado da caracterização dos biocatalisadores quanto à atividade de transesterificação mostrou que aqueles obtidos com o precursor TEOS apresentam os maiores valores de atividade, para ambas as secagens (1805 U·g<sup>-1</sup> de biocatalisador para o xerogel e 2028 U·g<sup>-1</sup> de biocatalisador para o aerogel). Visando o desenvolvimento de um processo economicamente mais vantajoso, optou-se pela utilização da enzima imobilizada com TEOS e secagem por evaporação, já que os resultados de atividade foram semelhantes. A caracterização textural dos biocatalisadores (área específica, diâmetro e volume dos poros) também apresentou os maiores valores para os biocatalisadores preparados com TEOS. Na condução dos experimentos para a produção dos ésteres etílicos, foi realizado um planejamento experimental 2<sup>3</sup> completo, com quatro repetições no ponto central, para avaliar as variáveis temperatura, razão molar álcool:óleo e quantidade de enzima, empregando os dois óleos e etanol, e a enzima livre, sem adição de cossolvente. Nenhuma das variáveis foi significativa, num intervalo de confiança de 90%. Porém, os melhores resultados de rendimento em ésteres foram obtidos no ponto central do experimento (temperatura de 50 °C, razão molar álcool:óleo de 9:1 e 7,5% de enzima, em massa, em relação ao óleo). Com a enzima livre, o rendimento médio em ésteres, no ponto central do experimento, foi de 45% para o óleo de canola e de 42,5% para o óleo de pinhão manso. O mesmo planejamento experimental foi utilizado para avaliar a atividade de consumo dos triacilgliceróis presentes no início da reação ( $A_{CT}$ ), calculada pelo método das velocidades iniciais. Todas as variáveis avaliadas foram significativas e, pelos resultados alcançados, verificou-se uma diminuição da  $A_{CT}$  com o aumento da quantidade de etanol, indicando uma inibição da lipase pelo excesso do reagente. Nas condições dos maiores valores de rendimento em ésteres obtidos nos testes do planejamento experimental

com a enzima livre, foram conduzidas reações em batelada com a enzima imobilizada preparada com TEOS. Para temperatura de 50 °C, razão molar álcool:óleo de 9:1 e 7,5% de biocatalisador em relação ao óleo (aproximadamente 6 g) e sem adição de cossolvente, os maiores rendimentos em ésteres foram obtidos após 72h de reação (13,5% para o óleo de canola e 17% para o óleo de pinhão manso). Os baixos rendimentos podem ser justificados pela adsorção do glicerol formado na matriz do biocatalisador. Outra possibilidade é a formação de água no meio reacional, que possibilita o desenvolvimento de reações colaterais deletérias, como a hidrólise. Com o objetivo de aumentar o rendimento em ésteres e remover parte do glicerol adsorvido na matriz, nas reações conduzidas em leito fixo os parâmetros temperatura e razão molar foram mantidos, porém, introduziu-se um aumento na quantidade de enzima imobilizada presente no meio reacional (aproximadamente 13 g) em relação à quantidade de enzima imobilizada empregada nas reações em batelada e adicionou-se n-hexano como cossolvente. Os rendimentos alcançados nesta etapa foram superiores aos rendimentos obtidos com a enzima imobilizada em reator batelada (16% para o óleo de canola, após 72 h de reação e 26% para o óleo de pinhão manso, após 48 h de reação). Este aumento nos rendimentos em ésteres apontam que a maior quantidade de enzima e a adição de cossolvente para as reações conduzidas em leito fixo cumpriu com o objetivo proposto.

Palavras-chave: transesterificação enzimática, imobilização de enzima, produção de ésteres etílicos, óleo de canola, óleo de pinhão manso.

De Paris, Leandro Daniel. Ethyl esters production by transesterification of canola and *Jatropha curcas* oil in fixed bed reactor with immobilized lipase. Doctorate thesis in Chemical Engineering, Post-Graduation Program in Chemical Engineering, State University of Maringá, Maringá-PR, August 30<sup>th</sup>, 2013.

## ABSTRACT

The goal of this work was the immobilization of the lipase from *Burkholderia cepacia* in sol-gel hydrophobic matrix in order to produce ethyl esters by transesterification of canola and *Jatropha curcas* oil. The enzyme was immobilized in supports produced with two different silica precursors (TEOS and TMOS), dried in supercritical conditions (aerogel) and by thermal evaporation (xerogel). The result of the biocatalysts characterization as to the transesterification activity has shown that the preparations obtained with TEOS as precursor had the highest values of activity for both methods of drying (1805 U·g<sup>-1</sup> of biocatalyst for xerogel and 2028 U·g<sup>-1</sup> of biocatalyst for aerogel). Aiming at the development of a more advantageous economical process, it was chosen the use of the immobilized enzyme produced with TEOS and dried by evaporation, since the activity results were of the same order. The textural characterization of the biocatalysts (superficial area, diameter and pore volume) has also presented the highest values for biocatalysts prepared with TEOS. A experimental design 2<sup>3</sup> complete was conducted, with four repetitions in the central point, to evaluate the effects of the variables temperature, molar ratio alcohol:oil and amount of enzyme, using both oils, ethanol and free enzyme without addition of co-solvent. None of the variables was significant, at a confidence level of 90%. However, it was possible to observe that the best results in yield of esters were obtained at the central point of the experiment (temperature of 50 °C, molar ratio alcohol:oil of 9:1 and 7.5% of enzyme, in mass, in relation to oil). With the free enzyme, the average yield of esters in the central point of the experiment was 45% for the canola oil and 42.5% for the *Jatropha curcas* oil. The same experimental design was used to evaluate the triacylglycerols consumption activity at the beginning of the reaction ( $A_{CT}$ ), calculated by the method of initial rates. All the evaluated variables were significant and the results showed an  $A_{CT}$  decrease with an increase of the ethanol amount, indicating lipase inhibition due to excess of this reagent. At the conditions of the highest yields of esters obtained at the test of the experimental design using free enzyme, batch reactions were conducted with the immobilized enzyme prepared with TEOS. At the temperature of 50



°C, molar ratio alcohol of 9:1 and 7.5% of biocatalyst in relation to the oil, and without addition of co-solvent, higher yields of esters were obtained after 72 h of reaction (13.5% for canola oil and 17% for *Jatropha curcas* oil). The low yields can be justified by the adsorption of the glycerol formed at the reaction on the biocatalyst solid matrix. Another possibility is the formation of water in the reaction medium, which enables the development of detrimental collateral reactions, like hydrolysis. Aiming to increase the esters yield and to remove part of the glycerol adsorbed in the matrix, in the reactions conducted in the fixed bed reactor, temperature and the molar ratio were maintained, however, the amount of immobilized enzyme present in the reaction medium was increased (approximately 13 g) and n-hexane was added as co-solvent. The yields reached at this stage were higher than the results obtained with the immobilized enzyme in the batch reactor (16% for canola oil, after 72 h of reaction and 26% for *Jatropha curcas* oil, after 48 h). This increase in the yield of esters indicates that the larger amount of enzyme and the addition of co-solvent for the reactions carried out in the fixed bed reactor fulfilled the proposed objectives.

Key-words: enzymatic transesterification, enzymatic immobilization, ethyl esters production, canola oil, *Jatropha curcas* oil.

## 1. INTRODUÇÃO

A busca por novas fontes de energia e por combustíveis alternativos está aumentando devido aos danos causados ao meio ambiente pela emissão de gases de efeito estufa, bem como ao provável esgotamento do petróleo, maior fonte de combustível fóssil.

O biodiesel se apresenta como uma fonte alternativa de energia, sendo produzido a partir de óleos vegetais, gorduras animais e resíduos de óleos utilizados na alimentação humana. Desde o início da crise petrolífera, o rápido aumento dos preços e das incertezas relacionadas à disponibilidade de petróleo, bem como a preocupação com a preservação ambiental e com os efeitos nocivos dos gases gerados pelo uso de combustíveis derivados de petróleo, capazes de potencializar o problema do efeito estufa, fizeram crescer o interesse na utilização de óleos vegetais em substituição aos combustíveis fósseis.

Preocupações com o aumento descontrolado do uso de derivados do petróleo e a perspectiva de que houvesse falta destes produtos nos Estados Unidos, durante a Segunda Guerra Mundial, incentivaram o desenvolvimento de projetos sobre o uso de misturas binárias (biocombustíveis) na Universidade Estadual de Ohio. Questões de segurança nacional retornaram a exercer uma importante influência sobre decisões acerca do uso de combustíveis derivados de óleos vegetais, embora os aspectos ambientais (principalmente a emissão de poluentes) sejam igualmente importantes na retomada desta opção tecnológica (KNOTHE, 2006).

Segundo o mesmo autor, além de ser totalmente compatível com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades, o biodiesel ainda apresenta várias vantagens adicionais em comparação ao combustível fóssil: é derivado de matérias-primas renováveis de ocorrência natural, reduzindo assim a atual dependência dos derivados do petróleo e preservando as suas últimas reservas; é biodegradável; gera redução nas principais emissões presentes nos gases de exaustão; possui um alto ponto de fulgor, o que lhe confere manuseio e armazenamento mais seguros; apresenta excelente lubricidade, fato importante com o advento do petrodiesel de baixo teor de enxofre, cuja lubricidade é parcialmente perdida durante o processo de produção (KNOTHE, 2006).

A demanda por este combustível é crescente no país, já que por força da Lei 11.097, de 13 de setembro de 2005, o diesel de petróleo deveria ser comercializado com uma mistura de 5% de biodiesel (B5) até 2013. No entanto, esta meta já vem sendo cumprida desde janeiro de 2010, de acordo com a Resolução do CNPE nº 6, de 16 de setembro de 2009. Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e

Biocombustíveis (ANP), uma nova meta será avaliada, para a mistura de 7% do biodiesel ao diesel convencional em 2013 (ANP, 2013).

Embora a produção do biodiesel por via química já esteja comprovada, existem alguns problemas a ela associados tornando sua aplicação mais onerosa. Um dos principais pontos de dificuldade no processo é a recuperação do glicerol, que se torna mais cara e necessita de processos mais apurados, quando comparada à recuperação deste mesmo subproduto gerado pela produção do biodiesel por rota enzimática. Assim, as desvantagens de se utilizar catalisadores químicos podem ser superadas pelo emprego da enzima como biocatalisador para a síntese de ésteres. As vantagens da catálise enzimática sobre a catálise química para a produção de ésteres alquílicos simples incluem: a habilidade de esterificar o ácido graxo livre, bem como mono e diacilgliceróis, a produção de uma fração glicerínica com baixo teor de água e pouco ou nenhum material inorgânico contaminante e a possibilidade da reciclagem do catalisador imobilizado (HAAS e FOGLIA, 2006).

Os óleos vegetais são amplamente disponíveis a partir de várias fontes, e os triacilgliceróis presentes no óleo podem ser considerados como uma alternativa viável para a obtenção de combustível para motores diesel. Estes óleos apresentam um bom poder calorífico e seus gases de exaustão contém pequenas quantidades de enxofre e compostos aromáticos policíclicos (BALAT e BALAT, 2008).

Dentre as diversas oleaginosas com potencial para a produção de biodiesel, podem ser citadas a soja, a macaúba, o milho, o babaçu, o dendê, o caroço de algodão, o nabo forrageiro, a canola e o pinhão manso. Estas duas últimas apresentam características semelhantes quanto à composição em ácidos graxos, sendo a canola a mais empregada na Europa, com destaque para a Alemanha, que é o maior produtor mundial de biodiesel a partir desta fonte. O pinhão manso apresenta em sua semente uma grande quantidade de óleo, impróprio para o consumo humano, tornando-o uma fonte alternativa e mais barata para a produção do biocombustível (HAAS e FOGLIA, 2006; ARRUDA *et al.*, 2004).

A obtenção de ésteres para aplicação como biocombustível pode ser realizada pela reação de transesterificação, onde um triacilglicerol reage com um álcool (normalmente de cadeia curta), gerando o produto desejado e o glicerol como subproduto. Nesta reação, a razão molar álcool:triacilglicerol mínima para atingir a conversão total dos produtos é de 3:1. Por se tratar de uma reação reversível, o emprego de excesso de etanol favorece o deslocamento do equilíbrio da reação para maior formação dos produtos. Entretanto, em reações catalisadas por lipases, o excesso de etanol pode inibir a enzima e diminuir sua atividade catalítica ao longo da reação (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005), pela

distorção da camada de água essencial que estabiliza os biocatalisadores imobilizados (KOSE; TUTER; AKSOY, 2002) ou por uma possível inibição competitiva da enzima pelos substratos (YADAV e DEVI, 2004).

Com o objetivo de colaborar com os esforços mundiais no desenvolvimento de processos industriais com menores danos ao meio ambiente, a reação de transesterificação pode ser conduzida com o emprego de lipases em substituição aos catalisadores convencionais.

Estes biocatalisadores apresentam diversas características que as tornam interessantes para a indústria. São proteínas altamente ativas, que catalisam reações em condições amenas de pH e temperatura e apresentam uma grande afinidade com os seus substratos (NELSON e COX, 2006). Além de catalisar a reação de transesterificação, as enzimas lipolíticas são amplamente empregadas no processamento de alimentos, produtos farmacêuticos, síntese de produtos químicos, no tratamento de óleos e gorduras, na fabricação de detergentes, papel, produtos cosméticos, entre outros.

Entretanto, uma das principais dificuldades de se utilizar a enzima imobilizada como catalisador é seu alto custo. Há também outros fatores importantes a considerar quando as enzimas são os biocatalisadores industriais, como a estabilidade operacional, que deve ser alta para viabilizar a sua utilização. Portanto, um dos grandes desafios nas últimas décadas é o uso de conceitos relativos aos diferentes métodos de imobilização (adsorção, ligação covalente, encapsulação em matrizes sol-gel) procurando aumentar a estabilidade do biocatalisador.

A técnica sol-gel emprega baixas temperaturas nas reações de hidrólise e condensação, ideal para moléculas orgânicas sensíveis a altas temperaturas, como as proteínas que podem desnaturar e perder sua atividade biológica (MANSUR *et al.*, 1999).

Nos processos finais de obtenção de enzimas imobilizadas em matrizes sol-gel, a etapa de secagem pode influenciar nas características físico-químicas e morfológicas do suporte. É nesta etapa que surge a secagem com gases supercríticos, podendo apresentar resultados superiores de atividade enzimática, quando comparada com o processo de secagem convencional, sob vácuo (MAURY *et al.*, 2004).

Neste contexto, a proposta deste trabalho é dar desenvolvimento à tecnologia sol-gel para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* e aplicá-la na transesterificação dos óleos de canola e pinhão manso nos sistemas batelada (sem adição de cossolvente) e leito fixo para a obtenção de ésteres etílicos. As reações conduzidas em sistema batelada foram realizadas seguindo um planejamento experimental, com aplicação da enzima livre.

A partir dos melhores resultados apresentados neste sistema (temperatura, razão molar álcool:óleo e quantidade de enzima) foi implementado o sistema em leito fixo, com a enzima imobilizada.

### **1.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi a produção de ésteres etílicos pela reação de transesterificação de óleos de pinhão manso e canola com etanol, nos sistemas batelada e leito fixo, utilizando a lipase comercial de *Burkholderia cepacia*, livre e imobilizada em matrizes hidrofóbicas sol-gel secas por evaporação e com gases supercríticos.

### **1.2. Objetivos específicos**

Os principais objetivos específicos propostos para este trabalho foram:

1. Imobilizar a enzima lipase de *Burkholderia cepacia* em matrizes hidrofóbicas sol-gel produzidas a partir de dois diferentes precursores de sílica: o tetraetil-ortossilicato (TEOS) e o tetrametil-ortossilicato (TMOS);
2. Avaliar os processos de secagem da enzima imobilizada por evaporação e com gases supercríticos;
3. Caracterizar a enzima livre e imobilizada quanto às atividades de hidrólise, esterificação e transesterificação;
4. Realizar a caracterização textural da enzima imobilizada (área superficial, diâmetro e volume de poros);
5. Produzir ésteres etílicos pela transesterificação de óleos de canola e pinhão manso em reator batelada, empregando a enzima livre;
6. Produzir ésteres etílicos pela transesterificação de óleos de canola e pinhão manso em reator de leito fixo, empregando a enzima imobilizada;
7. Comparar a produção dos ésteres com os diferentes óleos e biocatalisadores utilizados neste trabalho com outros sistemas imobilizados encontrados na literatura.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico serão abordados, de forma resumida, os aspectos importantes inerentes ao trabalho desenvolvido.

### 2.1. Enzimas

As enzimas constituem uma classe de moléculas sintetizadas pelas células, capazes de realizar as biotransformações que ocorrem nos organismos vivos. São responsáveis pelo metabolismo, ou seja, pelas reações bioquímicas que resultam no crescimento e desenvolvimento da célula.

As enzimas possuem um extraordinário poder catalítico, um alto grau de especificidade para os seus substratos, aceleram as reações químicas de maneira bastante eficiente e atuam em soluções aquosas sob condições moderadas de temperatura e pH. As velocidades de algumas reações catalisadas por enzimas podem ser até  $10^{17}$  vezes maiores do que as não catalisadas (NELSON e COX, 2006).

Alguns fatores podem influenciar e até mesmo determinar a velocidade de uma reação catalisada por enzimas, como a temperatura, o pH, a concentração da enzima e do substrato ou a presença de inibidores ou ativadores. Normalmente, a velocidade de uma reação enzimática aumenta com o aumento da temperatura, até o ponto que atinge a estabilidade térmica do biocatalisador. Um aumento na concentração do substrato também pode elevar a velocidade da reação, até o instante em que atinge a capacidade máxima da enzima em interagir com os reagentes para formar os produtos. Com relação ao pH, existe um valor ótimo para que a enzima catalise as reações desejadas. Quando há uma grande variação deste valor, podem ocorrer variações no estado de ionização de grupos funcionais da estrutura da proteína, causando a desnaturação da enzima (NELSON e COX, 2000).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente, nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, às quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. Dentre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases. As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com: (i) sua alta estabilidade em solventes orgânicos; (ii) não requerer a

presença de co-fatores; (iii) possuir uma ampla especificidade pelo substrato e (iv) exibir uma alta enantioseletividade (CASTRO *et al.*, 2004).

Com a escassez do petróleo e o aumento da consciência de proteção ao meio ambiente, a produção de biodiesel ganha força, na substituição ao diesel de origem fóssil. Em comparação com os métodos tradicionais de obtenção do biocombustível, que utilizam catalisadores químicos, as metodologias empregando catálise biológica simplificaram os procedimentos de recuperação dos ésteres de ácidos graxos e do subproduto (glicerina). No entanto, a produção de biodiesel por método enzimático tem pouca aplicação industrial. Uma enzima estável em alta temperatura, tolerante a solventes orgânicos e com alta eficiência de conversão poderia se configurar como a “porta de entrada” na indústria, para a utilização de biocatalisadores na obtenção de biodiesel (YANG; GUO; YAN, 2007).

## 2.2. Enzima lipase

Lipases (triacilglicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras com subsequente liberação de ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. São encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas, nos quais exercem um papel chave na modificação biológica de lipídios. Estão envolvidas no metabolismo de lipídios intracelulares, e, portanto, na funcionalidade de membranas biológicas. Lipases são extensivamente investigadas com respeito às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas, e posteriormente sobre suas aplicações industriais (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Estas enzimas podem ser obtidas de diferentes microrganismos, tais como os bolores do gênero *Aspergillus*, *Mucor* e *Rhizopus*, leveduras do gênero *Candida* e *Tulopsis* e bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Staphylococcus* (FABER, 2004).

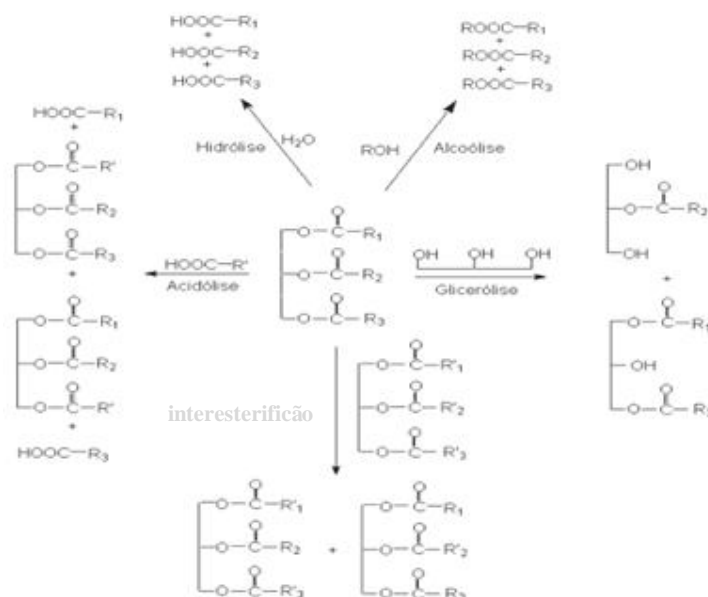
As enzimas lipolíticas são amplamente empregadas no processamento de alimentos, produtos farmacêuticos, síntese de produtos químicos, no tratamento de óleos e gorduras, na fabricação de detergentes, papel, produtos cosméticos, dentre outros.

As lipases podem apresentar massa molar entre 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4,0 e 9,0 e em temperaturas entre a ambiente até 70 °C. Normalmente, são estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, com uma atividade ótima entre 30 e 40 °C. Porém, a estabilidade térmica varia consideravelmente em função da origem. As lipases microbianas são as que possuem maior estabilidade em temperaturas elevadas (VULFSON, 1993; KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998).

Estas enzimas representam cerca de 10% do total de enzimas empregadas mundialmente em processos bioquímicos. No entanto, mesmo com uma vasta variedade de enzimas lipolíticas microbianas, o uso destas em escala industrial ainda é escasso, devido aos elevados custos de produção (GHANDI, 1997).

As lipases provenientes de micro-organismos são as mais utilizadas industrialmente por apresentarem procedimentos mais simples de isolamento a partir do caldo fermentativo e serem mais estáveis, com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes. São, em sua maioria, extracelulares, favorecendo a extração, isolamento e purificação (CARVALHO *et al.*, 2003).

Além de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação inversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para resultar em reações de transesterificação (glicerólise, alcoólise e interesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados. Outros compostos, além de água e álcool, podem ser utilizados como nucleófilos em reações catalisadas por estas enzimas. Desta forma, as lipases podem participar de reações como aminólises, tiotransesterificações e oximólises, em solventes orgânicos, com elevada seletividade (CASTRO *et al.*, 2004). A Figura 2.1 apresenta um esquema das reações catalisadas por lipases.



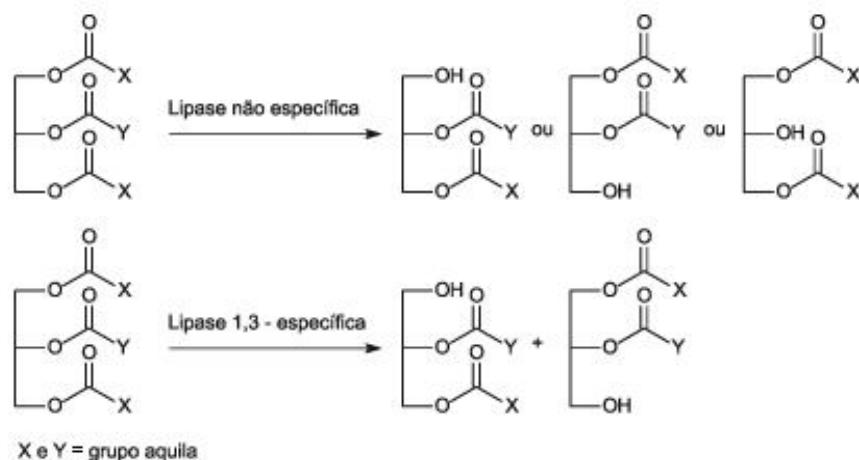
**Figura 2.1.** Representação esquemática das reações catalisadas por lipases (VULFSON, 1993).



De acordo com Macrae e Hammond (1985) as lipases microbianas são classificadas em três grupos, em função de sua especificidade com relação ao substrato:

- **Lipases 1,3 específicas** - catalisam a liberação de ácidos graxos especificamente das posições sn-1 e sn-3 dos acilgliceróis. A hidrólise total pode ocorrer se a reação for por tempo prolongado, considerando-se que o 2- MAG (2-monoacilglicerol) ou 1,2 (2,3)- DAG (1,2(2,3)-diacilglicerol) formados, ambos quimicamente instáveis, podem ser isomerizados espontaneamente para as posições 1 ou 3. As lipases de *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger* e *Mucor miehei* pertencem a este grupo. A lipase pancreática é uma típica lipase sn-1,3 específica, e algumas lipases vegetais (canola, mostarda e lupino) têm demonstrado possuir este tipo de especificidade.
- **Lipases não específicas** - catalisam a hidrólise de TAG (triacilglicerol) para ácidos graxos livres e glicerol, de modo aleatório. Não mostram especificidade com relação à natureza do grupo acil ou à posição em que este está esterificado no glicerol. Exemplos são as lipases de *Penicilium cyclopium*, *Corynebacterium acnes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Candida cylindracea*.
- **Lipases ácido graxo específicas** - catalisam a hidrólise de tipos específicos de grupos acila nas moléculas de TAG. Um representante típico deste grupo é a lipase de *Geotrichum candidum* que hidrolisa, preferencialmente, grupos acila de cadeia longa, que contenham dupla ligação cis na posição 9.

Um esquema representativo das reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica é apresentado na Figura 2.2.



**Figura 2.2.** Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica (PAQUES e MACEDO, 2006).

Algumas aplicações da lipase na indústria são apresentadas na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Exemplos de aplicações industriais de lipase.

Área industrial	Aplicação	Produto
Alimentação	Hidrólise de gordura de leite	Aromas para produtos matinais
	Síntese de ésteres	Aromas para alimentos e bebidas
	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos/ diacil/monoacilgliceróis
Química	Remoção de gorduras/manchas	Detergentes
	Síntese de ésteres	Ésteres, emulsificantes
Alimentação/química/farmacêutica	Transesterificação de óleos naturais	Óleos e gorduras
Cosméticos	Síntese de ésteres	Fragrância de perfumes
Médica	Ensaio de triacilgliceróis no sangue	Kits de diagnósticos
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
Curtume	Remoção de gorduras das peles de animais	Produtos de couro

PAQUES e MACEDO (2006), CASTRO *et al.* (2004).

### 2.2.1. Mecanismo de ação das lipases

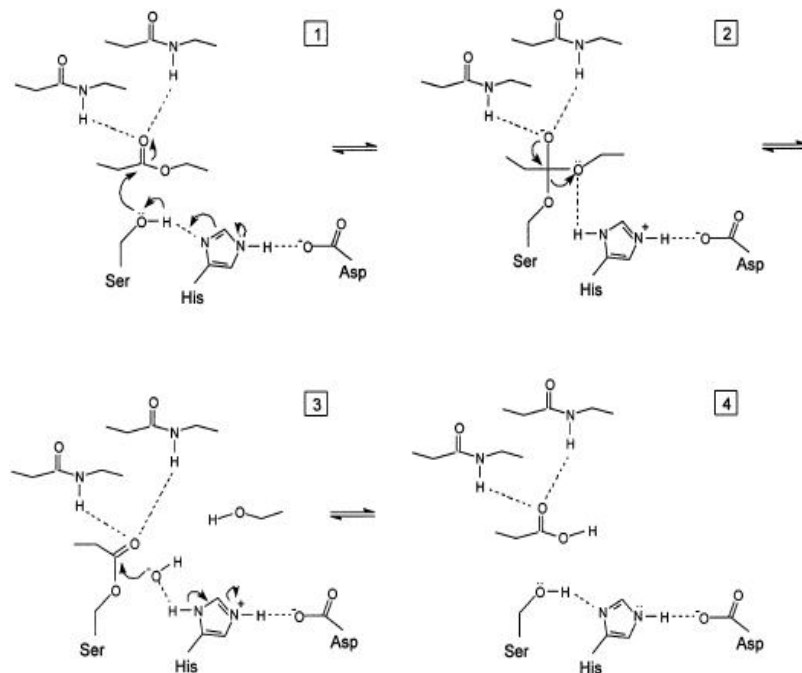
O sítio ativo da lipase consiste na tríade catalítica formada pelos resíduos de aminoácidos Ser-His-Asp/Glu (WISEMAN, 1985).

A maioria das lipases apresenta uma cobertura do sítio ativo (tampa), chamada *lid*, que consiste de uma cadeia polipeptídica em forma de uma ou duas  $\alpha$ -hélice. Na configuração onde o sítio ativo encontra-se coberto pelo *lid*, a enzima apresenta baixa atividade catalítica. Quando a lipase se adsorve a uma interface, há um rearranjo estrutural que altera as propriedades da superfície da enzima. Isto implica no deslocamento do *lid*, proporcionando o acesso do substrato ao sítio ativo. Este movimento de deslocamento do *lid* expõe uma grande área superficial hidrofóbica em torno do sítio ativo, resultando em uma molécula anfipática que é apropriadamente orientada para interagir com interfaces lipídicas (SHRAG *et al.*, 1997).

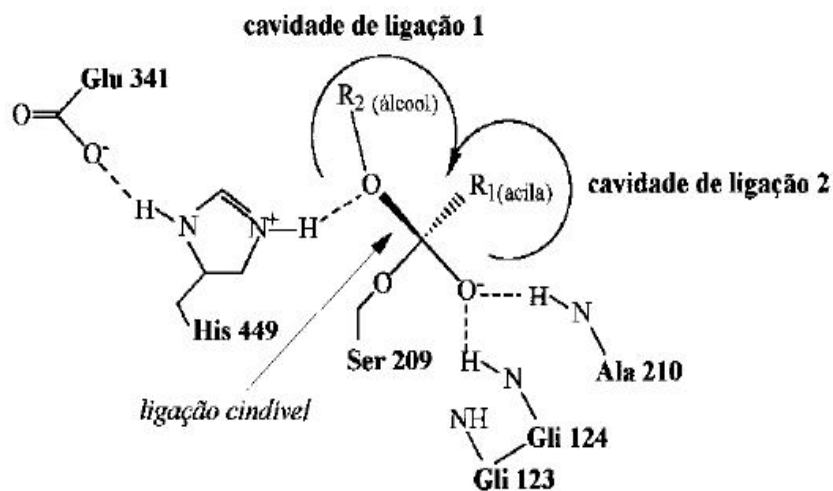
De acordo com Gao *et al.* (2011), experimentos empregando a técnica de fluorescência indicam que a conformação aberta do *lid* é estabilizada por uma combinação de interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre o *lid* e conjuntos lipídicos. Assim, os resíduos específicos do *lid* são importantes para a atividade específica da lipase.

A Figura 2.3 apresenta um mecanismo geral de atuação da lipase. Na Figura 2.4, é apresentado um esquema representativo para uma reação de hidrólise de um éster ou uma

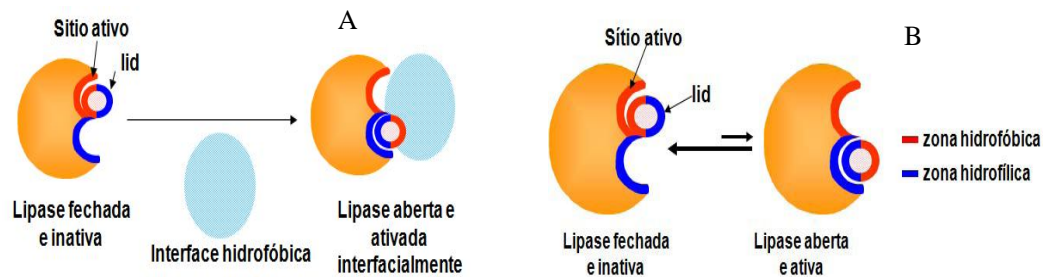
transesterificação alcoólica catalisada por lipase. O mecanismo de ativação interfacial da lipase é mostrado na Figura 2.5.



**Figura 2.3.** Mecanismo de ação catalítica da lipase (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).



**Figura 2.4.** Representação esquemática de um possível complexo tetraédrico enzima-substrato para uma reação de hidrólise de um éster ou transesterificação de um álcool catalisada por uma lipase de *Candida rugosa* (adaptado de CYGLER *et al.*, 1994, citado por COSTA e AMORIM, 1999).



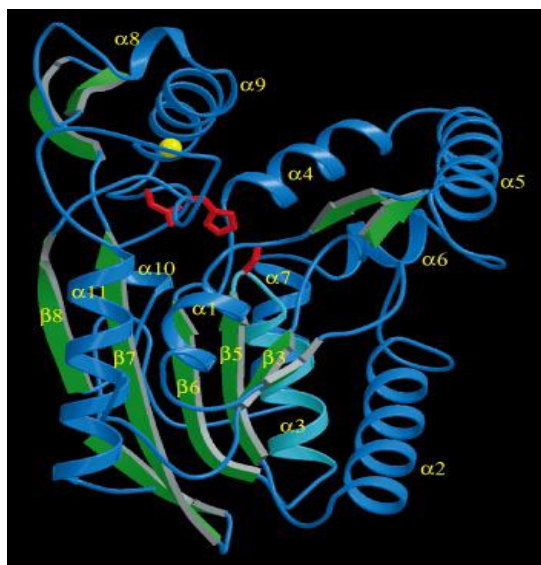
**Figura 2.5.** (A) Mecanismo de ativação interfacial de lipases em interfaces hidrofóbicas; (B) Equilíbrio entre as diferentes conformações de lipases em meios aquosos homogêneos (RODRIGUES, 2009).

### 2.2.2. Lipase de *Burkholderia cepacia*

A lipase microbiana de *Pseudomonas cepacia*, atualmente classificada como *Burkholderia cepacia* (LBC) (JAEGER e REETZ, 1998) é empregada com grande êxito nos processos biocatalíticos, pelo fato de apresentar alta estabilidade térmica e boa tolerância a solventes. Sua cadeia polipeptídica, formada por 320 resíduos de aminoácidos, apresenta massa molar aproximada de 33 kDa (PAN *et al.*, 2010; NOBLE *et al.*, 1993).

Na estrutura global da LBC muitas das características das  $\alpha/\beta$ -hidrolases são mantidas (Figura 2.6). A folha  $\beta$  central, presente no núcleo da molécula, é semelhante às folhas  $\beta 3$ - $\beta 8$  das  $\alpha/\beta$ -hidrolases. Existem onze  $\alpha$ -hélices, das quais quatro envolvem a folha  $\beta$  central. As  $\alpha$ -hélices correspondem às hélices A-F das  $\alpha/\beta$  hidrolases ( $\alpha 1=A$ ,  $\alpha 2=B$ ,  $\alpha 3=C$ ,  $\alpha 7=D$ ,  $\alpha 10=E$  e  $\alpha 11=F$ ). O sítio ativo é composto por Ser87, His286 e Asp264, que formam ligações de hidrogênio. A Ser do sítio ativo encontra-se no fundo de uma fenda na proteína. A abertura da fenda apresenta formato oval, de 10 a 25 Å. A base da fenda, em forma de U, possui 4 Å de largura. A parede da fenda em torno do sítio ativo é composta por resíduos hidrofóbicos. As bordas da fenda são compostas de hélices  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 9$  e resíduos. O sítio de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  está coordenado por seis átomos de oxigênio; quatro átomos da proteína e dois de moléculas de água. Este sítio atua na estabilização de algumas ligações peptídicas na conformação cis, mantendo algumas ligações de hidrogênio no interior da molécula (SCHRAG *et al.*, 1997).

Características como boa estabilidade em altas temperaturas, tolerância a solventes orgânicos, e alta atividade para diferentes substratos tornam a lipase de *Burkholderia* um excelente biocatalisador, com uma ampla gama de aplicações industriais, como a indústria farmacêutica e a produção de bioenergia (YANG; GUO; YAN, 2007).



**Figura 2.6.** Estrutura geral da lipase de *Burkholderia cepacia*. As folhas  $\beta$  estão representadas em verde, as hélices em azul, o íon  $\text{Ca}^{2+}$  em amarelo e os resíduos da tríade catalítica em vermelho (SCHRAG *et al.*, 1997).

### 2.3. Enzimas imobilizadas

A imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de um catalisador biologicamente ativo no interior de um reator ou de um sistema analítico. O biocatalisador pode ser uma única enzima, uma mistura de enzimas ou enzimas contidas no interior de uma célula, e está retido no interior (poros) ou na superfície de um material que é utilizado como suporte. O complexo enzima-suporte mantém as características físicas do suporte e, em alguns casos, retém a atividade biológica da enzima na forma solúvel. Este sistema imobilizado permite a condução de reações em reatores contínuos, com fácil separação de catalisador–produto e aumento da produtividade do processo (massa de substrato/massa de biocatalisador) (ZANIN e MORAES, 2004).

A tecnologia de imobilização de enzimas envolve basicamente a escolha de um suporte e do método de imobilização nesse suporte que resulte num preparado imobilizado ativo e estável. Dispõe-se atualmente de várias técnicas de imobilização de enzimas, e de um grande número de matrizes, englobando materiais orgânicos e inorgânicos, naturais ou sintéticos. Apesar da existência de suportes baratos, como polímeros e minerais naturais, a utilização de enzimas imobilizadas em processos exige a elaboração de matrizes específicas para essa finalidade, que resultem em preparados imobilizados com elevadas atividades e características hidrodinâmicas adequadas ao uso em reatores. As mais recentes tecnologias requerem materiais com combinação de propriedades que não são encontradas

nos materiais convencionais. Materiais híbridos orgânico-inorgânico são preparados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos e constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações (PAULA *et al.*, 2008).

A imobilização pode ocorrer por adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional por meio de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação em uma membrana polimérica (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

### **2.3.1. Imobilização de lipases**

As lipases, apesar de apresentarem propriedades interessantes, não são consideradas biocatalisadores perfeitos. Segundo Contesini *et al.* (2010), em determinadas circunstâncias, estas enzimas podem não apresentar boa seletividade e atividade ideal. Além disso, seu alto custo causa desinteresse em aplicações industriais. A utilização destes biocatalisadores imobilizados pode representar uma atenuação destes problemas, conferindo às lipases aumento de estabilidade e redução dos custos de operação industrial. A principal vantagem do emprego de lipases imobilizadas é a possibilidade de reutilizá-las, pela facilidade de sua recuperação. Diversas técnicas e suportes para a imobilização são empregadas, e alguns parâmetros importantes para este procedimento devem ser considerados, como a resistência mecânica, química e estabilidade física do suporte, características hidrofóbicas e hidrofílicas, custo e massa de enzima no suporte, dentre outros. Ainda, segundo os mesmos autores, a técnica de confinamento dos biocatalisadores em matrizes poliméricas insolúveis (formando filmes) apresenta como vantagens a característica inerte do suporte, evitando a desnaturação da enzima. As lipases podem ser aprisionadas em diferentes matrizes poliméricas, naturais ou sintéticas.

Diversos trabalhos descrevem um melhoramento significativo na atividade e estabilidade de enzimas imobilizadas, quando o procedimento de imobilização é realizado em presença de aditivos (por exemplo, polietilenoglicol, álcool polivinílico e líquidos iônicos). A maioria desses estudos envolve a coimobilização do aditivo em processo de adsorção simples (ou parcialmente modificado por precipitação da enzima, por evaporação da água, ou por liofilização), sendo alguns efeitos atribuídos a esta nova técnica: (i) proteção da inativação da enzima durante a etapa de imobilização; (ii) retenção da camada de água ao redor do biocatalisador e, (iii) efeitos dispersantes das moléculas da enzima e

facilitadores de transporte de massa quando aditivos são usados como matrizes de imobilização. O aditivo pode estar presente ou ausente no meio de dispersão. O contato do aditivo com o suporte e com a enzima pode apresentar comportamento antagônico, isto é, a interação do sistema (aditivo + suporte + enzima) pode ser suficiente ou apresentar um efeito negativo na reação de interesse ou resistência à transferência de massa. A influência do aditivo na atividade enzimática ainda não está totalmente esclarecida (SOARES *et al.*, 2003).

Nem todos os aditivos são eficientes como estabilizantes. Soares *et al.* (2003) comentam que a seleção do aditivo adequado é função do tipo de enzima e do método de imobilização. No caso específico das lipases, que exigem uma interface para sua total atividade catalítica, o uso de aditivos macromoleculares mostra efeitos estabilizantes significativos, por meio do revestimento da interface impedindo, desta forma, uma mudança de sua estrutura protéica. Alguns exemplos de aditivos que podem ser utilizados na imobilização de lipases são: caseína, gelatina, albumina de ovo ou bovina, polietilenoglicol, álcool polivinílico, dentre outros.

Simões *et al.* (2011) avaliaram a imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa* por ligação covalente em matriz híbrida SiO<sub>2</sub>-quitosana, obtida pela técnica sol-gel. Os autores realizaram um estudo comparativo entre a enzima livre e imobilizada, com relação ao pH, temperatura, parâmetros cinéticos e estabilidade térmica, na hidrólise do azeite de oliva. O pH e temperatura, para a máxima atividade da enzima livre, foram de 7,0 e 45 °C, respectivamente. Após a imobilização, o valor de pH obtido foi de 7,5 e a temperatura foi de 40-50 °C. Quanto à estabilidade térmica do biocatalisador, a lipase na forma solúvel foi totalmente inativada após 120 min de incubação, enquanto a lipase na forma imobilizada ainda manteve 40% da atividade original nesse mesmo período de tempo, a 50 °C para ambos os ensaios. Esses dados indicam que o procedimento de imobilização atuou no sentido de aumentar a estabilidade térmica da enzima. Os valores de K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> aparentes foram determinados pela equação de Michaelis-Menten, sendo obtidos os valores de V<sub>max</sub> iguais a 12050 μmol·g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (enzima livre) e 1409 μmol·g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (enzima imobilizada). Os valores de K<sub>m</sub> determinados foram 534 μmol·L<sup>-1</sup> (enzima livre) e 851 μmol·L<sup>-1</sup> (enzima imobilizada), indicando uma mudança da afinidade da lipase pelo substrato, na forma imobilizada.

A especificidade de uma preparação comercial de lipase de *Mucor miehi* imobilizada em resina de troca iônica (Lipozyme TM), com relação à molécula ácida e alcoólica do substrato, foi estudada por Castro, Oliveira e Soares (1997), pela síntese de

diversos ésteres de terpenóides. Na série de reações do citrionelol e ácidos graxos com diferentes tamanhos de cadeia alifática (C<sub>2</sub> a C<sub>18</sub>), altas taxas de esterificação (95 a 98%) foram alcançadas para ácidos contendo 4 ou mais carbonos. Numa segunda série de experimentos, diferentes álcoois terpenos foram esterificados com ácido butírico, sendo constatada uma influência marcante da estrutura do álcool de terpeno no desempenho desta preparação enzimática. Graus de esterificação maiores que 95% somente foram obtidos para os álcoois primários como citrionelol, geraniol e nerol. Álcoois secundários (mentol) e terciários (linalol) não foram esterificados, sob as condições testadas. Foi ainda verificado que este tipo de preparação de lipase (Lipozyme TM) apresenta sérias limitações para aplicação em reações de esterificação de álcoois secundários e terciários, sendo recomendado o seu uso apenas na síntese de ésteres terpenóides, empregando álcoois primários como citrionelol, geraniol e nerol.

Paroul *et al.* (2011) estudaram a otimização da produção de propionato de geranila, um éster de óleo essencial, pela esterificação do geraniol e ácido propiônico em um sistema livre de solvente, utilizando lipase B de *Candida antarctica* (Novozym 435) imobilizada em resina de troca iônica como catalisador. As condições ótimas de produção foram determinados a 40 °C, razão molar geraniol:ácido propiônico de 3:1, a 150 rpm e 10% de enzima, em massa, com uma conversão de cerca de 93%. Depois de determinar os parâmetros ótimos de reação, um estudo cinético foi realizado para avaliar a influência da razão molar dos substratos, concentração de enzima e temperatura na conversão da reação. Os resultados obtidos nesta etapa permitiram concluir que o excesso de álcool (razão molar ácido:álcool de 1:6), concentração da enzima de 5% (em massa), temperatura de 40 °C e razão molar dos substratos de 1:1 foram as melhores condições da reação, com uma conversão próxima de 100% após 30 min.

Séverac *et al.* (2011) avaliaram o impacto econômico da utilização da lipase B de *Candida antarctica* (Novozym 435), imobilizada por diferentes métodos, em processo contínuo de transesterificação. Observaram que a matriz comercial (Lewatit VPOC1600), com características hidrofílicas, apresentou limitações, pois o glicerol é adsorvido na superfície do suporte, diminuindo drasticamente a atividade da enzima. Segundo os autores, o suporte que apresentou melhor desempenho foi o Accurel MP 1001 (com tamanho de partícula < 1000 µm), que sofreu pré-tratamento com acetona, no lugar de etanol, permitindo a maximização da taxa de adsorção e da quantidade de enzima imobilizada. Os autores relataram que o uso de 60 g de Accurel/L de meio de imobilização, nas condições descritas, é a melhor opção a ser utilizada industrialmente. O rendimento da



imobilização situou-se entre 80 e 90%, e quando comparado à Novozym 435, representou redução nos gastos de, aproximadamente, 50%, em dez anos. Os custos envolvendo o reator de leito fixo representaram entre 0,15 e 7% do custo total do processo. Concluíram que não se faz necessária a busca do conjunto do menor reator com a maior atividade enzimática, mas sim, encontrar a enzima com o preço e finalidade adequados, que permitam sua utilização em qualquer tipo de equipamento.

#### **2.4. Imobilização por ligação covalente ao suporte ou ligação cruzada**

O procedimento envolve a modificação química de um resíduo de aminoácido pela formação de uma ligação covalente da enzima com um material insolúvel em água, pela fixação da enzima em matriz por ligação covalente ou pela formação de ligações cruzadas numa matriz, contendo a enzima e usando vários agentes bifuncionais. O polietilenoglicol (PEG) tem sido extensivamente utilizado como um modificador de proteínas. As proteínas podem ainda ser alteradas com derivados de PEG ativado, os quais são usualmente sintetizados a partir do mono-metóxi-polietilenoglicol com um grupo hidroxila no final da cadeia. Os modificadores reagem com o grupo amino do resíduo de lisina e/ou com o grupo amino terminal na molécula de proteína (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

#### **2.5. Imobilização em matriz polimérica ou em cápsulas**

A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulação consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. Neste sistema cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto pequenas moléculas como substratos e produtos, se difundem. A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e, geralmente, são necessárias altas concentrações de substratos a fim de diminuir esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molecular, pois estes compostos se

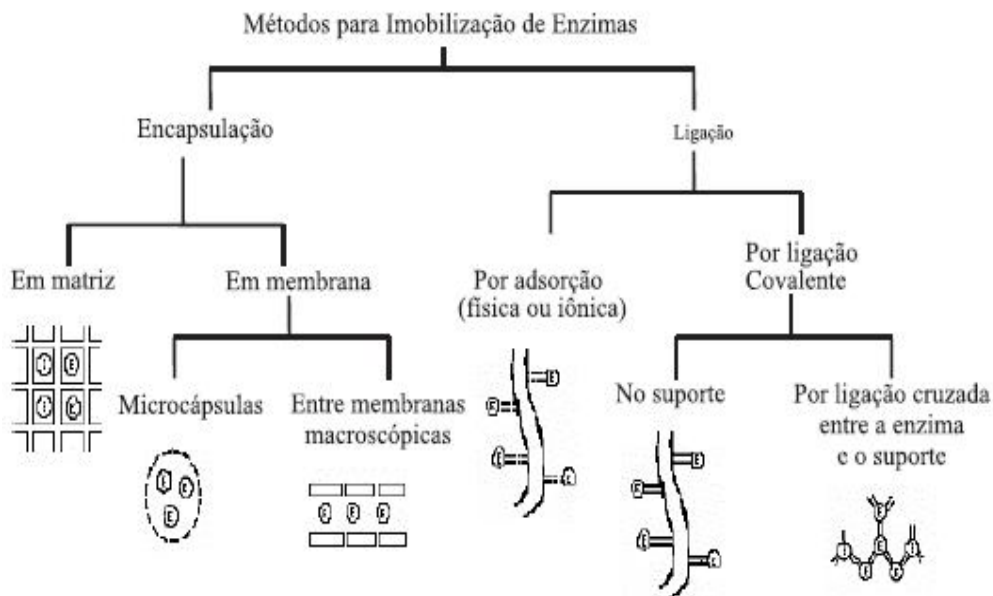
difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A imobilização por encapsulação pode ser realizada por separação por membranas. Neste caso, a enzima encontra-se fisicamente separada do meio de reação por uma membrana semipermeável, que pode ser por encapsulação, onde a enzima é imobilizada no interior de esferas não-rígidas, cujo envoltório é constituído por um polímero geleiforme e semipermeável, ou em membranas fibrosas semipermeáveis, que se caracteriza pelo confinamento da enzima em uma dada região da solução. Há também o aprisionamento da enzima entre as malhas de um polímero geleiforme. A eficiência do entrelaçamento, a permeabilidade do gel e sua resistência mecânica dependerão da composição dos reagentes e da natureza do precursor utilizado (FORESTI e FERREIRA, 2007).

## **2.6. Imobilização por adsorção**

O procedimento de adsorção de uma proteína é muito simples e é um dos métodos mais utilizados. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo. O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, dependem de vários parâmetros, tais como tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros. O uso de suportes porosos é vantajoso porque a enzima é adsorvida no interior dos poros. A eficiência depende também da concentração da enzima. A quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação. Este processo, em geral, é realizado à temperatura constante e isotermas de adsorção são obtidas, as quais seguem as equações de Langmuir ou Freundlich (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A Figura 2.7 apresenta um esquema dos métodos de imobilização de enzimas.



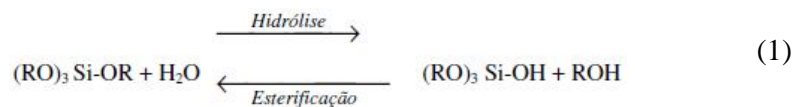
**Figura 2.7.** Métodos de imobilização enzimática (reproduzido de <http://www.cape.canterbury.ac.nz/>, citado por DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A imobilização tem como finalidade a utilização do biocatalisador por um período de tempo maior, com operação contínua, possibilitando um melhor controle das variáveis do processo, facilitando a separação do biocatalisador do produto de reação, além de conferir à enzima, em muitos casos, propriedades catalíticas como maior estabilidade ao pH e temperatura (ZANIN e MORAES, 2004).

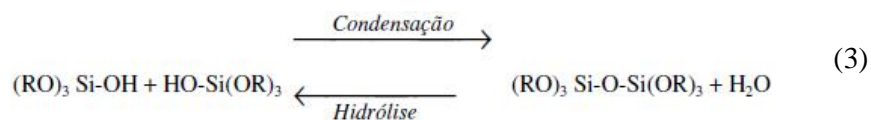
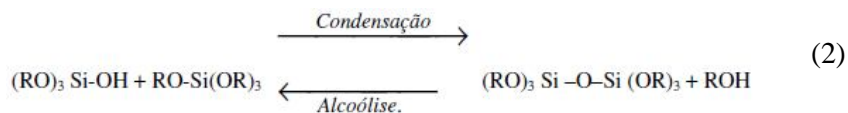
## 2.7. Imobilização de enzimas pelo método sol-gel

O método sol-gel envolve a hidrólise e policondensação do alcóxido em solventes apropriados, seguido por tratamento térmico. O biocatalisador a ser encapsulado é adicionado ao sol após a hidrólise parcial do alcóxido (SOARES *et al.*, 2004).

Segundo Campàs e Marty (2006), o processo de sol-gel consiste numa reação de hidrólise, na qual ocorre substituição dos grupos alcóxido (OR) por grupos hidroxila, com formação de grupos silanol (Si-OH), como mostrado na reação 1.



Em seguida, ocorre o processo de condensação em que pode haver liberação de água ou álcool, com a formação de ligações silano (Si-O-Si). O grau de condensação dos precursores alcóxido é limitado pela sua própria hidrólise (reações 2 e 3).



A velocidade das reações de formação do sol-gel altera a estrutura tridimensional da matriz e é afetada pela natureza e quantidade dos precursores, pela presença de espécies ácidas ou básicas, pelo tipo de solvente, pela razão água/silano, a temperatura, a ordem e/ou a velocidade de adição dos vários compostos. A velocidade de hidrólise é muito afetada pela razão água/silano (R). Será maior com o aumento de R, pois aumenta a probabilidade de colisão entre as moléculas de água e sílica. Se as quantidades de água forem tão elevadas que  $R \gg 4$ , a velocidade de hidrólise é independente de R, uma vez que deixam de existir limitações difusionais. Apesar de um valor elevado para R se apresentar como uma vantagem pode ocorrer imiscibilidade dos precursores.

Diversas enzimas, anticorpos e outras proteínas, DNA, RNA e antígenos, bem como estruturas mais complexas como membranas celulares e organelas tem sido imobilizadas em polímeros sol-gel inorgânicos ou híbridos (inorgânicos-orgânicos). Estes materiais podem ser utilizados como biocatalisadores e sensores altamente específicos, com aplicações ambientais, alimentares e medicinais. Por meio de uma seleção cuidadosa dos precursores e aditivos, estes materiais podem ser projetados para aplicações específicas (SOARES *et al.*, 2006).

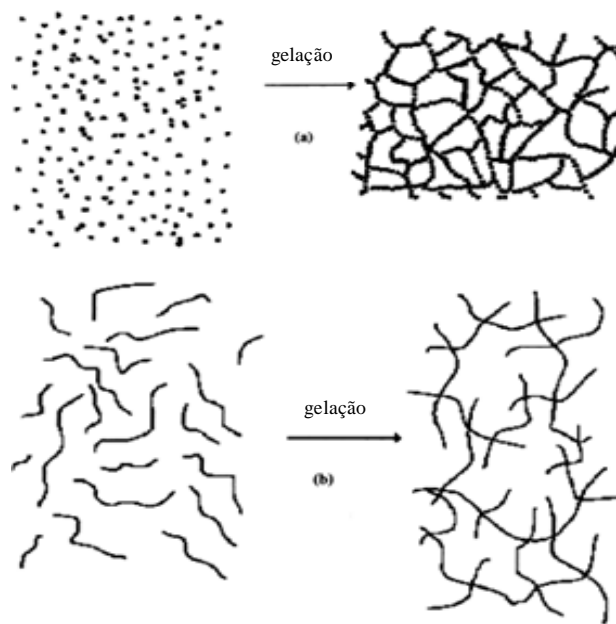
Na metodologia sol-gel é essencial preparar uma solução homogênea contendo o precursor catalítico para coagular uniformemente a solução. Desde que a taxa de polimerização de diferentes precursores varia consideravelmente, é preciso testá-los em relação aos seus níveis de reatividade em solventes polares para formar a matriz, ou para aumentar a sua taxa de condensação, com a adição de um ácido ou base. Sistemas já testados para lipases de origem microbiana ou animal incluem a utilização de diferentes precursores (tetrametil-ortossilicato, metiltrimetoxila, etiltrimetoxisilano e outros), aditivos estabilizantes (álcool polivinílico, albumina, gelatina e outros), e solventes como o

metanol e etanol. As condições de secagem variam da seguinte forma: xerogéis são secos por evaporação do líquido e aerogéis são normalmente obtidos por remoção dos solventes em meio supercrítico (SOARES *et al.*, 2004).

Os precursores geralmente utilizados são soluções aquosas de alcóxidos ou sais inorgânicos dissolvidos em solventes orgânicos. Os precursores mais versáteis são os alcóxidos metálicos, sendo os mais usados os alcoxisilanos como o tetrametil-ortossilicato (TMOS) e o tetraetil-ortossilicato (TEOS), pois reagem facilmente com a água. Os alcóxidos são do tipo  $M(OR)_n$  (R = metil, etil, propil, isopropil, butil, tercbutil etc.) e n entre 1-6 (MACEDO *et al.*, 2006).

Aditivos com maior massa molecular tendem a cobrir uma grande área superficial, evitando a perda de atividade devido a mudanças conformacionais. A adsorção de proteínas sobre superfícies é conhecida por envolver algum grau de alterações conformacionais na molécula. Há relatos de que alterações estruturais induzidas durante a adsorção aumentam com a diminuição da cobertura superficial e a utilização de aditivos pode impedir o desdobramento da estrutura da proteína pela cobertura da interface. Portanto, a quantidade de aditivo adicionado depende do tamanho molecular e da área superficial do suporte disponível para a imobilização de enzimas (RODRIGUES *et al.*, 2005).

O processo de sol-gel pode ser facilmente reconhecido, pois trata de qualquer rota de síntese de materiais na qual num determinado momento ocorre uma transição do sistema sol para um sistema gel. O termo sol é empregado para definir uma dispersão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 100 nm) estável em um fluido, enquanto o termo gel pode ser visto como sendo um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios. Desse modo, os géis coloidais resultam da agregação linear de partículas primárias (Figura 2.8 (a)), que só pode ocorrer pela alteração apropriada das condições físico-químicas da suspensão. Por outro lado, os géis poliméricos são, geralmente, preparados a partir de soluções em que se promovem reações de polimerização. Neste caso a gelação ocorre pela interação entre as longas cadeias poliméricas lineares (Figura 2.8 (b)). As reações químicas que ocorrem durante a formação do sol, do gel e do xerogel influenciam fortemente a composição e as propriedades do produto final (ALFAYA e KUBOTA, 2002).



**Figura 2.8.** Esquema da transição sol-gel: (a) formação de gel particulado e (b) formação de gel polimérico (ALFAYA e KUBOTA, 2002).

Com relação à encapsulação de enzimas em matriz hidrofóbica sol-gel, Soares *et al.* (2006) conduziram estudos de imobilização de lipase de *Candida rugosa* em precursor de sílica TEOS em presença de polietilenoglicol (PEG) como aditivo. As propriedades da sílica e seus derivados, com relação ao diâmetro médio de poros, área superficial específica, tamanho médio dos poros, perda de massa após aquecimento (análise termogravimétrica, TGA) e RMN  $^{29}\text{Si}$  e  $^{13}\text{C}$  são relatadas. O pH ótimo deslocou de 7,8 para 6,7 e a temperatura ótima aumentou de 36 para 60 °C após a encapsulação da enzima. A lipase encapsulada na presença de PEG apresentou maior estabilidade na faixa de 37-45 °C. A atividade hidrolítica durante o armazenamento em longo prazo, em temperatura ambiente baixou para 50% após 94 dias. Os dados da área superficial sugerem a participação ativa da enzima lipase durante a gelificação da matriz de sílica. Isso levou à redução de grupos Si-OH disponíveis, poros maiores e menor área superficial. Poros maiores aumentam a difusão de substrato, que se correlaciona bem com maior atividade hidrolítica da enzima encapsulada em matriz TEOS PEG sol-gel, em comparação com outros suportes sol-gel.

Investigando a melhoria da atividade catalítica da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em matriz sol-gel na presença do aditivo calix(aza)crown (oligômeros cíclicos formados por unidades de fenol por meio de ligações de metileno), Uyanik, Sen e Yilmaz (2011) determinaram a ação da enzima encapsulada na hidrólise do palmitato de p-

nitrofenila (p-NPP) e na hidrólise enantiosseletiva do metil éster racêmico naproxeno. Observaram que o rendimento percentual na atividade enzimática foi maior para a enzima imobilizada, em comparação com a enzima livre. A reação do metil éster racêmico naproxeno resultou uma conversão de 48% em 24 h e 98% de excesso enantiomérico para o ácido-S. A enzima imobilizada apresentou 18% de conversão após sua utilização por seis ciclos reacionais. Utilizando suporte inerte sol-gel preparado pela policondensação dos precursores TEOS e OTES (octiltrióxido de silano) e empregando o aditivo mencionado, os autores observaram que a enzima imobilizada apresentou desempenho superior à enzima livre, operando em temperatura e pH mais elevados.

Tomin *et al.* (2011) avaliaram o ajuste fino da segunda geração de lipase imobilizada em matriz sol-gel com precursores alcóxido de silano ternários. A imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK) em Celite foi estudada utilizando sistemas compostos de silanos ternários como precursores, constando de alquiltrióxido de silano (alquil-TEOS), feniltrióxido de silano (Phe-TEOS) e tetraetil-ortossilicato (TEOS). Os parâmetros investigados foram a cobertura superficial para diferentes razões enzima-Celite (entre 1:1 e 1:10) e o efeito da razão molar do alquil-TEOS (alquil = propil, hexil, octil, 1H,1H,2H,2H-perfluorocil, decil, dodecil, octadecil), Phe-TEOS e TEOS (sete séries de alquil-TEOS:Phe-TEOS:TEOS de 0,1:0,9:1 a 0,9:0,1:1 em intervalos de 0,1) na propriedade catalítica dos biocatalisadores sol-gel. Para comparação, os correspondentes sistemas binários (razões molares 1:1 de alquil-TEOS:TEOS e Phe-TEOS:TEOS) foram também estudados. As preparações de lipase sol-gel ternária e binária foram avaliadas por seu comportamento catalítico na acetilação seletiva enantiomérica do 1-feniletanol e 2 heptanol racêmicos. Para cada precursor alquil-TEOS, um ou mais sistemas ternários alquil-TEOS/Phe-TEOS/TEOS apresentaram resultados superiores quando comparadas às correspondentes preparações alquil-TEOS/TEOS. Os melhores resultados foram alcançados com o octil-TEOS e perfluorocil-TEOS contendo sistemas ternários.

Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) foi imobilizada por Zarcuła *et al.* (2010), empregando o método sol-gel, com tetrametil-ortossilicato e trimetil-ortossilicato (grupos alquila ou arila) como precursores e líquidos iônicos como aditivos de imobilização. Líquidos iônicos de cátions imidazólio à temperatura ambiente (LIs) com diferentes hidrofobicidades e ânions inorgânicos ou orgânicos foram investigados. A atividade biocatalítica na reação de acilação de álcoois alifáticos secundários por acetato de vinila aumentou diante da baixa polaridade do LI, sendo 58% maior no emprego da octila como substituinte da etila do cátion alquilimidazólio. A razão molar ótima LI/silano na

imobilização foi de cerca de 0,2. Grupos hidrofóbicos, tanto do precursor silano e LI conduzem ao sistema otimizado para a ação catalítica da enzima. LIs como meio de reação conduziram à maior atividade, como solventes orgânicos comuns, na resolução cinética de álcoois secundários, mas a maior enantiosseletividade (valores da razão enantiomérica  $E > 50$ ) foi observada em acetona e tetrahidrofurano. Os autores concluíram que a imobilização de lipase em matrizes híbridas sol-gel utilizando LIs específicos como aditivos resultou um biocatalisador com alta eficiência catalítica e a recuperação da atividade total depois da imobilização foi superior a 100%.

Yang *et al.* (2009) conduziram a imobilização da lipase de *Arthrobacter* sp. por encapsulação em matriz sol-gel. Diferentes agentes silanizantes, como viniltrimetoxissilano, octil-trimetoxissilano,  $\gamma$ -(metacriloxipropil)-trimetoxissilano (MAPTMS) e tetraetil-ortossilicato (TEOS) foram utilizados como precursores. Entre eles, MAPTMS foi pela primeira vez utilizada para encapsular lipases e a preparação enzimática por copolimerização de MAPTMS e TEOS apresentou maior atividade de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila e na acilação assimétrica do 4-hidroxi-3-metil-2-(2-propenil)-2-ciclopenteno. As condições ótimas da reação foram: razão de MAPTMS/TEOS = 1:1 (mol:mol), razão molar água/silano de 20 e concentração da enzima de  $0,01 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de solução. A atividade total da enzima imobilizada foi cerca de 13,6 vezes superior à enzima livre. Além disso, a lipase encapsulada apresentou maior estabilidade térmica em relação à forma livre e reteve 54% da atividade original após utilização por 60 dias, a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . A enantiosseletividade da enzima também foi melhorada, com um valor de 150 após o encapsulamento e 85 para a forma livre.

No estudo da secagem dos biocatalisadores sol-gel empregando meio supercrítico (aerogel), alguns autores observaram que a atividade da enzima apresentou melhores resultados (VILLENEUVE *et al.*, 2000; REETZ; ZONTA; SIMPELKAMP, 1996). O material sol-gel oferece baixa resistência difusional, obtendo bons resultados em reações de esterificação. Pode-se notar também que a preparação, a separação do produto e a conservação das propriedades enzimáticas apresentam características superiores quando comparados ao xerogel (PIERRE e BUISSON, 2001; REETZ; ZONTA; SIMPELKAMP, 1996; BUISSON *et al.*, 2001). A encapsulação de lipases utilizando a extração da água com fluido supercrítico, evita as contrações capilares do reticulado de sílica ( $\text{SiO}_2$ ), fornecendo altas atividades quando comparada a outras técnicas de secagem e aumentando os valores de área superficial e porosidade (MAURY *et al.*, 2005).



## 2.8. Biodiesel

O biodiesel é um biocombustível derivado de fontes renováveis como óleos vegetais e gorduras animais, podendo ser produzido por uma reação de transesterificação (Figura 2.9), onde catalisadores químicos (ácidos ou alcalinos) ou biológicos (enzimas) aceleram a reação entre os triacilgliceróis e um álcool de cadeia curta, gerando ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol (subproduto). Por se tratar de uma reação reversível, é apropriado empregar um excesso de álcool, para deslocar o equilíbrio da reação em favor dos produtos.



A estequiometria da reação requer três moles de álcool para cada mol de triacilglicerol. Os ésteres metílicos ou etílicos possuem características físico-químicas semelhantes às do diesel convencional, além de serem menos poluentes, biodegradáveis, renováveis e não corrosivos. Contudo, possuem elevadas viscosidade e densidade, não devendo ser utilizados diretamente no motor. No Brasil são utilizadas misturas do biodiesel com o diesel convencional, conhecidas como misturas BX, em que X refere-se à quantidade de biodiesel (%v/v) adicionada ao óleo diesel (SUAREZ *et al.*, 2007; OLIVEIRA; SUAREZ; SANTOS, 2008). Atualmente o país emprega uma mistura de 5% de biodiesel ao diesel de petróleo, conforme a Resolução do CNPE nº 6, de 16 de setembro de 2009. A Resolução da ANP nº 2, de 12 de janeiro de 2011 autoriza o uso experimental em frotas cativas ou em equipamentos industriais específicos do óleo diesel B6 a B20.

## 2.9. Reação de transesterificação

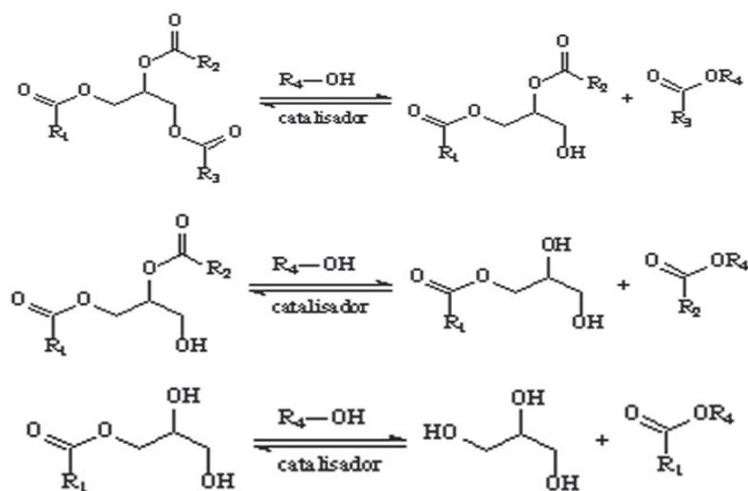
A transesterificação a partir de um triacilglicerol e um álcool de cadeia curta gera uma mistura de ésteres de ácidos graxos e glicerol como subproduto. Em reações onde são empregados catalisadores químicos, o triacilglicerol e o álcool empregados devem estar livres de água, para que não ocorram reações secundárias que favoreçam a formação de sabões (MA e HANNA, 1999).

A reação global de transesterificação consiste em um número de reações reversíveis consecutivas (SCHWAB; BAGBY; FREEDMAN, 1987; FREEDMAN; BUTTERFIELD;

PRYDE, 1986). O triacilglicerol é convertido gradualmente a diacilglicerol, monoacilglicerol e glicerol, onde um mol de éster é liberado em cada etapa da reação (MA e HANNA, 1999).

Na primeira etapa, o átomo de carbono do grupo carbonila da molécula de triacilglicerol é atacado pelo ânion do álcool, formando um intermediário tetraédrico. Na segunda etapa, o intermediário tetraédrico reage com o álcool para regenerar o ânion do álcool. Na última etapa, o rearranjo do intermediário tetraédrico resulta na formação do éster de ácido graxo e do diacilglicerol (ECKEY, 1956; citado por MA e HANNA, 1999).

A Figura 2.9 apresenta, em etapas, a transesterificação de triacilgliceróis para a obtenção de ésteres de ácidos graxos.



**Figura 2.9.** Reações envolvidas na transesterificação de triacilgliceróis (FREEDMAN; BUTTERFIELD; PRYDE, 1986).

O glicerol gerado pela reação pode ser separado por decantação ou centrifugação, e após sua purificação pode ser empregado na indústria farmacêutica, em cosméticos e alimentos (VICENTE; MARTÍNEZ; ARACIL, 2004). Outras aplicações para o glicerol podem ser encontradas na produção de alimentos para animais, como fonte de carbono em processos fermentativos, produção de polímeros, agentes tensoativos e lubrificantes, dentre outras (CLAUDE, 1999).

Em geral, a reação de transesterificação é catalisada por ácidos, álcalis ou lipases. Os catalisadores biológicos tornam-se interessantes, uma vez que seu emprego na reação evita a formação de sabões e facilita os processos de separação e purificação do produto. Contudo, são menos utilizadas comercialmente devido ao alto custo e ao tempo longo de

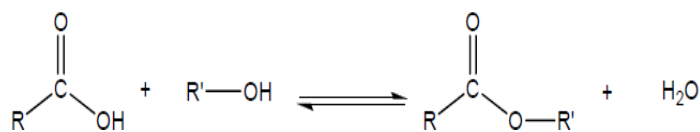
reação. Os catalisadores químicos são os mais empregados, com destaque para os álcalis, devido ao seu baixo custo e por conduzir a reação mais rapidamente, em comparação aos catalisadores ácidos. Esses são os mais econômicos, porque o processo é realizado sob baixa temperatura e pressão, além de fornecer elevadas taxas de conversão. Porém, são altamente higroscópicos, podendo promover reações secundárias indesejadas pelo excesso de água no meio reacional (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

### 2.9.1. Outras reações empregadas na obtenção de biodiesel

Outros métodos de reação podem ser empregados na conversão dos triacilgliceróis, como a esterificação (método químico), a pirólise e a micro-emulsificação (métodos físicos).

A partir de fontes de óleos vegetais são obtidos os ácidos graxos livres, e a reação de esterificação é realizada comumente com a utilização de álcoois de cadeia curta (metanol e etanol) na presença de catalisador (químico ou biológico) para a obtenção de ésteres metílicos ou etílicos (MA e HANNA, 1999).

Um esquema da reação de esterificação de ácidos graxos é apresentado na Figura 2.10.



**Figura 2.10.** Reação de esterificação de ácidos graxos

A reação de esterificação é normalmente conduzida com o emprego da catálise ácida. É uma reação reversível, em que o ácido promove tanto a formação do éster (reação direta) quanto a hidrólise do éster (reação inversa). Desta forma, pode-se favorecer a formação do produto desejado da reação pela adição em excesso de um reagente ou pela remoção de um dos produtos (ZHOU; KONAR; BOOCOOCK, 2003).

A microemulsificação consiste na formação de compostos contendo óleo, álcool e um composto anfifílico. Estes compostos têm como característica a capacidade de emulsificar misturas entre óleo e álcool, mas sua estrutura também contribui nas propriedades finais do combustível formulado. A formulação de um combustível híbrido, tal como as microemulsões, são geralmente mais baratas que os métodos convencionais, por se tratar de um processo simples de mistura de componentes (KNOTHE, 2006).

O processo de craqueamento ou pirólise ocorre em temperaturas acima de 350 °C, na presença ou ausência de catalisador. Nesta reação, a quebra das moléculas dos triacilgliceróis leva à formação de uma mistura de hidrocarbonetos e compostos oxigenados, lineares ou cíclicos, tais como alcanos, alcenos, cetonas, ácidos carboxílicos e aldeídos, além de monóxido e dióxido de carbono e água. Na ausência de catalisadores, óleos de soja, dendê, babaçu, pequi, macaúba e canola foram estudados e, mais recentemente, foi demonstrado que a destilação fracionada dos produtos obtidos pelo craqueamento dos óleos de soja e dendê leva a combustíveis que atendem às especificações do óleo diesel, permitindo seu uso diretamente em motores convencionais. Porém, observa-se que a obtenção de compostos oxigenados no produto final tornam estes levemente ácido (SUAREZ *et al.*, 2007).

## **2.10. Perspectivas de consumo do biodiesel**

A definição para biodiesel adotada na Lei nº 11.097, de 13 de setembro de 2005, que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira, diz que:

*“Biodiesel: biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil.” (NR)*

Em 2005, conforme dados da ANP, foram comercializados pouco mais de 39 bilhões de litros de óleo diesel em território nacional. Já em 2009, 44 bilhões de litros foram disponibilizados no Brasil. De acordo com dados da ANP, de janeiro a março de 2011 foram comercializados cerca de 11,6 bilhões de litros de diesel no país. Esta crescente demanda de óleo diesel no país tende a aquecer o mercado nacional produtivo e consumidor de biodiesel, já que desde janeiro de 2010 o diesel de petróleo é comercializado com uma mistura de 5% de biodiesel (B5), podendo esta mistura ser alterada para 7 ou 10% em 2013.

Segundo Carmo *et al.* (2009), que realizaram um estudo de projeção de demanda de biodiesel, com base em modelos não paramétricos e com avaliação da capacidade instalada, o Brasil apresentou uma demanda, até 2010, de cerca de 2,3 bilhões de litros, considerando a comercialização do combustível B5. Com uma capacidade instalada de

produção de 5,7 bilhões de litros segundo os autores, o país se prepara para a produção de diesel B10 com uma folga bastante confortável.

Em 2012, o Brasil deverá ultrapassar a Alemanha na produção de biodiesel, tornando-se o maior produtor mundial deste biocombustível. De 2008 a 2011, a venda de biodiesel cresceu de 1,1 bilhão para 2,6 bilhões de litros (BRASIL, 2011).

De acordo com dados de 2011 do Ministério de Minas e Energia, em 2010 o Brasil foi o segundo maior produtor mundial de biodiesel, com 2,4 bilhões de litros, atrás apenas da Alemanha, com 2,6 bilhões (MAPA, 2013).

### **2.11. Matérias-primas para a produção de biodiesel**

As matérias-primas para a produção de biodiesel podem ser de diferentes origens: óleos vegetais, gorduras de animais e óleos e gorduras residuais. Contudo, nem todo óleo vegetal deve ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel, pelo fato de apresentar propriedades não ideais, como elevados índices de viscosidade e de iodo, que são transferidas para o biocombustível, tornando-o inadequado para uso direto em motores do ciclo diesel. Portanto, a viabilidade de cada matéria-prima dependerá de suas respectivas competitividades técnica, econômica e sócio ambiental, além dos aspectos agrônômicos, tais como teor em óleos vegetais, produtividade por unidade de área, equilíbrio agrônômico e demais aspectos relacionados com o ciclo de vida da planta (RAMOS *et al.*, 2003).

Os triacilgliceróis são os principais componentes de qualquer gordura animal e vegetal. Óleos vegetais e gorduras animais têm ampla utilização na indústria química, de cosméticos, alimentícia, e nos últimos anos têm se destacado na produção de biocombustíveis. A utilização de óleo vegetal como combustível remonta ao século XIX, quando Rudolph Diesel utilizou em seus experimentos óleo de amendoim (MA e HANNA, 1999; DEMIRBAS, 2002).

Dentre algumas fontes com potencial para a extração de óleo vegetal, com a finalidade de produção de biodiesel, podem ser citadas a mamona, o dendê, o babaçu, o girassol, o caroço de algodão, o coco, a canola, a linhaça, o nabo forrageiro, o pinhão manso, a soja e outras.

Das culturas temporárias presentes no Brasil destacam-se a soja, o amendoim, o girassol e a canola. A soja pode ser uma importante matéria-prima no esforço de produção de biodiesel, uma vez que quase 90% da produção de óleo no Brasil provêm dessa

leguminosa. O amendoim, por apresentar um alto teor de óleo em relação à proteína, poderá voltar a ser produzido com grande vigor para a utilização do óleo com fim energético. O girassol situa-se numa posição intermediária entre a soja e o amendoim. As características alimentares de seu óleo poderão dificultar o seu emprego na produção energética. No entanto, poderão favorecer um deslocamento de parte expressiva do óleo de soja para a produção de biodiesel. A cultura de maior destaque mundial para a produção de biodiesel é a da canola. Seu óleo é a principal matéria-prima para a produção de biodiesel na Europa. A produtividade, situada entre 350 e 400 kg de óleo por hectare, tem sido considerada satisfatória para as condições europeias. O agronegócio da canola envolve a produção e comercialização do farelo, rico em proteínas, que corresponde a mais de 1000 kg por hectare e, além disso, seu cultivo promove uma excelente adubação natural do solo. A canola pode ser cultivada no Brasil, a exemplo das culturas temporárias, por meio de uma agricultura totalmente mecanizada (LIMA, 2004).

A canola (*Brassica napus* L. var oleífera) é uma espécie de oleaginosa pertencente à família das crucíferas. No continente europeu se concentra a principal e maior produção mundial de canola, com destaque para a Alemanha, que é a principal produtora de biodiesel. Com base na canola (*rape seed*), os alemães estruturaram um importante programa de produção de óleo diesel vegetal que, em 2007, foi responsável por gerar um milhão de toneladas do combustível. Mesmo sendo vista como oleaginosa importante em outros países como os EUA, Canadá e União Européia, a canola não tem obtido a mesma expressão no Brasil por razões de dificuldades mercadológicas e tecnológicas. A canola ainda assume um lugar de destaque no cenário de matérias-primas para produção de óleos - segunda colocada frente à sua maior concorrente, a soja. De acordo com dados da Embrapa Trigo, os grãos da canola produzida no Brasil possuem em torno de 24 a 27% de proteína e 34 a 40% de óleo. Desta forma, ela é cultivada extensivamente na Europa, Canadá, Ásia, Austrália e Estados Unidos (EMBRAPA, 2007).

No Brasil, devido aos escassos investimentos em pesquisa, a cultura possui uma área ainda inexpressiva. Segundo Tomm (2007), citados por Zonin *et al.* (2010), existem dificuldades tecnológicas para a expansão do cultivo dessa oleaginosa no país, a saber: (i) necessidade de identificar épocas de semeadura para regiões com maior altitude, e (ii) o ajuste de tecnologias de manejo principalmente em relação à colheita. A Tabela 2.2 mostra a composição em ácidos graxos do óleo de canola.

**Tabela 2.2.** Composição em ácidos graxos do óleo de canola.

Ácidos graxos	Composição (%)
14:0 (mirístico)	<0,2
16:0 (palmítico)	2,5-6,5
16:1n-7 (palmitoléico)	<0,6
18:0 (esteárico)	0,8-3,0
18:1n-9 (oléico)	53,0-70,0
18:2n-6 (linoléico)	15,0-30,0
18:3n-3 ( $\lambda$ -linolênico)	5,0-13,0
20:0 (araquídico)	0,1-1,2
20:1 (eicosenóico)	0,1-4,3
22:0 (behênico)	<0,6
22:1n-9 (erúico)	<2,0
24:0 (lignocérico)	<0,2
24:1n-9 (nervônico)	<0,2

MAPA (2013)

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), também conhecido como pinhão do Paraguai, purgueira, pinha-de-purga, grão-de-maluco, pinhão-de-cerca, turba, tartago, medicineira, tapete, siclité, pinhão-do-inferno, pinhão bravo, figo-do-inferno, pião, pinhão-das-barbadas, sassi, dentre outros, é provavelmente originário do Brasil, tendo sido introduzido por navegadores portugueses nas Ilhas do Arquipélago Cabo Verde e Guiné, de onde foi disseminado pelo continente Africano. É uma espécie com pouca exploração comercial no Brasil, porém, apresenta-se como uma planta oleaginosa viável para a obtenção do biodiesel, pois produz, no mínimo, duas toneladas de óleo por hectare, levando de três a quatro anos para atingir a idade produtiva, que pode se estender por 40 anos. Com a possibilidade do uso do óleo do pinhão manso para a produção do biodiesel, abrem-se amplas perspectivas para o crescimento das áreas de plantio desta cultura em regiões com baixo índice pluviométrico (ARRUDA *et al.*, 2004).

Para Purcino e Drummond (1986), citados por Arruda *et al.* (2004), o pinhão manso (Figura 2.11) é uma planta produtora de óleo com todas as qualidades necessárias para ser transformado em óleo diesel. Além de perene e de fácil cultivo, apresenta boa conservação da semente colhida, podendo se tornar grande produtora de matéria-prima como fonte opcional de combustível. Para estes autores, esta é uma cultura que pode se desenvolver nas pequenas propriedades, com a mão de obra familiar disponível. Além disso, como é uma cultura perene, pode ser utilizado na conservação do solo, pois o cobre com uma camada de matéria seca, reduzindo, dessa forma, a erosão e a perda de água por evaporação, evitando enxurradas e enriquecendo o solo com matéria orgânica decomposta.

É um arbusto grande, de crescimento rápido, cuja altura normal é dois a três metros, mas pode alcançar até cinco metros em condições especiais. O fruto é capsular ovóide com

diâmetro de 1,5 a 3,0 cm. É trilobular com uma semente em cada cavidade, formado por um pericarpo ou casca dura e lenhosa, indeiscente, inicialmente verde, passando a amarelo, castanho e por fim preto, quando atinge o estágio de maturação. Contém de 53 a 62% de sementes e de 38 a 47% de casca, pesando cada uma de 1,53 a 2,85 g. Debaixo do invólucro da semente existe uma película branca cobrindo a amêndoa; albúmen abundante, branco, oleaginoso, contendo o embrião provido de dois largos cotilédones achatados. A semente de pinhão manso, que pesa de 0,551 a 0,797 g, pode ter, dependendo da variedade e dos tratos culturais, de 33,7 a 45% de casca e de 55 a 66% de amêndoa. Nessas sementes são encontradas ainda, 7,2% de água, 37,5% de óleo e 55,3% de açúcar, amido, albuminóides e materiais minerais, sendo 4,8% de cinzas e 4,2% de nitrogênio (CORTESÃO, 1956; BRASIL, 1985, citados por ARRUDA *et al.*, 2004).

Os dados de composição química em ácidos graxos e de análise físico-química do óleo de pinhão manso são apresentados nas Tabelas 2.3 e 2.4, respectivamente.



**Figura 2.11.** Planta e sementes do pinhão manso (Google Images)

**Tabela 2.3.** Composição química em ácidos graxos do óleo de pinhão manso.

Ácido graxo	Composição (%)
16:0 (palmítico)	14,3-15,5
16:1n-7 (palmitoléico)	1,3
18:0 (esteárico)	5,1-5,4
18:1n-9 (oleico)	41,1-44,2
18:2n-6 (linoleico)	34,9-38,1
18:3n-3 ( $\lambda$ -linolênico)	0,2
Ácidos saturados	19,4-20,9
Ácidos insaturados	79,1-80,6

Fonte: [www.pinhaomanso.com.br/propriedades](http://www.pinhaomanso.com.br/propriedades), consultado em 17 de fevereiro de 2011.



**Tabela 2.4.** Análise físico-química do óleo de pinhão manso.

<b>Características físico-químicas</b>	<b>Composição</b>
Teor em ácidos graxos livres (%)	0,96-6,7
Densidade a 25 °C (g/cm <sup>3</sup> )	0,9069-0,9082
Índice de refração a 25 °C	1,4680
Índice de saponificação	167,0-189,0
Índice de iodo	97,0-109,6
Insaponificáveis (%)	1,1-2,9
Índice de peróxido	9,98
Ponto de solidificação (°C)	<-10
Cor ASTM	1,0
Cinzas (%)	<0,1
Poder calorífico superior (kcal/kg)	9,35-9,38
Massa molar média (CG)	866
Viscosidade a 37,8 °C (cST)	27,3-31,5
Carbono	76,89
Hidrogênio	11,44
Oxigênio	11,67
Índice de hidroxila	76,6

Fonte: [www.pinhaomanso.com.br/propriedades](http://www.pinhaomanso.com.br/propriedades), consultado em 17 de fevereiro de 2011.

De acordo com Khalil (2006), as principais matérias-primas empregadas na produção de biodiesel são apresentadas na Tabela 2.5.

**Tabela 2.5.** Principais matérias-primas usadas na produção de biodiesel.

<b>Origem</b>	<b>Matéria-prima</b>
Vegetal	Clássicos: girassol, soja, mamona, dendê, algodão, canola, amendoim Exóticos: macaúba, babaçu, coco, pinhão manso, andiroba, moringa
Animal	Sebo bovino, banha de porco, gordura de frango
Industrial	Ácidos graxos (borra)

KAHLIL, 2006.

No Brasil a cultura da soja é a responsável pela maior produção de óleo vegetal, sendo o país o segundo maior produtor de soja do mundo. Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE, 2013), a produção do grão para a safra 2013/2014 está estimada em 81,6 milhões de toneladas. A previsão para a produção do óleo de soja é de 7,4 milhões de toneladas. Já para a canola, de acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2013) a previsão de produção do grão para a safra 2012/2013 é de 55,5 mil toneladas.

Porém, apesar da grande produção da soja no país, deve ser ressaltado que este cenário não é definitivo, uma vez que a soja é uma oleaginosa com baixo teor de óleo em sua semente, quando comparada a outras oleaginosas conforme pode ser evidenciado na Tabela 2.6.

**Tabela 2.6.** Percentual do conteúdo de óleo de oleaginosas .

<b>Material oleaginoso</b>	<b>Conteúdo de óleo (%)</b>
Coco	66-68
Babaçu	60-65
Gergelim	50-55
Polpa de palma (dendê)	45-50
Caroço de palma (palmiste)	45-50
Amendoim	45-50
Canola	40-45
Girassol	35-45
Açafrão	30-35
Oliva	25-30
Algodão	18-20
Soja	18-20

INNOCENTINI, 2007.

### 2.11.1. Álcoois utilizados na síntese de biodiesel por transesterificação

Dentre os diversos alcoóis orgânicos, o metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), o etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), o propanol ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$ ) e o butanol ( $\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$ ) podem ser usados para a produção de biodiesel. O metanol é o álcool mais utilizado no mundo para a produção de biodiesel, devido ao seu baixo custo de produção em países como os EUA, quando comparado com a produção do etanol (HAAS e FOGLIA, 2006).

Entretanto, este panorama se modifica quando se trata da utilização do etanol para a produção de biodiesel no Brasil. O país é o maior produtor mundial de etanol a partir a cana-de-açúcar como matéria-prima. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013), a perspectiva de produção total de etanol no Brasil, na safra 2012/2013 é de 23,6 bilhões de litros. Estima-se cerca de 70 mil agricultores em todo o país e 393 usinas, distribuídas, principalmente, nas regiões Centro-Sul (responsável por 89% da produção de álcool) e Norte-Nordeste (11% restantes) (PAULILLO *et al.*, 2007).

A Tabela 2.7 mostra algumas vantagens e desvantagens de metanol e etanol na produção de biodiesel no Brasil.

**Tabela 2.7.** Vantagens e desvantagens do metanol e etanol na produção do biodiesel.

<b>Álcool</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Metanol	Menor custo	Não renovável (obtido por via petroquímica)
	Menor consumo	Risco à saúde
	Maior reatividade	Produto importado
	Não higroscópico	Não biodegradável
Etanol	Maior rendimento	Maior consumo
	Maior oferta	Maior custo
	Renovável	Higroscópico
	Biodegradável	Menor reatividade

Fonte: KAHLIL, 2006.

## 2.12. Propriedades do biodiesel

As propriedades dos ésteres que constituem o biodiesel determinam as propriedades finais do combustível. Estas propriedades são determinadas pelas características estruturais das moléculas do ácido graxo e do álcool utilizados na produção do éster, como o grau de insaturação, o comprimento da cadeia e a presença de ramificações (KNOTHE, 2005).

Dentre as vantagens associadas ao biodiesel, menciona-se a possibilidade de substituir parcialmente o diesel de petróleo sem a necessidade de efetuar alterações na regulagem do motor. Tal vantagem seria particularmente importante ao utilizar as misturas de biodiesel em motores que já estejam em uso e quando seja preciso manter a capacidade do motor de operar com óleo diesel convencional. Entretanto, embora seja desejável, a decisão de não fazer alterações na regulagem do motor deve ser tomada somente após uma criteriosa avaliação da operação do motor com o novo combustível, pois sua utilização deveria garantir pelo menos a mesma qualidade de combustão obtida com o combustível convencional. Diversas características influenciam a qualidade de combustão no motor diesel e entre elas aparece com destaque o atraso da ignição (BUENO e VELÁSQUEZ, 2007). Na Tabela 2.8 são apresentados parâmetros a serem avaliados, com relação à qualidade do biodiesel.

O número de cetano é um indicador adimensional que caracteriza a qualidade da ignição dos combustíveis em motores de injeção por compressão. Teoricamente, o número de cetano é definido em um intervalo entre 15 e 100. Os limites são dados por dois combustíveis de referência na determinação experimental do índice: um hidrocarboneto de cadeia linear (hexadecano,  $C_{16}H_{34}$ , também chamado de n-cetano) muito sensível à ignição, tendo um número de cetano de 100, e um hidrocarboneto de cadeia ramificada, 2,2,4,4,6,8,8-heptametilnonano ( $C_{16}H_{34}$ , isocetano), com elevada resistência à ignição, tendo um número de cetano de 15. O número de cetano mínimo para o biodiesel é de 51 na Europa, 47 nos Estados Unidos e 45 no Brasil (BARABÁS e TODORUT, 2011).

Outra propriedade importante do biodiesel é a viscosidade, que representa resistência ao escoamento, podendo prejudicar o funcionamento do motor. Quanto maior a viscosidade, maior a tendência de ocasionar problemas no processo de atomização. Desta maneira, poderá haver formação de depósitos no motor e danos no sistema de injeção. Apesar de ser favorável do ponto de vista energético, o uso de óleos *in natura* como alternativa para combustíveis foi relativamente abandonado, devido à alta viscosidade dos óleos (SCHWAB; BAGBY; FREEDMAN, 1987).

**Tabela 2.8.** Padrões de qualidade do biodiesel.

Característica	Unidade	Brasil ANP 07/2008	UE EN 14214	EUA ASTM D6751
Aspecto		Límpido e isento de impurezas		
Massa específica*	kg·m <sup>-3</sup>	850-900 a 20 °C	860-900 a 15 °C	
Viscosidade cinemática 40 °C*	mm <sup>2</sup> ·s <sup>-1</sup>	3,0-6,0	3,5-5,0	1,9-6,0
Água e sedimentos, máx.*	% vol.			0,05
Ponto de fulgor, mín.*	°C	100	120	130
Destilação: 90% vol. recup., máx.*	°C			360
Resíduo de carbono, máx.*	% massa	0,05 (100% amostra)	0,3 (10% residual da destilação)	0,05 (100% amostra)
Cinzas sulfatadas, máx.*	% massa	0,02	0,02	
Enxofre total, máx.*	mg·kg <sup>-1</sup>	50	10	15
Corrosividade ao cobre, máx.*		1	1	3
Número de cetanos*		Anotar	51 (mín.)	47 (mín.)
Ponto de entup. de filtro a frio, máx.*	°C	19	Por região	
Ponto de fluidez (PP)*	°C		Por região	
Ponto de nuvem (CP)*	°C			Anotar
Sódio + potássio, máx.	mg·kg <sup>-1</sup>	5	5	
Cálcio + magnésio, máx.	mg·kg <sup>-1</sup>	5	5	
Fósforo, máx.	mg·kg <sup>-1</sup>	10	10	10
Contaminação total, máx.	mg·kg <sup>-1</sup>	24	24	
Teor de éster, mín.	% massa	96,5	96,5	
Índice de acidez, máx.	mg KOH·g <sup>-1</sup>	0,5	0,5	0,5
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	0,02	0,02
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	0,25	0,24
Monoacilgliceróis	% massa	Anotar	0,8 (máx.)	
Diacilgliceróis	% massa	Anotar	0,2 (máx.)	
Triacilgliceróis	% massa	Anotar	0,2 (máx.)	
Metanol ou etanol, máx.	% massa	0,2	0,2	
Índice de iodo	g I <sub>2</sub> ·100 g <sup>-1</sup>	Anotar	120 (máx.)	
Estabilidade à oxidação 110 °C, mín.	h	6	6	
Água, máx.	mg·kg <sup>-1</sup>	500	500	500
Ácido linolênico	% massa		12 (máx.)	

\*Parâmetros típicos da normatização do diesel mineral. Fonte: LÔBO, FERREIRA e CRUZ (2009).

A investigação da utilização de diferentes óleos vegetais na substituição direta do diesel mostrou que a sua combustão conduz à carbonização na cabeça do injetor, resistência à injeção nos segmentos dos êmbolos, diluição do óleo do cárter, contaminação do óleo lubrificante, entre outros problemas. Isto pode ser explicado pela polimerização que ocorre nas duplas ligações dos triacilgliceróis, levando à formação de depósitos. O processo de transesterificação se apresenta como alternativa na tentativa de reduzir a

viscosidade inicial do óleo ou gordura para valores similares do diesel (KNOTHE, 2006; RAMOS *et al.*, 2003).

Estudos realizados nessa área investigaram a relação que as matérias-primas e os álcoois reagentes têm sobre as diversas propriedades do biodiesel. Geralmente, número de cetano, calor de combustão, ponto de fusão e viscosidade aumentam com o aumento da cadeia dos ácidos graxos e diminuem com o aumento da insaturação dos ácidos graxos (KNOTHE, 2005).

O índice de acidez, outra propriedade relevante do biodiesel, indica a quantidade de substâncias ácidas no combustível sob condições específicas, podendo indicar o nível de degradação do lubrificante, durante o uso do combustível (FERNANDO; KARRA; HERNANDEZ, 2007). O monitoramento da acidez no biodiesel é de grande importância durante a estocagem, na qual a alteração dos valores neste período pode significar a presença de água. O método recomendado pela EN 14214 é o EN 14104, que utiliza uma solução alcoólica de KOH como titulante e fenolftaleína como indicador. A ASTM recomenda o método potenciométrico D 664 (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

Com relação ao glicerol, que é um subproduto da reação de transesterificação de óleos e gorduras, pode-se afirmar que altas concentrações deste composto no biodiesel provocam problemas de armazenamento, pois quando o biodiesel é misturado com o diesel de petróleo, observa-se a separação do glicerol nos tanques de estocagem. Problemas como formação de depósitos, entupimento dos bicos injetores do motor e emissões de aldeídos também estão relacionados com a alta concentração do glicerol no biodiesel. Tanto no Brasil, quanto na Europa e nos Estados Unidos, o teor máximo permitido de glicerol livre no biodiesel é de 0,02%, em massa, e a sua determinação pode ser realizada por métodos cromatográficos EN ISO 14105 e EN ISO 14106, estabelecidos pela norma européia, e o método ASTM D6584, pela norma americana. Esses métodos de análise também foram adotados pela norma brasileira, havendo ressalva quanto à necessidade de validação para biodieseis de matérias-primas não previstas nos métodos e proveniente da rota etílica. Para biodieseis de misturas de matérias-primas distintas, onde faça parte o óleo de mamona, a RANP 07/08 recomenda o método ABNT NBR 15341. O glicerol combinado, que inclui mono-, di- e triacilgliceróis é proveniente da reação incompleta dos glicerídeos, logo, este é um importante parâmetro que pode ser utilizado para avaliar a eficiência da conversão de óleos e gorduras em biodiesel. O glicerol combinado pode ser calculado a partir das concentrações de mono-, di- e triacilgliceróis, aplicando-se fatores de conversão individuais baseados na massa molar média dos ácidos graxos que participam da

composição da matéria-prima (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

Atualmente a cromatografia a gás em altas temperaturas (High temperature gas chromatography – HTGC) é a técnica cromatográfica mais amplamente utilizada para a análise de glicerol livre e total em biodiesel. Os métodos analíticos americano e europeu foram desenvolvidos para análise de glicerol livre e total, tendo como base biodieseis metílicos de soja (ASTM D6584), canola e girassol (EN ISO 14105), respectivamente. A cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) é apontada como alternativa por apresentar vantagens como: não necessita de derivatização, menor tempo de análise e pronta quantificação de alquilésteres, ácidos graxos livres, triacilgliceróis, 1,2- e 1,3-diacilgliceróis, 1- e 2-monoacilgliceróis, o que permite seu emprego no monitoramento da reação de transesterificação. Por outro lado, o número grande de informações obtidas pela CLAE pode ser interpretado como desvantagem, tendo em vista o grande número de compostos existentes no biodiesel. Uma outra desvantagem da CLAE é a impossibilidade de se determinar na mesma corrida o glicerol livre (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

O teor de ésteres metílicos no biodiesel é um parâmetro previsto na norma EN 14214 e na RANP 07/08, cuja porcentagem mínima exigida de éster é de 96,5%, em massa, a ser determinada pelo método cromatográfico EN ISO 14103. A massa do éster é obtida pela comparação da área total dos picos correspondentes com a área do pico do heptadecanoato de metila, utilizado como referência. A norma europeia estabelece ainda o controle da concentração de ésteres poli-insaturados no biodiesel, devido à sua propensão à oxidação, fixando um valor máximo de 12%, em massa, para o linolenato de metila e 1%, em massa, para ésteres metílicos com mais de três insaturações. Neste caso, o mesmo método EN 14103 é empregado e o teor do éster é calculado pela razão entre a área do pico do éster em questão pela área do pico da substância de referência. A quantificação de ésteres em biodiesel por CLAE também tem sido estudada, objetivando inclusive o seu emprego no monitoramento do processo produtivo (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

O ponto de fulgor é a temperatura mínima onde é observada a liberação de vapores de um líquido, em quantidade suficiente para formar uma mistura inflamável com o ar. Para o biodiesel, os valores de ponto de fulgor são consideravelmente mais elevados que os valores encontrados para o diesel mineral. Para o biodiesel puro o valor do ponto de fulgor encontra-se próximo aos 170 °C, porém, mínimas quantidades de álcool adicionadas ao biodiesel ocasionam um decréscimo bastante significativo neste valor. Este comportamento torna o ponto de fulgor um parâmetro muito importante quanto à segurança no armazenamento e no transporte, principalmente quando a transesterificação for realizada

com metanol que, além de altamente inflamável, apresenta elevada toxidez. Quanto aos valores de ponto de fulgor permitidos para o biodiesel, a norma ASTM D6751 (método analítico ASTM D93) é a mais restritiva dos três parâmetros de qualidade de biodiesel que estão sendo analisados, fixando um valor mínimo de 130 °C, enquanto a norma EN 14214 (método analítico EN ISO 3679) estabelece o valor de 120 °C e a RANP 07/08 o valor de 100 °C. A RANP 07/08 recomenda, além dos métodos citados, o método ABNT NBR 14598 (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

À baixa temperatura, o biodiesel tende a solidificar-se parcialmente ou a perder sua fluidez, levando à interrupção do fluxo do combustível e entupimento do sistema de filtração, ocasionando problemas na partida do motor. A partir deste comportamento, foram elaborados três ensaios de laboratório: ponto de névoa (*cloud point* - CP), que é a temperatura do combustível em um processo de resfriamento, onde se observa formação dos primeiros cristais (método ASTM D2500); ponto de entupimento de filtro a frio (*cold-filter plugging point* - CFPP), que é a temperatura em que o combustível perde a filtrabilidade quando resfriado (método EN ISO 116/método similar americano: LTFT - *low temperature flow test* - ASTM D 4539); ponto de fluidez (*pour point* - PP), que é a temperatura em que o combustível perde sua fluidez quando sujeito a resfriamento sob determinadas condições de teste (método EN ISO 3016). No Brasil, excetuando biodiesel puro de mamona, é estabelecida a determinação do ponto de entupimento de filtro a frio para o biodiesel, conforme os métodos ABNT NBR 14747, EN ISO 116 e ASTM D6371 (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

### **2.13. Fatores que influenciam a síntese de biodiesel por rota enzimática**

Para a obtenção do biodiesel por catálise enzimática, alguns fatores devem ser levados em consideração, como a origem da enzima, quantidade de enzima, razão molar entre os reagentes óleo e álcool, tipo de álcool, uso de solvente orgânico na reação, quantidade de água adicionada na mistura de reação, temperatura da reação e utilização da enzima em operações repetidas.

A razão molar entre álcool e substrato utilizados na reação é uma das variáveis mais importantes na produção de biodiesel. A estequiometria da reação indica uma razão álcool:substrato de 3:1. Contudo, em reações que utilizam catalisadores químicos, um excesso de álcool acima desta razão é empregado para assegurar uma alta taxa de reação e minimizar os efeitos de difusão. Entretanto, na síntese enzimática níveis excessivos de

álcool podem inibir a enzima e diminuir sua atividade catalítica ao longo da reação (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005).

De acordo com Salis *et al.* (2005), uma alta razão álcool:substrato significa uma maior polaridade do meio, produzida pelo álcool e pela água. Uma alta polaridade é frequentemente associada com a inativação do biocatalisador (RODRIGUES *et al.*, 2008a). A diminuição da atividade enzimática e do rendimento de ésteres em altas concentrações de álcool demonstra a capacidade do excesso de álcool em remover a camada de água essencial que estabiliza os biocatalisadores imobilizados (KOSE; TUTER; AKSOY, 2002).

O álcool utilizado para a reação de transesterificação determina a necessidade de uso de um solvente orgânico. Álcoois de cadeia menor, como metanol e etanol, apresentam uma solubilidade menor nos óleos normalmente utilizados para a produção de biodiesel. Álcoois com cadeia maior, como propanol ou butanol, apresentam melhor solubilidade ao óleo e dispensam o uso de um solvente orgânico na reação. Para Iso *et al.* (2001), Watanabe *et al.* (2001), Royon *et al.* (2007) e Salum *et al.* (2010) a utilização de solvente na síntese de biodiesel torna-se pouco viável, pois requer uma etapa de extração após o fim da reação, gerando custos adicionais e maior consumo de energia no processo.

As reações de transesterificação não envolvem água, porém sua presença em pequena quantidade torna-se desejável, pelo fato de atuar como lubrificante, mantendo a enzima na sua conformação ativa. Contudo, o excesso pode gerar limitação difusional ou até mesmo hidrólise do substrato, com conseqüente diminuição de rendimento da reação (SALIS *et al.*, 2005).

A atividade das lipases geralmente depende da disponibilidade da área interfacial. Com o aumento na adição de água, a formação de gotículas óleo-água é maior, aumentando a disponibilidade de área interfacial. Entretanto, desde que lipases usualmente catalisam hidrólise em meio aquoso, um excesso de água pode estimular esta reação competitiva pelo substrato (RODRIGUES, 2008b).

### **2.13.1. Influência dos álcoois empregados na transesterificação enzimática**

Nas reações de transesterificação que envolvem biocatalisadores, a utilização de metanol e etanol promove uma rápida desativação da enzima. Já para álcoois com três ou mais carbonos esta desativação não é verificada. Deve-se destacar que a resistência à desativação pelo álcool da enzima, bem como sua atividade, depende do microrganismo da qual foi isolada e das condições reacionais. Para minimizar este problema foram apontadas



algumas estratégias, tais como o uso de água, que não diminui a atividade do sistema, mas evita a desativação da enzima pelo metanol, a adição sucessiva do álcool em pequenas quantidades ou, ainda, o uso de solventes orgânicos, tais como dioxano, éter de petróleo ou hexano (SUAREZ *et al.*, 2007).

Nas reações que utilizam metanol, o efeito inibidor que o álcool exerce sobre a enzima pode ser diminuído pela utilização de solvente, neste caso o t-butanol, embora esta etapa possa aumentar o custo final de produção do biodiesel (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008).

Na determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol, Gomes *et al.* (2006) avaliaram a influência do tamanho da cadeia do ácido carboxílico na conversão do butanol aos ésteres correspondentes, pela incubação do *n*-butanol e diversos ácidos carboxílicos (ácido butírico, octanóico e láurico) em uma razão molar fixa (1:1). Observaram que os diferentes ácidos testados conduziram a valores bastante similares de conversão do butanol (60,1 a 73,9%). A conversão máxima foi alcançada para o sistema butanol e ácido octanóico (73,9%) e a redução da conversão observada para o sistema butanol e ácido láurico (12 carbonos) pode sugerir um efeito negativo do tamanho da cadeia carbônica, restringindo o acesso dos reagentes ao sítio ativo da enzima. Para verificar se essa limitação foi referente ao número total de carbonos do substrato (álcool + ácido), ou mais especificamente ao tamanho da cadeia do ácido carboxílico (doador do grupo acila), foi também determinada a influência do tamanho da cadeia do álcool na síntese de ésteres derivados do ácido octanóico. Com exceção dos ésteres octanoato de etila e de propila, os diferentes ésteres de octanoato foram obtidos com conversões superiores a 75%, sendo ainda constatado consumo similar de ambos os materiais de partida. Nos sistemas reacionais constituídos por ácido octanóico e etanol ou propanol, não houve consumo do doador do grupo acila, apesar do aparente consumo total dos alcoóis (etanol ou propanol). Os autores atribuíram estes resultados aos elevados graus de volatilidade e polaridade desses alcoóis, ocasionando dois efeitos: evaporação e/ou adsorção desses compostos no derivado imobilizado (migração ou partição do álcool para a parte sólida do meio reacional) justificando, desta forma, o consumo aparente desses alcoóis no meio reacional.

A razão molar de substrato é uma variável com grande influência na reação de síntese de biodiesel. Álcool em excesso da razão estequiométrica de 3:1 é usado para assegurar uma alta taxa de reação e minimizar as limitações de difusão. Porém, uma grande

quantidade de álcool presente no meio reacional pode ocasionar uma inibição competitiva da enzima pelo substrato (BOUSQUET-DUBOUCH *et al.*, 2001; YADAV e DEVI, 2004).

#### **2.14. Reações de transesterificação utilizando lipases imobilizadas**

A transesterificação enzimática utilizando lipase como biocatalisador é uma alternativa aos métodos de catálise convencionais que usam agentes químicos, visto que as enzimas são catalisadores presentes na natureza, não poluentes e altamente específicos. A obtenção de biodiesel utilizando enzimas como catalisadores apresenta virtudes como a obtenção do produto de interesse específico, operação em condições brandas, e nos casos onde o biocatalisador está imobilizado em um suporte inerte, permite sua fácil recuperação do meio reacional e reutilização em vários ciclos.

Embora apresente grandes vantagens, a transesterificação enzimática para obtenção de biodiesel pode apresentar alguns inconvenientes, como a desativação ou inibição do biocatalisador. Segundo Bako *et al.* (2002), efeitos de inibição enzimática ocorrem durante a reação devido à concentração de glicerol no meio reacional. Realizando uma etapa de remoção contínua do subproduto por meio de diálise, a uma taxa de remoção de 85 mL de glicerol/litro de meio reacional, os autores obtiveram uma conversão de 97% a 50 °C. Xu *et al.* (2004) utilizaram isopropanol para a remoção do glicerol em um processo de transesterificação com óleo de soja e metanol, catalisado por lipase de *Thermomyces lanuginosus*. Observaram um rendimento máximo de 98%, a 40 °C, e conversão de 94% após 15 repetições. De acordo com Antczak *et al.* (2009) a síntese enzimática de biodiesel pode ser conduzida com temperatura variando entre 20 e 60 °C, e o glicerol (fase inferior da reação) pode ser facilmente separado do biodiesel produzido (fase superior da reação), sem necessidade de neutralização de odores no produto final, como ocorre em reações que utilizam catálise química. Os mesmos autores afirmam que um pequeno excesso de álcool no meio reacional pode gerar um aumento no rendimento da reação, principalmente em casos onde se utilizam enzimas imobilizadas, e que baixas concentrações de água afetam positivamente a produção de biodiesel. Ainda, indicam que a reação pode ser conduzida sem adição de solventes orgânicos, já que neste tipo de sistema reacional as lipases podem catalisar a conversão de óleos a alquil ésteres de ácido graxo, com a adição de álcool no início da reação. Na Tabela 2.9 é apresentado um comparativo de produção de biodiesel entre os processos conduzidos por rota alcalina e enzimática, mostrando vantagens e desvantagens entre ambos.

**Tabela 2.9.** Comparação entre o processo enzimático e o processo alcalino para a produção de biodiesel.

<b>Problema</b>	<b>Processo Alcalino</b>	<b>Processo Enzimático</b>
Temperatura da reação	60-70°C	40-60°C
Ácidos graxos livres presentes no óleo	Os ácidos graxos livres presentes no óleo são transformados em sabão.	Os ácidos graxos livres presentes no óleo são transformados em biodiesel.
Presença de água no óleo	A água pode hidrolisar o óleo, formando mais sabão.	A água não interfere na reação.
Rendimento da reação	Alto	Alto
Recuperação do glicerol	Complexa, glicerol de baixa qualidade.	Fácil, glicerol de alta qualidade.
Custo do processo	Baixo	Alto
Recuperação do Catalisador	Difícil ou inviável	Fácil (enzima imobilizada)
Impacto Ambiental	Médio, são gerados efluentes alcalinos e salinos	Baixo

Fonte: FUKUDA, KONDO e NODA (2001); ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009.

A Tabela 2.10 apresenta alguns trabalhos publicados na síntese de biodiesel empregando lipases imobilizadas. Diversas matrizes são empregadas na imobilização das enzimas, como resinas, polímeros e resíduos da agroindústria. Os óleos utilizados são de diversas fontes, como a canola, a soja, o milho e o pinhão manso. Os rendimentos obtidos são, na maioria, superiores a 90%, e a maior parte das reações conduzidas em sistema batelada, com tempos reacionais variando de 1 a 120 h. Destacam-se os trabalhos realizados pelos autores citados que não empregam solventes no meio reacional, para as diferentes fontes de lipase. Esta característica facilita os processos de separação do produto desejado e diminui os custos de produção do biodiesel.

**Tabela 2.10.** Exemplos da produção de biodiesel em diferentes condições utilizando lipases

<b>Autor</b>	<b>Suporte</b>	<b>Lipase</b>	<b>Óleo</b>	<b>Álcool</b>	<b>Rendimento</b>	<b>Tempo</b>	<b>Cossolvente</b>	<b>Sistema</b>
Shimada <i>et al.</i> (1999)	resina acrílica (Novozym 435)	<i>Candida antarctica</i>	soja e canola (mistura)	metanol	98,4%	72 h	ausente	batelada
Hernández-Martín e Otero (2008)	resina acrílica (Lipozyme TL IM)	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	soja	etanol	84%	24 h	ausente	batelada
Watanabe <i>et al.</i> (2001)	resina acrílica (Novozym 435)	<i>Candida antarctica</i>	soja e canola (mistura)	metanol	90%	50 h	ausente	contínuo
Chen <i>et al.</i> (2009)	membrana de tecido	<i>Candida</i> sp. 99-125	resíduos de óleos vegetais	metanol	76,74%	100 h	hexano	contínuo
Chang <i>et al.</i> (2005)	resina acrílica (Novozym 435)	<i>Candida antarctica</i>	canola	metanol	97,9%	12,4h	n-hexano	batelada
Dizge e Keskinler (2008)	espuma de poliuretano	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	canola	metanol	90%	24h	ausente	batelada
Dizge, Keskinler e Tanriseven (2009)	matriz polimérica	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	canola	metanol	97%	24 h	ausente	batelada
Shah e Gupta (2007)	terra diatomacea	<i>Burkholderia cepacia</i>	pinhão manso	metanol	98%	8 h	ausente	batelada
Kumari <i>et al.</i> (2009)	sílica	<i>Enterobacter aerogenes</i>	pinhão manso	metanol	94%	48 h	<i>t</i> -butanol	batelada
Shah, Sharma e Gupta (2004)	terra diatomacea	<i>Chromobacterium viscosum</i>	pinhão manso	etanol	89%	10 h	ausente	batelada
Noureddini, Gao e Philkana (2005)	sol-gel	<i>Burkholderia cepacia</i>	soja	etanol	65%	1 h	ausente	batelada
Yang, Guo e Yan (2007)	ausente	<i>Burkholderia cepacia</i> cepa G63	soja	metanol	87,4%	72 h	ausente	batelada
Salum <i>et al.</i> (2010)	bagaço de cana de açúcar fermentado e liofilizado	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	soja	etanol	95%	46 h	ausente	contínuo
Fernandes <i>et al.</i> (2007)	farelo de milho fermentado e liofilizado	<i>Burkholderia cepacia</i>	milho	etanol	94,7%	120 h	<i>n</i> -heptano	batelada
Kawakami, Oda e Takahashi (2011)	sílica	<i>Burkholderia cepacia</i>	pinhão manso	metanol	90%	12 h	ausente	batelada
Da Rós <i>et al.</i> (2012)	matriz polimérica SiO <sub>2</sub> -PVA	<i>Burkholderia cepacia</i>	sebo bovino	etanol	98%	8 h	ausente	micro-ondas

## 2.15. Produção enzimática de biodiesel em sistema contínuo

No estudo da transesterificação enzimática contínua, do óleo de girassol com butanol, Dossat, Combes e Marty (1999) observaram a influência da produção de glicerol na reação, conduzida com a adição de solvente (n-hexano). Os autores notaram que parte do glicerol formado na reação e não solubilizado em n-hexano foi adsorvido pelo suporte enzimático (resina aniônica granular), diminuindo drasticamente a atividade enzimática. Concluíram que este fenômeno foi atribuído a impedimentos hidrofílicos em torno da enzima imobilizada, resultando numa limitação difusional do substrato hidrofóbico, da fase orgânica até o sítio ativo da enzima. Para a recuperação da atividade catalítica da enzima, os autores utilizaram uma solução de um álcool terciário e água, a fim de manter a atividade de água em 0,54, para lavar o leito catalítico e eliminar o glicerol adsorvido, obtendo assim altas conversões na reação.

Este problema se torna mais grave em operações de sistemas contínuos. Marty *et al.* (1997) conduziram estudos de esterificação de ácido oléico com etanol e transesterificação de trioleína com etanol em n-hexano, em um reator de leito fixo, utilizando a lipase imobilizada. Observaram uma queda acentuada na atividade enzimática, explicada pela adsorção de produtos polares, água ou glicerol no suporte enzimático. A criação de uma camada hidrofílica provavelmente limitou a difusão do substrato hidrofóbico do meio até o biocatalisador.

Chen *et al.* (2009) estudaram a síntese de biodiesel com a utilização de resíduos de óleo alimentar e metanol, na presença de solvente (hexano), utilizando lipase de *Candida* sp. 99-125, isolada a partir de resíduo de esgoto no norte da China, imobilizada como catalisador. A reação foi conduzida em três etapas utilizando reator de leito fixo. Nos parâmetros reacionais estudados pelos autores, observaram que a taxa de produção de éster metílico de ácido graxo teve aumento pouco significativo quando a quantidade de biocatalisador imobilizado foi aumentada de 25% para 35%, em relação ao óleo. Com relação à utilização do solvente, a produção dos ésteres diminuiu quando a quantidade de hexano variou entre 15% e 20% em relação ao óleo, com o sistema sendo composto por 25% de biocatalisador e 10% de água em relação ao óleo, a 40 °C e vazão de 1 mL·min<sup>-1</sup>. A quantidade ótima de água foi de 10% em relação ao óleo, a temperatura ótima de reação foi de 45 °C e vazão ótima foi de 1,2 mL·min<sup>-1</sup>. A taxa máxima de conversão dos ésteres foi de 91,08% em 100 h. Após este período, houve uma diminuição na conversão de, aproximadamente, 15%.

Na avaliação da produção contínua de biodiesel de resíduo de óleo de palma com metanol (4:1, mol/mol, em relação do óleo), utilizando lipase de *Candida antarctica* B imobilizada em resina acrílica e t-butanol (1:1, mol/mol, em relação ao óleo) como solvente, Halim, Kamaruddin e Fernando (2009) conduziram os estudos em reator de leito fixo, com 1 cm de diâmetro interno e 18 cm de comprimento. Obtiveram rendimento máximo de 79,1% de ésteres de ácidos graxos com um fluxo reacional de  $0,57 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e altura do leito catalítico de 10,53 cm.

Nie *et al.* (2006) estudaram a produção de biodiesel, aplicando uma lipase de *Candida* sp. imobilizada em membrana de algodão como catalisador, na transesterificação de óleo vegetal residual para alimentação, em reator de leito fixo. A transesterificação foi conduzida em três etapas com metanol, usando uma série de nove colunas recheadas com o biocatalisador imobilizado. Como substrato da primeira etapa da reação, óleo vegetal e resíduo foram empregados com 1/3 de equivalente molar de metanol. Uma mistura do eluente do primeiro e segundo passos e 1/3 de equivalente molar de metanol foram utilizados na alimentação da segunda e terceira etapas de reação. Um hidrociclone foi utilizado na linha para separar o glicerol após cada 1/3 de equivalente molar de metanol adicionado. Éter de petróleo foi usado como solvente da reação (3/2, v/v de óleo). A conversão final de metil éster de ácido graxo do óleo vegetal e do resíduo de óleo foi de 93% e 92%, respectivamente. Os melhores resultados foram observados com um fluxo reacional entre  $12$  e  $14 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ , a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  e 27 h de reação. A estabilidade operacional da lipase imobilizada foi de mais de 20 dias.

Tendo em vista a produção de biodiesel em sistema contínuo, o uso do óleo de pinhão manso torna-se interessante pelo fato de ser um óleo sem aplicação comercial, com propriedades tóxicas e de baixo valor comercial. Por apresentar composição similar ao óleo de canola (ambos possuem grandes quantidades de ácido oléico e linoléico), este último pode ser utilizado na obtenção do biocombustível como padrão de comparação de rendimento e conversão final, em relação ao pinhão manso. O emprego de enzimas imobilizadas em reator de leito fixo torna possível seu reuso em vários ciclos reacionais e a preparação de matrizes hidrofóbicas obtidas com aditivos e diferentes tipos de secagem pode conferir ao biocatalisador melhores propriedades de atuação catalítica. A utilização das enzimas neste processo também possibilita o uso de óleos com alto índice de acidez, como é o caso do pinhão manso. Segundo Deeba *et al.* (2012) uma das vantagens da transesterificação enzimática é que óleos com alto teor de ácidos graxos livres podem ser transesterificados em reações catalisadas por lipases, sem a formação de sabões e com uma

menor demanda de energia, em comparação com a catálise química. Os autores conduziram a transesterificação enzimática, para a produção de biodiesel, do óleo de pinhão manso contendo cerca de 12% de ácidos graxos livres. Rivera, Villanueva e Sandoval (2009) também realizaram a produção de biodiesel pela transesterificação enzimática de resíduos de gorduras animais com alto índice de acidez, com um rendimento de ésteres de, aproximadamente, 65%.

Nos testes em batelada, a condução da reação de transesterificação com adição do álcool em etapas distintas pode evitar a inativação da enzima, já que a diminuição da atividade enzimática e do rendimento de ésteres em altas concentrações de álcool demonstra a capacidade do excesso de álcool em remover a camada de água essencial que estabiliza os biocatalisadores imobilizados (KOSE; TUTER; AKSOY, 2002).

Espera-se que a produção de biodiesel com óleo de canola e pinhão manso apresente condições favoráveis para atingir rendimento e conversão elevados, por meio da reação de transesterificação em processo contínuo, bem como um comportamento favorável à utilização da enzima imobilizada em matriz hidrofóbica com precursores TEOS e TMOS, justificando a encapsulação do biocatalisador nestes suportes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão descritas as metodologias e material empregados na imobilização de lipases e na produção de biodiesel.

#### 3.1. Materiais

Neste item são apresentados os equipamentos e os reagentes empregados no trabalho.

##### 3.1.1. Equipamentos

Os principais equipamentos empregados foram:

- Balança analítica METLER AE200;
- Espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN- $H^1$ ), marca VARIAN, modelo Mercury Plus BB, 300MHz;
- Termobalança marca SHIMADZU, modelo TGA-50;
- Calorímetro diferencial de varredura marca SHIMADZU, modelo DSC-50;
- pHmetro TECNAL, modelo TEC-2;
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência marca Varian, modelo 920-LC;
- Coluna para análise de CLAE marca Thermo Scientific, ODS-C18 de fase reversa, 250x70 mm e tamanho de partícula de 5  $\mu$ m.
- Cromatógrafo a gás marca Varian, modelo CP-3800 ;
- Equipamento de análise de BET marca Quantachrome, modelo NOVA 1200;
- Microscópio eletrônico de varredura marca Leica, modelo LEO 440i;
- Espectrofotômetro Infravermelho marca Bomem, modelo MB-100;
- Banho termostatizado com controle de agitação marca TECNAL;
- Reatores batelada encamisados de 50 mL, marca DIST;
- Coluna de leito fixo encamisada com 1 cm de diâmetro interno e 30 cm de altura.
- Equipamento para a extração do óleo marca Bind Galvão, modelo 7590-B100.

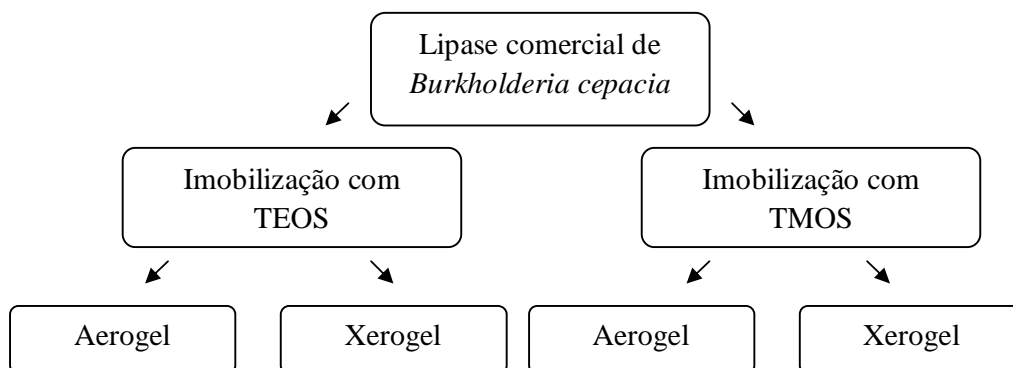


### 3.1.2. Reagentes e substratos

A lipase de *Burkholderia cepacia* (10000 U), os precursores de sílica tetrametil-ortossilicato (TMOS) e o tetraetil-ortossilicato (TEOS), butirato de metila, ácido butírico, álcool 2-fenetílico, acetato de vinila, 2-fenetil acetato, peneiras moleculares (0,32 cm de diâmetro (silicato de sódio e alumínio) tipo 13 X-BHD), éter diisopropílico, etanolamina e os padrões empregados na realização da curva padrão para a quantificação dos ésteres etílicos foram adquiridos da companhia Sigma Co, St. Louis, MO, EUA. Azeite de oliva da marca Carbonell foi adquirido no comércio local. Etanol absoluto, da marca Cinética, Brasil foi empregado. Ácido clorídrico, hidróxido de amônio, polietileno glicol (PEG-1500), goma arábica e ácido o-fosfórico foram adquiridos da Synth, Brasil. Brometo de cetiltrimetilamônio (CTMABr) da Acros Organics foi utilizado. Os reagentes utilizados em CLAE foram: n-hexano, álcool n-propílico (Mallinckrodt Chemicals) e acetonitrila (J.T. Baker). Os demais materiais e reagentes foram adquiridos em grau analítico. O óleo de canola empregado na produção dos ésteres etílicos foi da marca Salada, lote 0512. O óleo de pinhão manso foi extraído por extrusão a frio das sementes, adquiridas de produtores do estado de São Paulo.

### 3.2. Imobilização pelo método sol-gel

Os métodos de imobilização sol-gel utilizados são os propostos por Soares *et al.* (2004) e Macario *et al.*, (2009), que empregam como precursores de sílica do suporte de imobilização o TEOS e o TMOS, respectivamente. Nesses casos foram variadas as condições de secagem do suporte pelos métodos de xerogel (evaporação) e aerogel (CO<sub>2</sub> supercrítico). O fluxograma da Figura 3.1 apresenta a relação entre os métodos de imobilização sol-gel utilizados para a produção de lipase imobilizada.



**Figura 3.1.** Métodos de imobilização empregados para a lipase de *Burkholderia cepacia*

### 3.2.1. Imobilização da enzima com precursor TEOS

Para a imobilização da lipase com TEOS, foi empregada a metodologia adaptada de Soares *et al.* (2004). Inicialmente, aqueceu-se glicerina a 35 °C no interior de um recipiente, no qual foi colocado um balão de 250 mL de três bocas, acoplado a um funil de adição. No balão de três bocas adicionou-se 72 mL de etanol absoluto (99%), sendo que este foi acondicionado em atmosfera inerte de nitrogênio, com a finalidade de evitar a degradação do precursor de sílica utilizado. Em seguida, adicionou-se 62 mL de TEOS no balão de três bocas, por meio do funil de adição. Agitou-se esta mistura por 5 min (200 rpm) a 35 °C, com o balão fechado, mantendo-se o fornecimento de gás inerte por uma das bocas do balão. Preparou-se uma segunda solução com 0,22 mL de HCl (36% v/v) em 5 mL de água deionizada (solução pré-hidrolisante). Adicionou-se lentamente esta solução com o auxílio do funil de adição. Em seguida, o meio reacional foi novamente mantido sob agitação (200 rpm a 35 °C) por 90 min. Após este período, adicionou-se 5,40 g de enzima solubilizada em 20 mL de água deionizada. A solução enzimática foi adicionada juntamente com 16 mL de aditivo (0,8 g de PEG-1500 em 20 mL de água deionizada). Finalmente, adicionou-se 2 mL de hidróxido de amônio diluído em 12 mL de etanol absoluto (solução hidrolisante, 1:7). Em seguida, a agitação foi interrompida e a solução permaneceu em repouso à temperatura de 35 °C por 60 min. Após isto, o material foi lacrado no balão de três bocas e mantido a 10 °C por 24 h (tempo de envelhecimento). Posteriormente, procedeu-se à lavagem da enzima imobilizada com heptano (três alíquotas de 20 mL cada) e acetona (uma alíquota de 20 mL), com o objetivo de remover o excesso de água. Este procedimento foi realizado com a utilização de bomba de vácuo. Após essa etapa, a enzima imobilizada foi dividida em duas alíquotas e submetida a diferentes tipos de secagem. Um controle foi preparado pela substituição da enzima por água destilada.

**Secagem por evaporação (Xerogel):** após a lavagem, o material foi mantido em dessecador, sob vácuo, por 72 h.

**Secagem em sistema supercrítico (Aerogel):** após a lavagem do material, fez-se a extração em meio supercrítico com CO<sub>2</sub> para a secagem do biocatalisador. As condições adotadas foram: pressão de 100 bar, temperatura do extrator de 40 °C, temperatura da válvula de extração de 90 °C, tempo de secagem de 4 h com vazão de CO<sub>2</sub> de 2 mL·min<sup>-1</sup>. Para ambas as secagens, foi realizada uma separação granulométrica do material seco, com uma fração entre 0,6 e 0,85 mm, e em seguida, armazenagem a 10 °C.

### 3.2.2. Imobilização da enzima com precursor TMOS

A imobilização da enzima com o precursor TMOS foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Macario *et al.* (2009). Inicialmente, 4,43 g de enzima foram adicionados em um balão de três bocas, contendo uma solução de 0,875 g de CTMABr e 11,53 g de água. Este meio reacional foi mantido sob agitação por 1 h, à temperatura ambiente e 200 rpm. Em seguida, acrescentou-se 2,33 g de TMOS e 0,234 g de etanolamina (20% em massa) para a geleificação da sílica (a presença da etanolamina confere à mistura um valor de pH próximo da neutralidade). Essa etapa foi realizada em atmosfera inerte de nitrogênio devido à sensibilidade do TMOS ao ar. O meio retornou à agitação por 24 h, à temperatura ambiente e 200 rpm. Posteriormente, procedeu-se a lavagem do biocatalisador com heptano (três alíquotas de 20 mL cada) e acetona (uma alíquota de 20 mL), com o objetivo de remover o excesso de água. Após a preparação, a enzima imobilizada foi dividida em duas alíquotas e submetida a dois diferentes tipos de secagem, como descrito no item anterior (aerogel e xerogel). Um controle foi preparado pela substituição da enzima por água destilada.

### 3.3. Métodos analíticos

#### 3.3.1. Determinação do índice de acidez

A determinação do índice de acidez do óleo de pinhão manso foi realizada de acordo com a metodologia apresentada pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Em um erlenmeyer de 125 mL, foi adicionado 2 g de óleo. Em seguida, adicionou-se 25 mL de uma solução de éter:etanol absoluto (2:1, em volume) e três gotas de indicador fenoftaleína. A amostra foi titulada com uma solução de hidróxido de potássio 0,1 mol·L<sup>-1</sup>. A coloração rósea da amostra, após a titulação, deverá permanecer por 30 segundos. O cálculo do índice de acidez foi realizado de acordo com a Equação 4.

$$IA \text{ (mg KOH} \cdot \text{g óleo}^{-1}) = \frac{V \cdot f \cdot 5,61}{P} \quad (4)$$

onde:

V é o volume de solução titulante gasto na titulação (mL);

f é a concentração da solução titulante (M);

P é a massa da amostra de óleo (g);

5,61 é o fator de correção da solução titulante

### 3.3.2. Determinação do teor de umidade pelo método Karl Fischer

A técnica consiste em determinar a umidade com base na reação quantitativa de água com uma solução anidra de dióxido de enxofre e iodo, na presença de uma base orgânica (imidazol) em metanol, que adiciona os íons hidrogênio formados.

Com este reagente podem ser determinadas pequenas quantidades de água. Embora o método não seja universalmente aplicável, as limitações de dosagens diretas podem ser contornadas pelo tratamento preliminar adequado da amostra. Na presença de água, o dióxido de enxofre é oxidado pelo iodo e o ponto final da reação é determinado por bi-amperometria (*dead stop*). Quando não houver mais água na amostra, um excesso de iodo livre agirá como despolarizador, causando aumento na corrente.

Para a determinação de umidade na amostra, adicionou-se uma quantidade de metanol na cela de titulação suficiente para cobrir os eletrodos. Para eliminar a água contida no solvente, o metanol foi titulado com o reagente de Karl Fischer, sob agitação, até o ponto final. Em seguida, pesou-se uma quantidade de amostra com, aproximadamente, 10 a 80 mg de água. Em seguida, a amostra foi introduzida na cela e realizou-se a titulação. No caso de amostras não solúveis em metanol, recomenda-se a escolha de um solvente (ou uma mistura de solventes) adequado, que deverá ser previamente titulado com o reagente de Karl Fischer para eliminar a água.

Para realizar a padronização do reagente de Karl Fischer com água, adicionou-se uma quantidade de metanol na cela de titulação suficiente para cobrir os eletrodos. Para eliminar a água contida no solvente, realizou-se uma pré-titulação do metanol com o reagente de Karl Fischer, sob agitação, até o ponto final, seguindo as instruções do manual do aparelho. Em seguida, com o auxílio de uma microseringa, pesou-se, por diferença, cerca de 20 mg (20 µL) de água, introduzindo a água na cela e realizando a titulação. O cálculo do teor de umidade foi realizado de acordo com a Equação 5

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{V \cdot F}{m} \times 100 \quad (5)$$

onde:

F é o fator do reagente de Karl Fischer (em mg H<sub>2</sub>O·mL<sup>-1</sup> do reagente de Karl Fischer);

V é o volume do reagente de Karl Fischer gasto na titulação (mL);

m é a massa da amostra (mg)

### 3.3.3. Caracterização da enzima livre e imobilizada

Nessa etapa foram realizadas a determinação do teor de proteína da enzima livre, as medidas de atividade de hidrólise para a enzima livre e imobilizada por método titulométrico empregando azeite de oliva como substrato, atividade de esterificação pelo consumo do ácido butírico e a atividade de transesterificação pela reação do álcool 2-fenetílico com acetato de vinila para a formação do 2-fenetilacetato.

Foi realizada a caracterização textural da enzima imobilizada (área superficial, diâmetro e volume de poro e microscopia eletrônica de varredura) e físico-química (análise termogravimétrica, calorimetria diferencial de varredura, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e ressonância magnética nuclear com espectros de silício e carbono).

### 3.3.4. Determinação do teor de proteína da enzima livre

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

### 3.3.5. Determinação da atividade hidrolítica por método titulométrico empregando azeite de oliva como substrato

A atividade enzimática da lipase nas formas livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia adaptada de Soares *et*

*al.*, (1999). Em erlenmeyers de 125 mL, foram adicionados 5 mL de substrato (emulsão formada por 50 mL de azeite de oliva, 50 mL de água e 3,5 g de goma arábica), 4 mL de solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7,0). Os recipientes foram incubados a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após 10 min adicionou-se 0,5 g da enzima livre e 1,0 g da enzima imobilizada. Os erlenmeyers foram mantidos a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  sob agitação constante, em diferentes tempos de reação (5, 10, 15 e 20 min). Decorrido cada intervalo de tempo selecionado, interrompeu-se a reação com a adição de 10 mL de uma mistura de acetona, etanol e água destilada (1:1:1, em volume). Para o controle adicionou-se 5 mL do substrato, 4 mL da solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7,0) e 1,0 g do suporte preparado sem enzima. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH  $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , utilizando-se fenolftaleína como indicador. A atividade da enzima livre e imobilizada foi expressa em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  (U,  $\mu\text{mol}$  de produto (ácido graxo) por unidade de tempo, nas condições da reação). O cálculo da atividade foi realizado de acordo com a Equação 6.

$$\text{Atividade } (\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}) = \frac{(V_A - V_B) * C * 10^3}{t * m} \quad (6)$$

onde:

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

$C$  é a concentração da solução de KOH ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ );

$t$  é o tempo de reação (min);

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

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

$10^3$  é o fator de conversão de unidade

### 3.3.6. Determinação da atividade de esterificação pelo teor de ácido butírico

A atividade de esterificação da enzima livre e imobilizada (adaptado de Soares *et al.*, 2004) foi determinada pela reação de formação do butirato de butila na reação entre *n*-butanol ( $0,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ácido butírico ( $0,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e heptano a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 h, empregando peneiras moleculares (10% em massa, em relação ao substrato) para a remoção do excesso de água formada na reação. Foram utilizados 1,0 g de enzima imobilizada e 0,5 g de enzima livre. O teor de ácido butírico foi determinado por titulação de 1,0 mL de amostra, empregando solução alcoólica de KOH  $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e fenolftaleína como indicador. As

amostras foram retiradas do meio reacional nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min.

Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que realiza a esterificação de 1  $\mu\text{mol}$  de ácido butírico por minuto, a 37 °C. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O cálculo da atividade foi realizado de acordo com a Equação 6.

### **3.3.7. Determinação da atividade de transesterificação pela produção de 2-fenetil acetato**

A atividade de transesterificação (AMANO, 2007 - Boletim técnico) de álcool 2-fenetílico e acetato de vinila foi determinada medida de 2-fenetilacetato, por CLAE, em coluna ODS-C18, detector UV-VIS a 254 nm, sendo a fase móvel uma solução de acetonitrila e água (42:58, em volume), temperatura ambiente, injeção de 20  $\mu\text{L}$  e vazão de 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A mistura reacional foi preparada com 0,6 mL de álcool 2-fenetílico, 2,4 mL de acetato de vinila e 20 mg de biocatalisador (enzima livre e imobilizada), mantida sob agitação por 20 min a 37 °C. Após a reação, 0,1 mL de amostra foi adicionado a 0,6 mL de éter isopropílico, para interrupção da reação. Em seguida, realizou-se uma diluição 1:10 da amostra, em fase móvel, para a quantificação por CLAE do produto formado. Foi construída uma curva padrão, utilizando os reagentes e o produto da reação. Inicialmente preparou-se uma mistura com 0,5 mL de 2-fenetil acetato, 0,5 mL de álcool 2-fenetílico e 2,0 mL de acetato de vinila e completou-se o volume desta mistura para 100 mL com fase móvel. Em seguida, foram feitas diluições (1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5), que foram analisadas nas mesmas condições das amostras reacionais. A recuperação da atividade enzimática foi calculada pelo coeficiente entre a atividade enzimática total recuperada e a atividade enzimática total oferecida.

As atividades foram expressas em  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ . Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que irá produzir 1  $\mu\text{mol}$  de 2-fenetilacetato por minuto a 37 °C. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os reagentes empregados na CLAE apresentaram grau de pureza superior a 99%.

### **3.3.8. Análise da composição das amostras por CLAE obtidas da transesterificação dos óleos de canola e pinhão manso**

Para a identificação dos triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ésteres etílicos por CLAE, foi empregado o método de gradiente combinado linear aquoso-orgânico/não aquoso, adaptado de Holcapek *et al.* (1999). Este método consiste na construção de um gradiente ternário com tempo total de 42 minutos, dividido em duas etapas, uma de separação (aquosa/orgânica) composto por água ultra pura (A) e acetonitrila (B), e outra de eluição (não aquosa) com uma solução 5:4 (v/v) de isopropanol/hexano (C). A condição inicial partiu de 30% de A + 70% de B até 100% de B em 15 min; 50% de B + 50% de C em 9 min, seguida por 12 min de eluição isocrática de 50% de B e 50% de C. Nos últimos 6 min foi retomado o gradiente inicial (30% de A + 70% de B), para restabelecer as condições iniciais de operação do sistema. A coluna ODS-C18 de fase reversa foi operada a 40 °C, com detecção UV-VIS a 205 e 210 nm, injeção de 20 µL e vazão de 1,0 mL·min<sup>-1</sup>. As curvas de calibração foram construídas a partir de diluições consecutivas das misturas de padrões de acilgliceróis e a quantificação foi realizada somando as áreas relativas das espécies químicas comuns, submetidas à curva de calibração. Os grupos de espécies químicas foram selecionados a partir de estudos de revisão bibliográfica dos trabalhos de Holcapek *et al.* (1999), Turkan e Kalay (2006), Nicola *et al.* (2008) e com base na análise dos cromatogramas obtidos dos padrões de acilgliceróis.

A determinação dos mono, di e triacilgliceróis foi realizada por padronização externa, com os padrões ASTM D6548, da Accustandard, INC., New Haven, EUA, e a determinação dos ésteres etílicos formados foi realizada com o padrão metil éster de ácido oléico, da Sigma-Aldrich Chemical.

### **3.3.9. Métodos de caracterização físico-química e morfológica das matrizes e da enzima imobilizada**

Neste tópico serão apresentados, de forma sucinta, os métodos empregados na caracterização físico-química e morfológica dos biocatalisadores produzidos.



### **3.3.9.1. Caracterização textural da enzima imobilizada**

As amostras da enzima imobilizada foram analisadas no equipamento de análise NOVA 1200 da Quantachrome. A análise empregando o método B.E.T. (Brunauer, Emmett e Teller), pela adsorção superficial de nitrogênio, foi conduzida com a finalidade de determinar a área específica, tamanho médio dos poros e volume médio dos poros. As amostras foram pré-tratadas termicamente, a 60 °C, antes da etapa de adsorção superficial do N<sub>2</sub>.

### **3.3.9.2. Microscopia eletrônica de varredura**

As análises foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV), marca Leica, modelo: LEO 440i. As amostras foram colocadas em um suporte, no microscópio, em fitas de carbono, e recobertas por uma fina camada de ouro metálico. Sob vácuo, foram bombardeadas por feixes de elétrons que, por sua vez interagem com os átomos da amostra. A partir da interação entre o feixe de elétrons e a amostra foram produzidas partículas e radiação que foram usadas para formar uma imagem ampliada da amostra.

### **3.3.9.3. Análise termogravimétrica e de calorimetria exploratória diferencial**

As amostras foram submetidas à análise termogravimétrica, tomando por base a perda da massa em função da temperatura. As seguintes condições operacionais foram empregadas: razão de aquecimento de 20 °C·min<sup>-1</sup>, na faixa de temperatura de ambiente a 1000 °C, com variação de massa de 2 a 6 mg. As análises de calorimetria exploratória diferencial foram realizadas com aproximadamente 6 mg de amostra, em um calorímetro na faixa de temperatura de 25 a 500 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (20 mL·min<sup>-1</sup>), razão de aquecimento de 10 °C·min<sup>-1</sup>, em cápsulas de alumínio para acondicionamento das amostras.

### **3.3.10. Reação de transesterificação em reator batelada**

A produção dos ésteres etílicos em sistema batelada foi conduzida em reatores de 50 mL, acoplados a condensadores, para evitar a evaporação do álcool presente na reação.

Foram empregados os óleos de canola e pinhão manso, e a reação foi catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* livre. Os reatores e condensadores foram mantidos sob temperatura controlada e agitação constante, com o emprego de banhos termostatizados e agitadores magnéticos. Os testes foram realizados de acordo com um planejamento fatorial  $2^3$  completo, com quatro repetições no ponto central, totalizando 12 ensaios para cada um dos óleos utilizados na reação. Na execução dos experimentos, foram investigadas as seguintes variáveis: temperatura (40, 50 e 60 °C), quantidade de enzima livre presente no meio reacional (5, 7,5 e 10%, em massa, em relação à quantidade de óleo no meio reacional) e razão molar álcool:óleo (6:1, 9:1 e 12:1). O tempo total de cada reação foi de 72 h. A adição de etanol no meio reacional foi realizada em três etapas distintas: no início da reação e após 12 e 24 h.

Nas reações conduzidas neste sistema, não foi adicionado cossolvente ao meio reacional. As amostras foram aquecidas em banho de água para inativação da enzima, lavadas com água quente e centrifugadas para remoção do glicerol. Em seguida, o etanol residual presente na amostra contendo os ésteres produzidos foi eliminado por meio de um rotaevaporador, a 100 °C, por 15 min. As amostras finais foram congeladas para análise da composição por CLAE.

### **3.3.11. Reação de transesterificação em reator de leito fixo**

Os ésteres etílicos foram produzidos em reator de leito fixo, a partir dos melhores resultados obtidos na produção em sistema batelada, empregando os óleos de canola e pinhão manso. Na condução dos experimentos, foi utilizada uma coluna encamisada, com 0,9 cm de diâmetro interno e 30 cm de altura. A enzima imobilizada empregada neste sistema (lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada e matriz com precursor TEOS e seca por evaporação) foi selecionada a partir dos melhores resultados obtidos nos testes de transesterificação, descritos na seção 3.3.7. Para este sistema, foi adicionado ao meio reacional um cossolvente (n-hexano, 1:1 em massa, em relação ao álcool), com a finalidade de garantir a homogeneização entre o óleo e o álcool. A enzima imobilizada foi confinada dentro da coluna, proporcionando um leito catalítico de 25 cm de altura, e o meio reacional foi bombeado com uma vazão de  $0,05 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , com um tempo de retenção de, aproximadamente, 5,4 h. A vazão foi ajustada e controlada com o auxílio de uma proveta graduada. A temperatura foi controlada pela utilização de banho termostatizado. O sistema foi operado com recirculação por 144 h. Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata.

As amostras foram aquecidas em banho de água para inativação da enzima que poderia desprender-se da matriz sol-gel, lavadas com água quente e centrifugadas para remoção do glicerol. Em seguida, o etanol e o n-hexano residuais presente na amostra contendo os ésteres produzidos foram eliminados por meio de um rotaevaporador, a 100 °C, por 15 min. As amostras finais foram congeladas para análise da composição por CLAE.

### 3.3.12. Cálculo do rendimento em ésteres

O rendimento em ésteres (Equação 7) é dado pela razão entre moles do componente “i” formado (número de moles de ésteres formados no meio reacional até o momento da retirada da amostra) e moles do componente “i” possíveis de serem formados (quantidade máxima possível de ser obtida), calculada a partir da quantidade de triacilgliceróis presente no início da reação.

$$\text{Rendimento em ésteres (\%)} = \frac{\text{mol do componente "i" formado}}{\text{mol do componente "i" possíveis de serem formados}} \times 100 \quad (7)$$

### 3.3.13. Cálculo da atividade de consumo dos triacilgliceróis

A atividade de consumo dos triacilgliceróis ( $A_{CT}$ ) presentes no início da reação foi calculada pelo método das velocidades iniciais, conforme a Equação 8.

$$ACT \text{ (U} \cdot \text{mg proteína}^{-1}\text{)} = \frac{\alpha \cdot 10^{-6}}{m_{enzima} \cdot q_{enzima}} \quad (8)$$

onde:

$\alpha$  é a inclinação da reta de ajuste dos dados de consumo dos triacilgliceróis em função do tempo de reação, na reação de transesterificação para ambos os óleos utilizados ( $\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ );

$m_{enzima}$  é a quantidade de enzima utilizada no ensaio (g);

$q_{enzima}$  é o teor de proteína da enzima ( $\text{mg de proteína} \cdot \text{g de enzima}^{-1}$ );

$10^{-6}$  é o fator de conversão de unidade;

U é a unidade de atividade enzimática ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ )

O tempo utilizado para as amostras, respeitando a linearidade para emprego do método das velocidades iniciais foi de 1440 min.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais resultados do trabalho são apresentados neste tópico.

### 4.1. Determinação da atividade hidrolítica, de esterificação e de transesterificação da enzima livre

A atividade de hidrólise da lipase livre de *Burkholderia cepacia* foi realizada empregando o azeite de oliva como substrato da reação (seção 3.3.5). A atividade de esterificação foi determinada pelo uso do ácido butírico como substrato da reação (seção 3.3.6). O cálculo da atividade específica ( $A_{esp}$ ) da enzima baseou-se na quantidade de proteína presente na enzima livre (7,5 mg de proteína·g de enzima<sup>-1</sup>). Na determinação da atividade de hidrólise foi utilizado 0,05 g de enzima. Para a determinação da atividade de esterificação foi utilizado 1 g de enzima. A média dos resultados, realizados em duplicata, são apresentados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1.** Atividades hidrolítica e de esterificação da lipase livre.

Ensaio	Substrato	$A_{esp}$ (U·mg proteína <sup>-1</sup> )
Atividade hidrolítica	Azeite de oliva	1865,00
Esterificação	Ácido butírico+ butanol	1,47
Transesterificação	Acetato de vinila + álcool 2-fenetílico	284,17

O baixo valor da atividade de esterificação obtido com a enzima livre sugere que a lipase não apresenta características funcionais que se adaptem a este substrato, e também reflete a maior capacidade da enzima de conduzir de maneira mais efetiva as reações de transesterificação, de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante da enzima (AMANO).

### 4.2. Determinação da atividade de esterificação da enzima imobilizada

A atividade de esterificação ( $A_{est}$ ) da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em matrizes hidrofóbicas obtidas com diferentes precursores de sílica (TEOS e TMOS) e diferentes tipos de secagem do suporte (secagem por evaporação e secagem em meio supercrítico) foi determinada pela reação de formação do butirato de butila, empregando o ácido butírico e butanol como substratos. A quantidade de enzima presente no suporte foi

de, aproximadamente, 0,63 g de enzima·g de suporte<sup>-1</sup>. Os resultados são apresentados na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2.** Atividade de esterificação da enzima imobilizada.

Suporte	Secagem	$A_{est}$ (U·g <sup>-1</sup> suporte)	$A_{est}$ (U·mg proteína <sup>-1</sup> )
TEOS	Evaporação	1,92	3,05
TEOS	Supercrítica	8,17	12,97
TMOS	Evaporação	5,42	8,60
TMOS	Supercrítica	3,87	6,14

O valor da atividade de esterificação da enzima livre (Tabela 4.1) foi inferior aos valores obtidos para a enzima imobilizada com diferentes precursores de sílica (Tabela 4.2), sugerindo uma maior exposição do sítio ativo da lipase após sua imobilização em matriz hidrofóbica. Este resultado também pode ser explicado pela maior quantidade de enzima imobilizada empregada na reação, em relação à quantidade de enzima livre, utilizada nas mesmas condições do ensaio.

Comparando o resultado da atividade de esterificação da enzima livre com o maior valor da atividade da enzima imobilizada (TEOS e secagem supercrítica), em função da quantidade de proteína, a enzima imobilizada apresentou uma ativação de, aproximadamente, nove vezes.

#### 4.3. Determinação da atividade de transesterificação da enzima livre e imobilizada a recuperação de atividade

A medida da atividade de transesterificação ( $A_{trans}$ ) da lipase de *Burkholderia cepacia* livre e imobilizada foi realizada de acordo com a metodologia proposta na seção 3.3.7. Os ensaios foram conduzidos em duplicata, e os resultados são apresentados na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3.** Atividade de transesterificação da enzima livre e imobilizada

Suporte	Secagem	$A_{trans}$ (U·g <sup>-1</sup> suporte)	$A_{trans}$ (U·mg proteína <sup>-1</sup> )	Recuperação de atividade da enzima imobilizada (%)
Enzima livre		2131,26	284,17	
TEOS	Evaporação	1805,23	2865,44	102,00
TEOS	Supercrítica	2028,98	3220,60	114,60
TMOS	Evaporação	1539,32	2443,36	86,93
TMOS	Supercrítica	1562,94	2480,86	88,27

Estes resultados demonstram que o suporte preparado com o precursor TEOS, para ambas as secagens, é mais eficiente na imobilização na enzima, com relação à atividade de transesterificação. Por se tratar de um precursor de sílica com maior tamanho de cadeia, quando comparado ao TMOS, pode proporcionar um aumento no diâmetro dos poros do suporte, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. A metodologia de imobilização da enzima empregando o precursor TEOS contempla a adição de um polímero (PEG-1500), com o objetivo de aumentar o tamanho médio dos poros da matriz hidrofóbica, contribuindo para um maior contato do substrato com a enzima confinada, e proporcionando maiores atividades de esterificação, transesterificação e recuperação de atividade da enzima imobilizada, em comparação ao suporte preparado com o precursor TMOS (Soares *et al.*, 2006).

Semelhante à atividade de esterificação, o maior valor da atividade de transesterificação da enzima imobilizada (TEOS e secagem supercrítica), em função da quantidade de proteína, foi, aproximadamente, onze vezes maior que a atividade de transesterificação da enzima livre. Em ambos os casos, isto evidencia a ativação interfacial da enzima imobilizada com o mesmo precursor e mesmo tipo de secagem.

#### 4.4. Caracterização textural da enzima imobilizada

Os resultados de área superficial, diâmetro e volume médio dos poros (seção 3.3.9.1) da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada e dos suportes preparados com os diferentes precursores de sílica, com secagem por evaporação (xerogel) e em meio supercrítico (aerogel) são apresentados na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4.** Caracterização textural da lipase imobilizada em matrizes hidrofóbicas sol-gel

Suporte	Secagem	Área superficial ( $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ )	Volume dos poros ( $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ )	Diâmetro dos poros (Å)
TEOS	Evaporação	7,97	0,0184	59,98
TEOS	Supercrítica	48,37	0,0696	60,17
TMOS	Evaporação	3,12	0,0047	19,34
TMOS	Supercrítica	3,71	0,0031	16,39
TEOS + enzima	Evaporação	8,70	0,0134	61,93
TEOS + enzima	Supercrítica	49,86	0,0774	62,09
TMOS + enzima	Evaporação	3,00	0,0040	18,32
TMOS + enzima	Supercrítica	3,53	0,0039	17,83

Os resultados apresentados na Tabela 4.4 indicam que as matrizes hidrofóbicas preparadas com o precursor TEOS apresentam característica de mesoporos (diâmetro dos

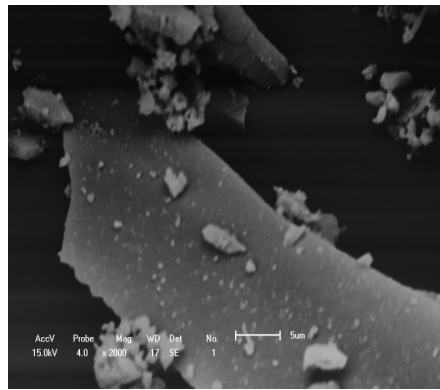
poros entre 20 e 500 Å). Para as matrizes obtidas com o emprego do precursor TMOS, os valores de diâmetro dos poros indicam uma matriz com característica de microporos (<20 Å). Quando a enzima é imobilizada em matrizes com um diâmetro de poro menor que 20 Å, a difusão das moléculas do substrato para o sítio ativo da enzima confinada é lenta (GUISAN, 2006), e isto justifica os menores valores de atividade de transesterificação (Tabela 4.3) obtidos com a enzima imobilizada com o precursor TMOS.

Na preparação dos biocatalisadores com o precursor TEOS, foi empregado o aditivo PEG-1500, de acordo com a metodologia adaptada de Soares *et al.* (2004). A adição deste composto tem como finalidade o aumento no tamanho dos poros do suporte, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada. Nota-se que as imobilizações com TEOS apresentaram valores superiores de diâmetro e volume de poros e área superficial, quando comparados com as imobilizações realizadas com TMOS. Segundo Keeling-Tucker *et al.* (2000), a encapsulação destas moléculas poliméricas nos poros da matriz hidrofóbica impede sua contração no processo de síntese do gel, confirmando os resultados mostrados na Tabela 4.4, obtidos para os suportes preparados com TEOS.

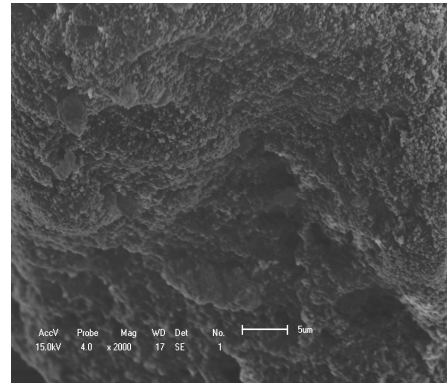
Quanto à secagem da enzima imobilizada, o processo conduzido em meio supercrítico apresentou os maiores valores de área superficial e volume dos poros, para ambos os precursores empregados. Na produção do aerogel, o CO<sub>2</sub> utilizado em condições supercríticas impede a contração dos poros, pois neste caso, diferentemente do processo de produção do xerogel, não há interface entre as fases líquido e vapor, proporcionando uma pressão capilar mínima e uma diminuição substancial no colapso da estrutura do suporte (MAURY *et al.*, 2004). Os melhores resultados da caracterização textural dos suportes obtidos com o precursor TEOS (Tabela 4.4) confirmam os maiores valores de atividade de transesterificação obtidos para o biocatalisador imobilizado (Tabela 4.3). Os maiores valores de área superficial, diâmetro e volume de poros, em comparação às matrizes com precursor TMOS, mostram uma maior facilidade de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima encapsulada, diminuindo os efeitos difusionais do biocatalisador.

#### **4.5. Microscopia eletrônica de varredura**

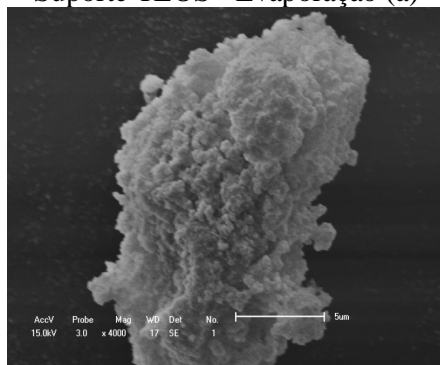
As imagens das micrografias (seção 3.9.9.2) das matrizes hidrofóbicas obtidas com os precursores TEOS e TMOS (suporte e enzima imobilizada) são apresentadas na Figura 4.1.



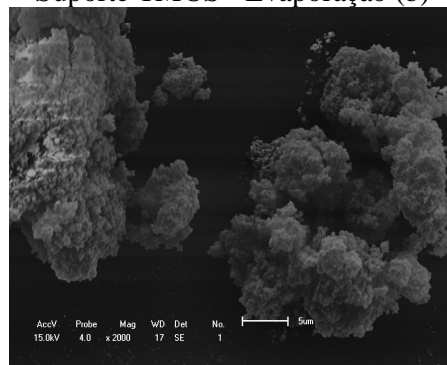
Suporte TEOS - Evaporação (a)



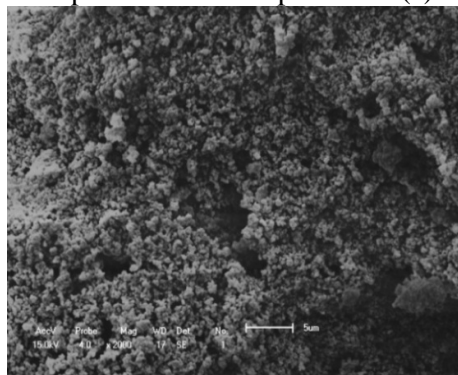
Suporte TMOS - Evaporação (b)



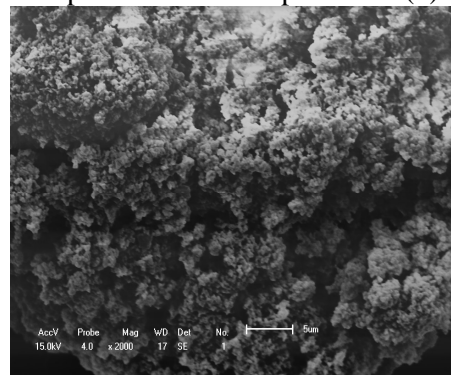
Suporte TEOS - Supercrítico (c)



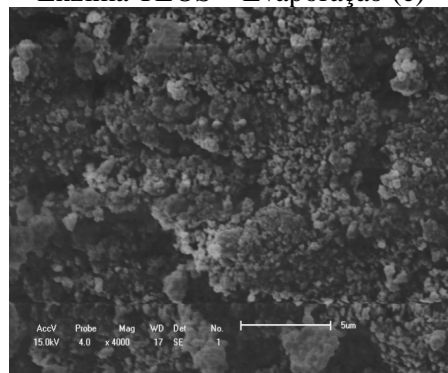
Suporte TMOS - Supercrítico (d)



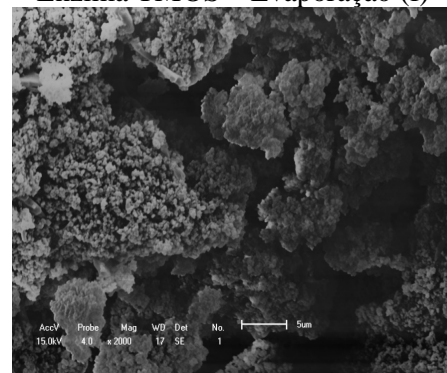
Enzima TEOS - Evaporação (e)



Enzima TMOS - Evaporação (f)



Enzima TEOS - Supercrítico (g)



Enzima TMOS - Supercrítico (h)

**Figura 4.1.** Micrografias dos suportes e enzimas immobilizadas com os precursores TEOS e TMOS e secos por evaporação (a, b, e, f) e em meio supercrítico (c, d, g, h).



As micrografias dos diferentes suportes e da enzima imobilizada, com secagem por evaporação e em meio supercrítico, foram realizadas com o intuito de complementar a caracterização textural da estrutura das matrizes hidrofóbicas. Observa-se que para os suportes preparados com os precursores TEOS e TMOS, a secagem por evaporação produziu matrizes com uma estrutura superficial mais rígida e com aspecto de menor rugosidade, quando comparados com os suportes secos em meio supercrítico (Figura 4.1 a, b, c, d).

Já para as enzimas imobilizadas, as micrografias não propiciaram uma distinção nítida das estruturas superficiais das matrizes, com relação aos diferentes tipos de secagem empregados (Figura 4.1 e, f, g, h). Porém, é possível notar um aumento da quantidade de poros na superfície da matriz, quando comparados aos suportes sem a enzima, tanto para o precursor TEOS quanto para o TMOS. Isto pode indicar que o confinamento da enzima dentro da matriz hidrofóbica pode conferir ao suporte uma maior quantidade de poros superficiais, desta forma, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (Soares *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2012).

#### **4.6. Análise termogravimétrica e calorimetria exploratória diferencial**

Nas Figuras 4.2 (A) e (B) são apresentadas as curvas termogravimétricas (seção 3.3.9.3) obtidas para os suportes e para a enzima imobilizada com os precursores TEOS e TMOS, empregando a secagem por evaporação (xerogel) e em meio supercrítico (aerogel). Nesta análise foi determinado o comportamento de perda de massa das matrizes hidrofóbicas e da enzima imobilizada.

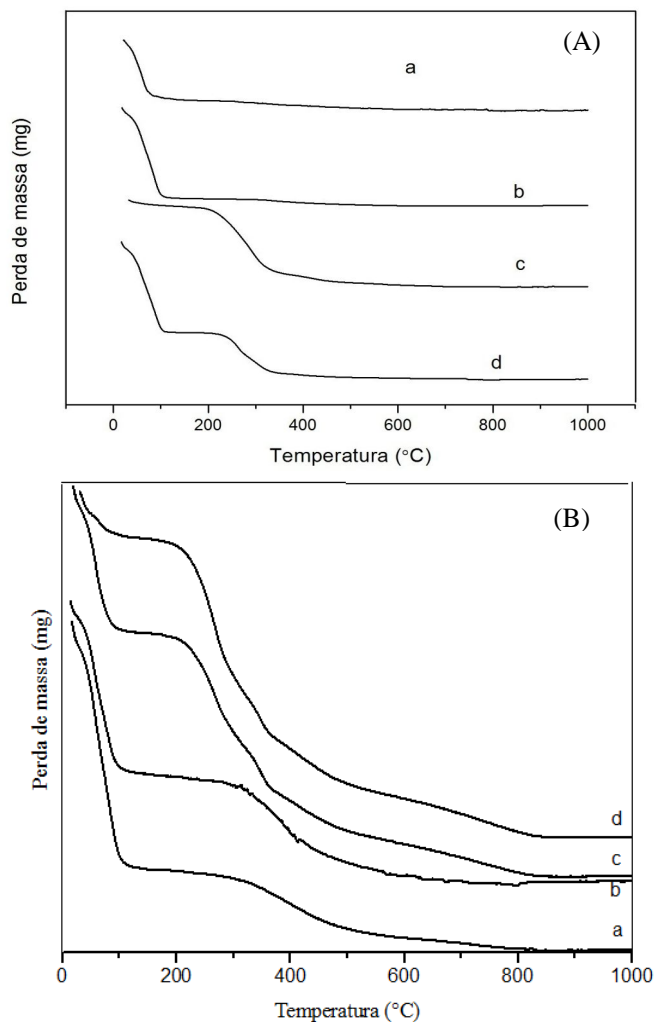
Na Figura 4.2 (A) é possível observar que, para o suporte preparado com o precursor TEOS (curvas a e b), há uma perda de massa na região próxima a 100 °C, relacionada à água presente na amostra. Nas curvas c e d, obtidas para o suporte preparado com TMOS, nota-se um segundo estágio de perda de massa, entre 200 e 300 °C. De acordo com Macario *et al.* (2009), esta perda de massa está relacionada à decomposição do surfatante CTMABr presente na matriz.

Para a enzima imobilizada (Figura 4.2 (B)), observa-se que na região próxima a 100 °C todas as amostras apresentaram uma considerável perda de massa. Esta redução está relacionada à quantidade de água residual presente nas amostras, que não foi removida por completo nos processos de secagem. Também é possível observar, nesta faixa de temperatura, que a maior perda de massa ocorreu para a enzima imobilizada com o

precursor TEOS (curvas a e b). Isto pode ser justificado pela maior quantidade de água empregada na metodologia de imobilização da enzima com o precursor TEOS, e que permaneceu confinada nos interstícios da matriz. Estes resultados são comprovados pela determinação do teor de umidade da enzima imobilizada que apresentou maior valor para os biocatalisadores preparados com TEOS (28,6% para o aerogel e 35,3% para o xerogel) do que com TMOS (15,4% para o aerogel e 27,9% para o xerogel).

Novamente, na região próxima a 200 °C observa-se uma maior perda de massa para a enzima imobilizada com o precursor TMOS (curvas c e d), evidenciando a decomposição do surfatante presente na matriz.

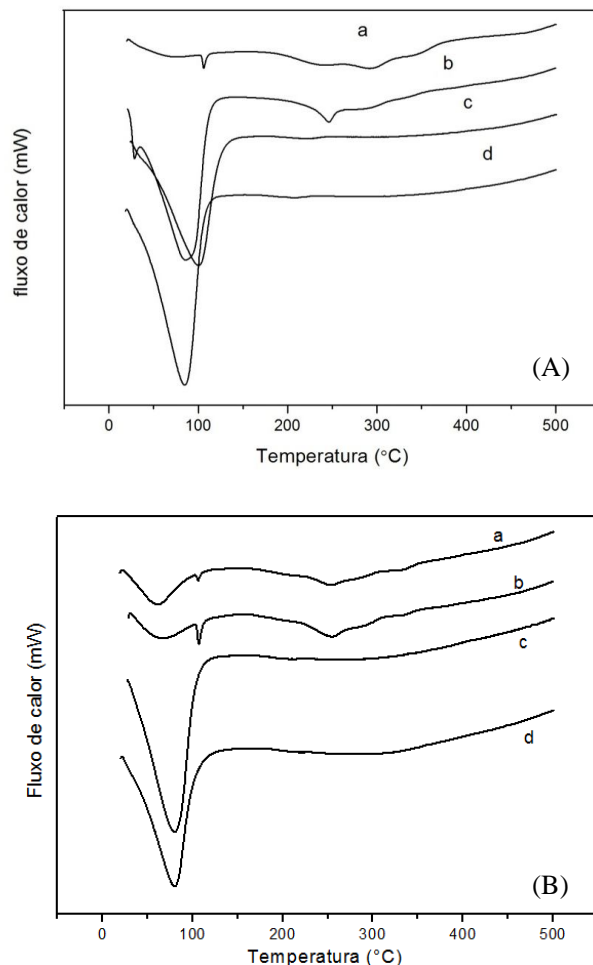
Na região que compreende a temperatura próxima a 300 °C até 600 °C há perda de massa observada para todas as amostras. Esta redução pode estar relacionada com a decomposição de compostos orgânicos, incluindo a enzima. O relaxamento estrutural do reticulado nesta região pode ser causado por reações de desidroxilação, processos difusionais e a remoção do volume livre das matrizes sol-gel (Soares *et al.*, 2004). A perda de massa progressiva entre 600 e 800 °C evidencia a condensação dos grupos silanol da matriz (Macario *et al.*, 2009). Acima de 600 °C, a perda de massa das amostras pode indicar a carbonização definitiva dos compostos orgânicos e da lipase. Esta região corresponde à temperatura vítrea das amostras, tornando-se uma região não interessante no estudo de enzimas imobilizadas, em função da alta temperatura empregada (Soares *et al.*, 2004).



**Figura 4.2.** Curvas termogravimétricas das matrizes (A) e da enzima imobilizada (B): (a) TEOS xerogel, (b) TEOS aerogel, (c) TMOS xerogel, (d) TMOS aerogel.

As Figuras 4.3 (A) e (B) apresentam as curvas da análise de calorimetria exploratória diferencial obtidas para os suportes e para a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada com os precursores TEOS e TMOS, empregando a secagem por evaporação (xerogel) e em meio supercrítico (aerogel).

Nas curvas que representam as amostras de suporte (Figura 4.3 (A)) observa-se uma região onde há absorção de energia térmica próxima a 100 °C, relacionada à presença de água nas amostras, com um fluxo endotérmico de calor de, aproximadamente, 700 J·g<sup>-1</sup> (curvas b, c e d). Nesta reação, a amostra preparada com o precursor TMOS e secagem por evaporação (curva a) apresentou um pico endotérmico de 83 J·g<sup>-1</sup>.



**Figura 4.3.** Curvas de calorimetria exploratória diferencial das matrizes (A) e da enzima imobilizada (B): (a) TMOS xerogel, (b) TMOS aerogel, (c) TEOS xerogel, (d) TEOS aerogel.

Nas curvas que representam as amostras contendo a enzima imobilizada (Figura 4.3 (B)), o xerogel obtido com o precursor TMOS apresentou um pico endotérmico próximo a 100 °C, relacionado à perda de água contida no suporte, com uma variação de calor de  $129,7 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ . Uma variação do fluxo de calor é observada na região próxima a 250 °C ( $66,7 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ ), característico à decomposição de materiais orgânicos, principalmente o surfatante CTMABr. Para o aerogel obtido com TMOS, novamente observam-se dois picos endotérmicos, um próximo a 100 °C, indicando a presença de água, com uma variação de calor de  $113 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ , outro próximo a 250 °C, com variação de calor de  $75,5 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ , correspondente à condensação do surfatante. Para o aerogel obtido com TEOS, um pico endotérmico acima de 90 °C, com uma variação de calor de  $507 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ , indica a região onde houve uma grande perda de água presente no suporte. Uma menor variação de calor é observada na região de 270 °C ( $61,6 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ ), onde há absorção de energia térmica pela

condensação dos compostos orgânicos presentes no suporte contendo a enzima imobilizada. Resultados semelhantes são obtidos para o xerogel com TEOS, com um pico endotérmico na região acima de 90 °C (590 J·g<sup>-1</sup>) e próximo a 260 °C (63 J·g<sup>-1</sup>).

A análise das curvas de calorimetria exploratória diferencial confirmam os resultados obtidos com as curvas termogravimétricas, identificando as regiões de temperatura onde há a presença de água nos suportes e nas matrizes contendo a enzima imobilizada. No caso dos suportes preparados com TMOS, também foi possível identificar a presença do surfatante, na região de temperatura próxima a 250 °C.

#### 4.7. Produção de ésteres etílicos em reator batelada com a enzima livre

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos para a reação de transesterificação enzimática dos óleos de canola e pinhão manso em batelada, empregando a enzima livre e sem a adição de cossolvente, de acordo com o planejamento experimental 2<sup>3</sup> completo, com quatro repetições no ponto central.

A matriz com as variáveis reais e codificadas, os rendimentos alcançados em ésteres etílicos a atividade da enzima para o consumo dos triacilgliceróis presentes no início da reação (A<sub>CT</sub>), para o óleo de canola, são apresentados na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5.** Matriz do planejamento para transesterificação etílica do óleo de canola.

Ensaio	T (° C)	Razão molar álcool:óleo	Quantidade de enzima (%)	Rendimento em ésteres etílicos (%)	A <sub>CT</sub> (U·g proteína <sup>-1</sup> )
1	40 (-1)	6:1 (-1)	5 % (-1)	36,62	91,22
2	60 (1)	6:1 (-1)	5 % (-1)	21,41	97,70
3	40 (-1)	12:1 (1)	5 % (-1)	33,33	16,67
4	60 (1)	12:1 (1)	5 % (-1)	33,64	13,50
5	40 (-1)	6:1 (-1)	10 % (1)	33,85	19,32
6	60 (1)	6:1 (-1)	10 % (1)	40,41	37,60
7	40 (-1)	12:1 (1)	10 % (1)	33,54	24,87
8	60 (1)	12: (1)	10 % (1)	36,57	15,24
9	50 (0)	9:1 (0)	7,5% (0)	47,22	61,36
10	50 (0)	9:1 (0)	7,5% (0)	43,00	59,77
11	50 (0)	9:1 (0)	7,5% (0)	46,62	52,43
12	50 (0)	9:1 (0)	7,5% (0)	42,23	55,73

A estimativa dos efeitos principais e das interações entre as variáveis para o planejamento, com relação ao rendimento em ésteres, são apresentadas na Tabela 4.6, para

o intervalo de confiança de 90%. Os valores destacados em itálico e negrito indicam que o efeito é significativo.

**Tabela 4.6.** Estimativa dos efeitos para o rendimento em ésteres etílicos do óleo de canola.

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
<b><i>Intercepto</i></b>	<b><i>37,34</i></b>	<b><i>2,69</i></b>	<b><i>0,00</i></b>	<b><i>37,34</i></b>
T (°C)	-1,33	6,60	0,85	-0,66
Razão molar álcool:óleo	1,18	6,60	0,87	0,59
Quantidade de enzima (%)	4,83	6,60	0,51	2,41
T x Razão molar	2,98	6,60	0,68	1,48
T x Quantidade de enzima	6,13	6,60	0,41	3,06
T x Razão molar x Quantidade de enzima	-3,28	6,60	0,65	-1,63

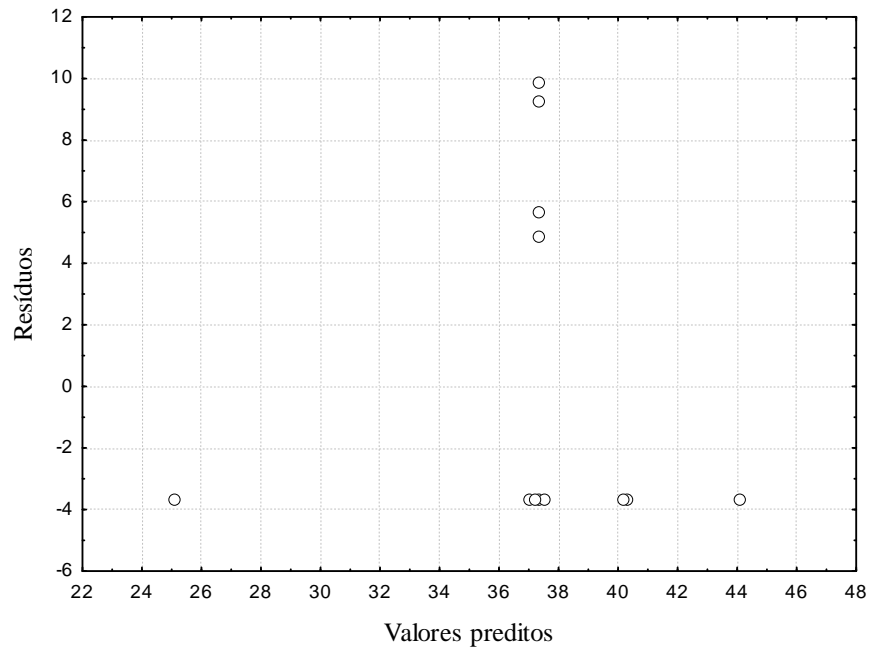
$R^2 = 0,38$ ;  $R = 0,62$

Os resultados apresentados na Tabela 4.6 mostram que nenhuma das variáveis avaliadas e nem suas interações foram significativas. Observa-se, neste caso, que o efeito da temperatura e a interação entre as três variáveis são negativos. Isto indica que um forte aumento na temperatura pode influenciar o processo de maneira negativa, com uma possível inativação térmica da enzima. A análise de variância do planejamento é apresentada na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7.** Análise de variância do rendimento em ésteres etílicos para o óleo de canola.

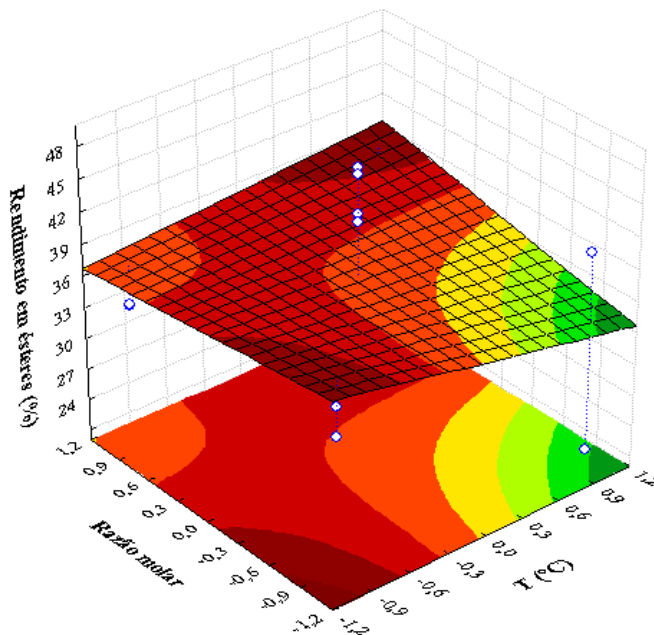
Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$F_{calc}$
Regressão	52,84	3	17,61	0,28
Resíduos	508,07	8	63,51	
Total	560,91	11		

O valor tabelado de F, para o intervalo de confiança de 90%, e com os respectivos graus de liberdade (3; 8; 0,1) é de 2,92 (Barros Neto, Scarminio e Bruns, 2007). Pelo teste F, o valor calculado de F é menor do que o valor tabelado. Assim, o modelo linear proposto pelo planejamento não é válido. O gráfico dos resíduos em função dos valores preditos (Figura 4.4) demonstra a falta de ajuste dos valores obtidos em relação ao modelo de regressão linear proposto.

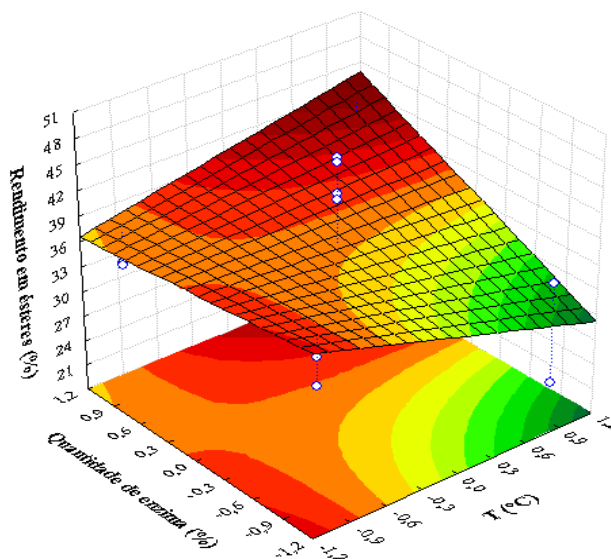


**Figura 4.4.** Resíduos do modelo para rendimento em ésteres etílicos para o óleo de canola.

Apesar da não validação do modelo linear proposto no planejamento, é possível adotar a metodologia de superfície de resposta para os resultados obtidos, com o objetivo de verificar um direcionamento das variáveis avaliadas para um aumento no rendimento dos ésteres produzidos. Os gráficos obtidos para esta metodologia, referente ao óleo de canola são apresentados nas Figuras 4.5 e 4.6.



**Figura 4.5.** Rendimento em ésteres para o óleo de canola (temperatura e razão molar).



**Figura 4.6.** Rendimento em ésteres para o óleo de canola (temperatura e quantidade de enzima).

Observa-se nas Figuras 4.5 e 4.6 que as superfícies de resposta apresentam duas regiões onde pode haver um aumento no rendimento em ésteres (vermelho intenso). Desta forma, estes gráficos não demonstram claramente um direcionamento a ser tomado para um aumento no rendimento do produto desejado. Contudo, os maiores resultados de rendimento, apresentados na Tabela 4.5, foram obtidos no ponto central do experimento, com temperatura de 50 °C, razão molar álcool:óleo de 9:1 e 7,5% de enzima, em massa, em relação à quantidade de óleo presente no meio reacional. Estes valores de temperatura e razão molar foram empregados no sistema em leito fixo para a produção dos ésteres, a partir do óleo de canola, com a enzima imobilizada. A estimativa dos efeitos principais e das interações entre as variáveis para a atividade da enzima para o consumo dos triacilgliceróis é apresentada na Tabela 4.8, com um intervalo de confiança de 90%. Os valores destacados em itálico e negrito indicam que o efeito é significativo.

**Tabela 4.8.** Estimativa dos efeitos para  $A_{CT}$  do óleo de canola.

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
<i>Intercepto</i>	<b>45,45</b>	<b>4,31</b>	<b>0,00</b>	<b>45,45</b>
T (°C)	2,99	10,57	0,79	1,49
<i>Razão molar álcool:óleo</i>	<b>-43,89</b>	<b>10,57</b>	<b>0,01</b>	<b>-21,94</b>
<i>Quantidade de enzima (%)</i>	<b>-30,51</b>	<b>10,57</b>	<b>0,04</b>	<b>-15,25</b>
T x Razão molar	-9,39	10,57	0,42	-4,69
T x Quantidade de enzima	1,33	10,57	0,90	0,66
<i>Razão molar x Quantidade de enzima</i>	<b>35,48</b>	<b>10,57</b>	<b>0,02</b>	<b>17,74</b>
T x Razão molar x Quantidade de enzima	-4,56	10,57	0,68	-2,28

$R^2 = 0,90$ ;  $R = 0,95$



Os resultados mostrados na Tabela 4.8 indicam que a razão molar e a quantidade de enzima são as variáveis que influenciam o processo de maneira negativa. Maiores quantidades de etanol e de enzima no meio reacional poderão ocasionar uma diminuição na atividade da enzima para o consumo dos triacilgliceróis presentes inicialmente na reação. Já a interação entre estas duas variáveis influencia o processo positivamente, demonstrando que ambas as variáveis são importantes para que a enzima possa catalisar a transesterificação do óleo de canola. A análise de variância do planejamento para a  $A_{CT}$  é apresentada na Tabela 4.9.

**Tabela 4.9.** Análise de variância da  $A_{CT}$  para o óleo de canola.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$F_{calc}$
Regressão	8472,83	7	1210,40	5,41
Resíduos	894,39	4	223,60	
Total	9367,22	11		

O valor tabelado de F, para o intervalo de confiança de 90%, e com os respectivos graus de liberdade (7; 4; 0,1) é de 3,98. Pelo teste F, o valor calculado de F é maior do que o valor tabelado. Assim, o modelo linear proposto pelo planejamento é válido. Pode-se então escrever empiricamente o modelo de regressão linear que descreve o comportamento da  $A_{CT}$  em função das variáveis significativas e suas interações (Equação 9).

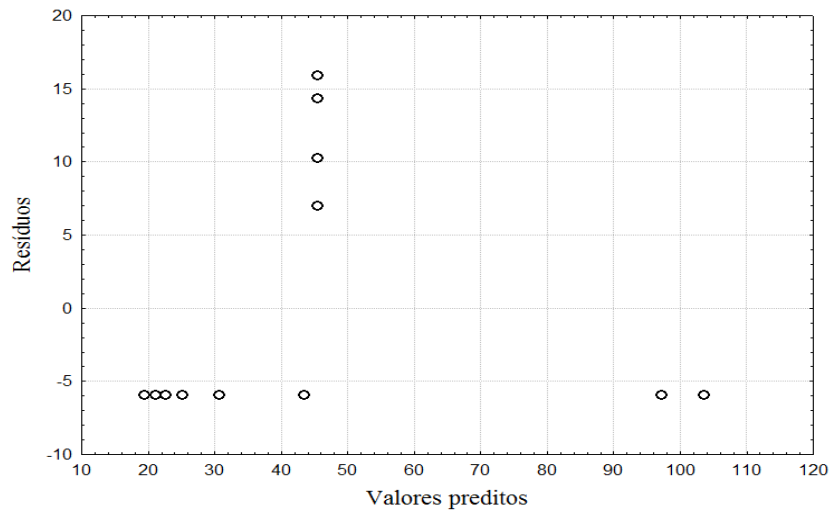
$$A_{CT}(\text{U}\cdot\text{mg proteína}^{-1}) = 45,45 - 21,94 \cdot \text{R.M.} - 15,25 \cdot \text{Q.E.} + 17,74 \cdot \text{R.M.}\cdot\text{Q.E.} \quad (9)$$

onde:

R.M. é a variável razão molar;

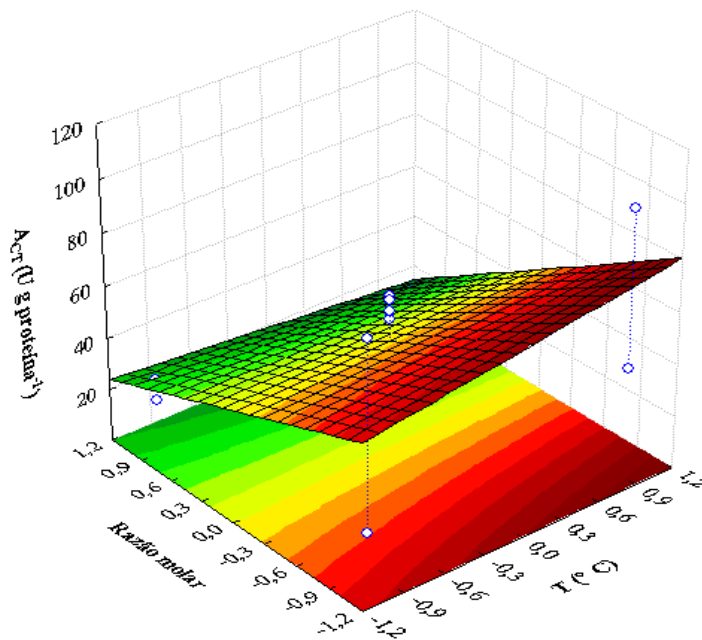
Q.E. é a variável quantidade de enzima

Os resíduos do modelo em função dos valores preditos são apresentados na Figura 4.7. Apesar de o modelo proposto ser válido pela análise de variância, os resíduos do modelo em função dos valores preditos não estão distribuídos de maneira aleatória e em torno do ponto zero, indicando uma falta de ajuste do modelo em relação aos dados experimentais.

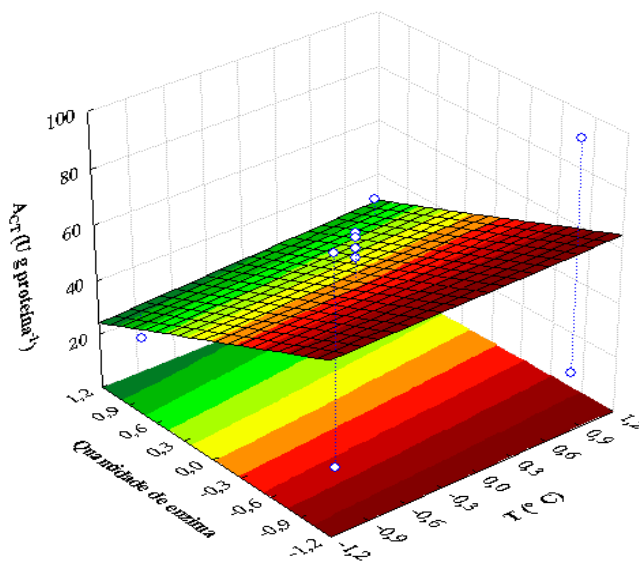


**Figura 4.7.** Resíduos do modelo para  $A_{CT}$  para o óleo de canola.

As superfícies de resposta para a  $A_{CT}$  para o óleo de canola são apresentadas nas Figuras 4.8 e 4.9.



**Figura 4.8.**  $A_{CT}$  para o óleo de canola (razão molar e temperatura).



**Figura 4.9.**  $A_{CT}$  para o óleo de canola (quantidade de enzima e temperatura).

As superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 4.8 e 4.9 confirmam os resultados mostrados na Tabela 4.8. Para um aumento na atividade da enzima com relação ao consumo dos triacilgliceróis do óleo de canola, menores quantidades de enzima e de etanol devem ser usadas. O etanol em excesso presente no meio reacional favorece o deslocamento do equilíbrio da reação de transesterificação em favor dos produtos. Contudo, este excesso pode causar uma inibição competitiva da enzima (SALUM *et al.*, 2010; ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009). Outro fator que pode diminuir a atividade enzimática é a inibição pelos produtos formados na reação (ésteres e glicerol) (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009; AL-ZUHAIR *et al.*, 2013). Ainda, a queda na atividade enzimática e no rendimento de alquil ésteres a altas concentrações de álcool reflete a habilidade do excesso de álcool em remover a camada de água essencial que estabiliza as enzimas (KOSE; TUTER, AKSOY, 2002). Com relação às grandes quantidades de enzima presentes na reação, Gao *et al.* (2006) reportam que a formação de partículas agregadas de lipase podem diminuir significativamente a conversão dos triacilgliceróis em ésteres, devido a uma limitação difusional entre as moléculas. Estes comportamentos relatados pelos autores confirmam os resultados de  $A_{CT}$  apresentados na Tabela 4.5, onde os maiores valores são observados para a menor razão molar e quantidade de enzima.

Os resultados de rendimento em ésteres e atividade da enzima para o consumo dos triacilgliceróis ( $A_{CT}$ ) e a matriz do planejamento para o óleo de pinhão manso, com a enzima livre em reator batelada, são apresentados na Tabela 4.10.

**Tabela 4.10.** Matriz do planejamento para transesterificação etílica do óleo de pinhão manso.

Ensaio	T (° C)	Razão molar álcool:óleo	Quantidade de enzima (%)	Rendimento em ésteres etílicos (%)	A <sub>CT</sub> (U·g proteína <sup>-1</sup> )
1	40 (-1)	6:1 (-1)	5 % (-1)	33,00	44,65
2	60 (1)	6:1 (-1)	5 % (-1)	36,29	50,06
3	40 (-1)	12:1 (1)	5 % (-1)	28,11	8,46
4	60 (1)	12:1 (1)	5 % (-1)	34,93	8,14
5	40 (-1)	6:1 (-1)	10 % (1)	38,23	48,86
6	60 (1)	6:1 (-1)	10 % (1)	36,67	49,90
7	40 (-1)	12:1 (1)	10 % (1)	38,65	5,98
8	60 (1)	12: (1)	10 % (1)	39,72	27,63
9	50 (0)	9:1 (0)	7,5% (0)	43,74	27,72
10	50 (0)	9:1 (0)	7,5% (0)	41,55	29,44
11	50 (0)	9:1 (0)	7,5% (0)	42,61	37,74
12	50 (0)	9:1 (0)	7,5% (0)	42,28	33,42

A estimativa dos efeitos principais e das interações entre as variáveis para o planejamento, com relação ao rendimento em ésteres, são apresentadas na Tabela 4.11, para o intervalo de confiança de 90%. Os valores destacados em *itálico* e **negrito** indicam que o efeito é significativo.

**Tabela 4.11.** Estimativa dos efeitos para o rendimento em ésteres etílicos do óleo de pinhão manso.

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
<b><i>Intercepto</i></b>	<b><i>37,93</i></b>	<b><i>1,63</i></b>	<b><i>0,00</i></b>	<b><i>37,93</i></b>
T (°C)	2,40	3,99	0,58	1,20
Razão molar álcool:óleo	-0,70	3,99	0,87	-0,35
Quantidade de enzima (%)	5,25	3,99	0,26	2,63
T x Razão molar	1,60	3,99	0,71	0,80
T x Quantidade de enzima	-2,65	3,99	0,54	-1,33
T x Razão molar x Quantidade de enzima	2,45	3,99	0,57	1,23

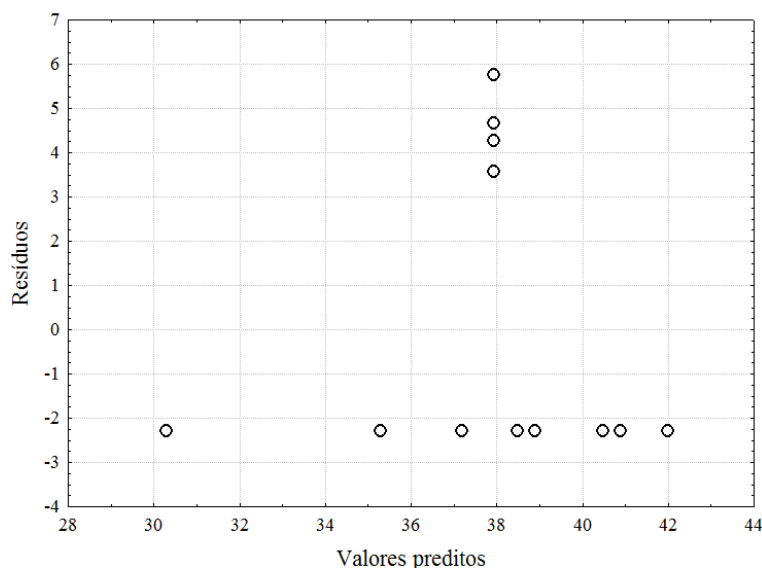
R<sup>2</sup> = 0,44; R = 0,66

Na Tabela 4.11 observa-se que nenhuma das variáveis avaliadas e nem suas interações foram significativas. Neste caso, o efeito da razão molar e a interação entre temperatura e quantidade de enzima são negativos. Para o óleo de pinhão manso, estes resultados podem sugerir que um maior aumento na temperatura ou na razão molar pode influenciar o processo de maneira negativa, gerando uma inibição competitiva da enzima pelo substrato, ou também uma inativação da proteína pelo excesso de etanol. Temperaturas muito elevadas poderiam desnaturar termicamente a enzima. A análise de variância do planejamento é apresentada na Tabela 4.12.

**Tabela 4.12.** Análise de variância do rendimento em ésteres etílicos para o óleo de pinhão manso.

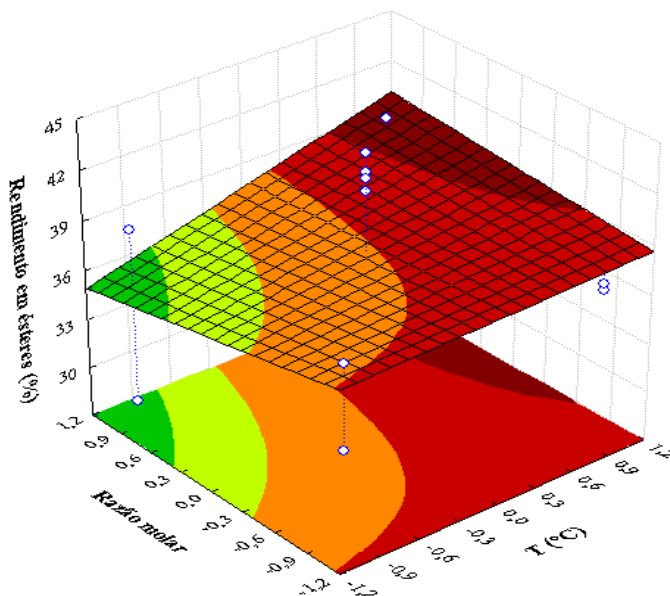
Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calc</sub>
Regressão	98,92	7	14,13	0,44
Resíduos	127,67	4	31,92	
Total	226,59	11		

O valor tabelado de F, para o intervalo de confiança de 90%, e com os respectivos graus de liberdade (7; 4; 0,1) é de 3,98. Pelo teste F, o valor calculado de F é menor do que o valor tabelado. Assim, o modelo linear proposto pelo planejamento não é válido. O gráfico dos resíduos em função dos valores preditos (Figura 4.10) demonstra a falta de ajuste dos valores obtidos em relação ao modelo de regressão linear proposto.

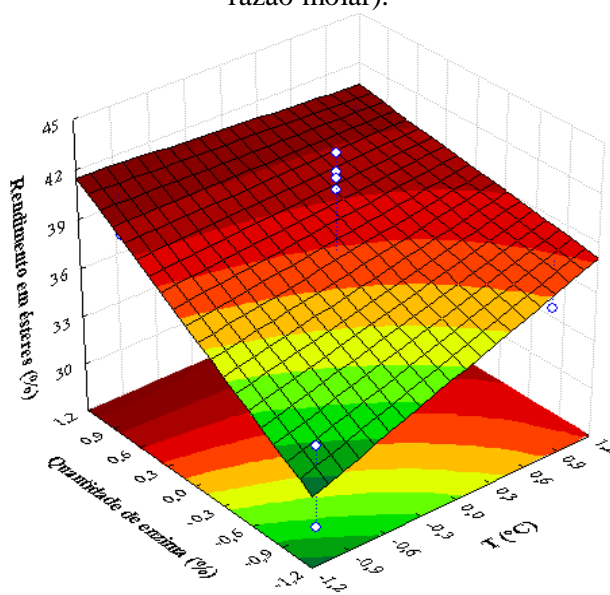


**Figura 4.10.** Resíduos do modelo para rendimento em ésteres etílicos para o óleo de pinhão manso.

Mesmo com a não validação do modelo linear proposto, é possível adotar a metodologia de superfície de resposta para os resultados obtidos, para verificar um direcionamento das variáveis avaliadas, com o intuito de aumentar o rendimento dos ésteres produzidos. Os gráficos obtidos por esta metodologia, referente ao óleo de pinhão manso são apresentados nas Figuras 4.11 e 4.12.



**Figura 4.11.** Rendimento em ésteres etílicos para o óleo de pinhão manso (temperatura e razão molar).



**Figura 4.12.** Rendimento em ésteres etílicos para o óleo de pinhão manso (temperatura e quantidade de enzima).

As Figuras 4.11 e 4.12 indicam que um aumento no rendimento em ésteres pode ser obtido em valores mais altos de temperatura (60 °C) e quantidade de enzima (10%), e um valor intermediário de razão molar (9:1). Os resultados obtidos das superfícies de resposta para o óleo de pinhão manso sugerem um aumento elevado na temperatura e na quantidade de enzima, para a obtenção de maiores rendimentos em ésteres. Isto dificultaria a reação, já que uma quantidade excessiva de enzima no meio reacional promoveria a formação de

aglomerados sólidos, gerando uma limitação difusional do processo, e o emprego de temperaturas muito elevadas poderia causar a desnaturação da enzima.

A estimativa dos efeitos principais e das interações entre as variáveis para o planejamento, referente à  $A_{CT}$  para o óleo de pinhão manso, são apresentadas na Tabela 4.13, com um intervalo de confiança de 90%. Os valores destacados em itálico e negrito indicam que o efeito é significativo.

**Tabela 4.13.** Estimativa dos efeitos para  $A_{CT}$  do óleo de pinhão manso.

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficiente
<i>Intercepto</i>	<b>31,00</b>	<i>1,17</i>	<b>0,00</b>	<b>31,00</b>
<i>T (°C)</i>	<b>6,94</b>	<i>2,88</i>	<b>0,07</b>	<b>3,47</b>
<i>Razão molar álcool:óleo</i>	<b>-35,81</b>	<i>2,88</i>	<b>0,00</b>	<b>-17,90</b>
Quantidade de enzima (%)	5,26	2,88	0,14	2,63
T x Razão molar	3,72	2,88	0,26	1,86
T x Quantidade de enzima	4,40	2,88	0,20	2,20
Razão molar x Quantidade de enzima	3,24	2,88	0,32	1,62
<b><i>T x Razão molar x Quantidade de enzima</i></b>	<b>6,58</b>	<b>2,88</b>	<b>0,08</b>	<b>3,29</b>

$R^2 = 0,95$ ;  $R = 0,97$

Na Tabela 4.13 observa-se que todas as variáveis temperatura e razão molar e a interação entre as três variáveis foram significativas, sendo a razão molar a variável que influencia mais fortemente o processo, e de maneira negativa. A interação entre as três variáveis demonstra que todas as variáveis avaliadas são importantes na atividade da enzima. Porém, para este caso, temperatura e razão molar são as variáveis que influenciam de maneira significativa o processo. A análise de variância do planejamento para a  $A_{CT}$  é apresentada na Tabela 4.14.

**Tabela 4.14.** Análise de variância da  $A_{CT}$  para o óleo de pinhão manso.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$F_{calc}$
Regressão	2891,45	7	413,06	24,73
Resíduos	66,81	4	16,7	
Total	2958,26	11		

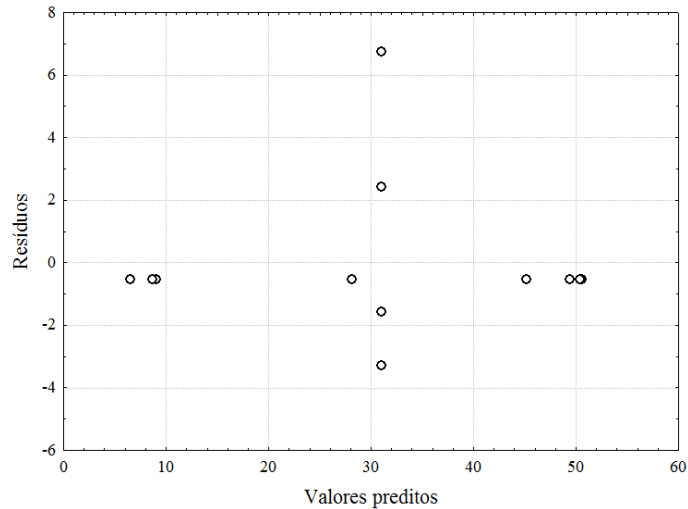
O valor tabelado de F, para o intervalo de confiança de 90%, e com os respectivos graus de liberdade (7; 4; 0,1) é de 3,98. Pelo teste F, o valor calculado de F é maior do que o valor tabelado. Assim, o modelo linear proposto pelo planejamento é válido. Pode-se então escrever empiricamente o modelo de regressão linear que descreve o comportamento da  $A_{CT}$  em função das variáveis significativas e suas interações (Equação 10).

$$A_{CT}(\text{U}\cdot\text{g prote\u00edna}^{-1})=31+3,47\cdot T-17,9\cdot R.M.+3,29\cdot T\cdot R.M.\cdot Q.E \quad (10)$$

onde:

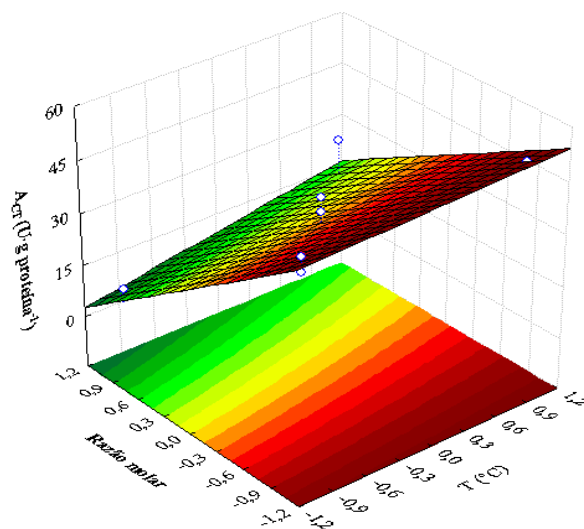
T \u00e9 a vari\u00e1vel temperatura;

Os res\u00edduos do modelo em fun\u00e7\u00e3o dos valores preditos (Figura 4.13) distribuem-se aleatoriamente e pr\u00f3ximos ao ponto zero, indicando um ajuste satisfat\u00f3rio do modelo proposto com os dados experimentais.



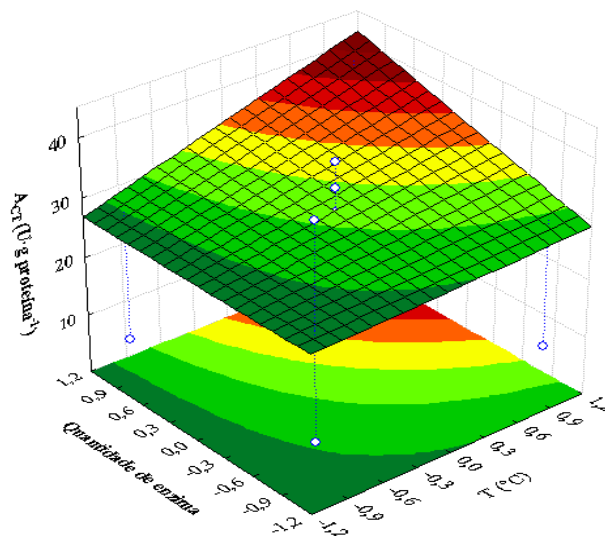
**Figura 4.13.** Res\u00edduos do modelo para  $A_{CT}$  para o \u00f3leo de pinh\u00e3o manso.

As superf\u00edcies de resposta para a  $A_{CT}$  para o \u00f3leo de pinh\u00e3o manso s\u00e3o apresentadas nas Figuras 4.14 e 4.15.



**Figura 4.14.**  $A_{CT}$  para o \u00f3leo de pinh\u00e3o manso (raz\u00e3o molar e temperatura).





**Figura 4.15.**  $A_{CT}$  para o óleo de pinhão manso (quantidade de enzima e temperatura).

As superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 4.14 e 4.15 indicam que a atividade enzimática para o consumo dos triacilgliceróis do óleo de pinhão manso pode aumentar se os ensaios forem conduzidos nas faixas de maior temperatura e quantidade de enzima e menor razão molar. Quando uma enzima é adicionada a um meio reacional com temperaturas muito elevadas, pode ocorrer uma desnaturação pelo relaxamento da estrutura terciária da proteína. Portanto, quando as superfícies de resposta sugerem uma maior atividade enzimática em temperaturas elevadas, é preciso levar em consideração a faixa ótima de temperatura em que a enzima poderá catalisar a reação, sem que ocorra sua desnaturação. Em faixas onde a enzima é termicamente estável, temperaturas mais elevadas podem propiciar maiores atividades pela maior agitação das moléculas do meio reacional, favorecendo o contato do substrato com o sítio ativo da enzima. O efeito de desnaturação da enzima em altas temperaturas foi observado por Aryee *et al.* (2013), que relataram uma queda no rendimento em ésteres em experimentos conduzidos a 60 °C. Narwal e Gupta (2013) reportam casos semelhantes, onde a enzima sofreu desnaturação em 60 °C, na obtenção de ésteres para a produção de biodiesel.

Os maiores rendimentos em ésteres foram semelhantes para os dois óleos, acima de 40%. Contudo, o óleo de canola refinado, obtido comercialmente, apresentou um índice de acidez de 0,19 mg de KOH·g<sup>-1</sup>. Já para o óleo de pinhão manso bruto, obtido por prensagem da semente, foi de 10,14 mg de KOH·g<sup>-1</sup>. Estes resultados mostram que a lipase pode converter ácidos graxos livres em ésteres, considerando os resultados semelhantes de rendimentos em ésteres para os dois óleos com características de acidez distintas. Deeba *et*

al. (2012) obtiveram rendimentos de 94% com óleo de pinhão manso neutralizado e catálise química. Empregando catálise enzimática e óleo de pinhão manso bruto, alcançaram um rendimento de 80%, confirmando a capacidade da enzima na conversão dos ácidos graxos em ésteres.

Uma hipótese a ser considerada, para o caso específico do planejamento experimental realizado neste trabalho, é que nenhuma das variáveis e suas interações avaliadas apresentam um grau de importância maior, em detrimento de outra, para o rendimento em ésteres. Isto é, temperatura, quantidade de enzima e razão molar são igualmente relevantes na obtenção dos ésteres por transesterificação enzimática, sem que alguma delas se destaque no rendimento final da reação. As três variáveis interagem significativamente para o processo, se anulando estatisticamente. Isto pode explicar a não validação dos modelos propostos no planejamento experimental para o rendimento em ésteres.

Portanto, analisando os resultados obtidos até aqui, e de acordo com os maiores rendimentos em ésteres obtidos para os óleos de canola (Tabela 4.5) e pinhão manso (Tabela 4.10) e o comportamento da enzima com relação à atividade de consumo dos triacilgliceróis, optou-se por conduzir as reações com a enzima imobilizada em reator de leito fixo a 50 °C e com razão molar álcool:óleo de 9:1.

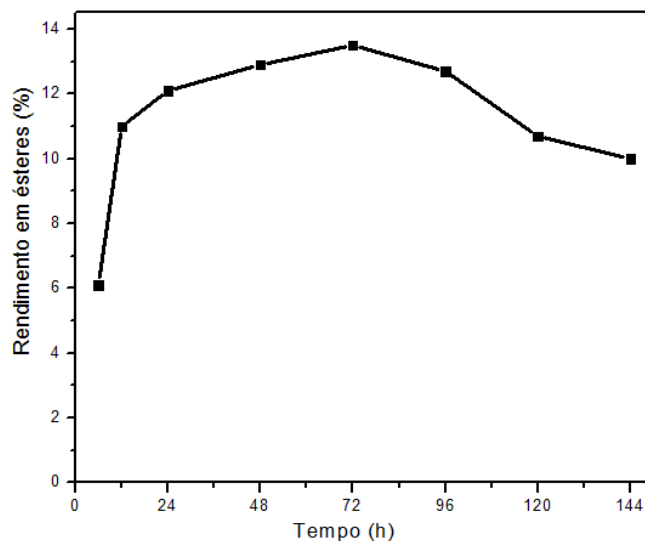
#### **4.8. Produção de ésteres etílicos com a enzima imobilizada**

Os resultados obtidos na transesterificação etílica em reator de leito fixo dos óleos de canola e pinhão manso empregando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada serão apresentados nesta seção.

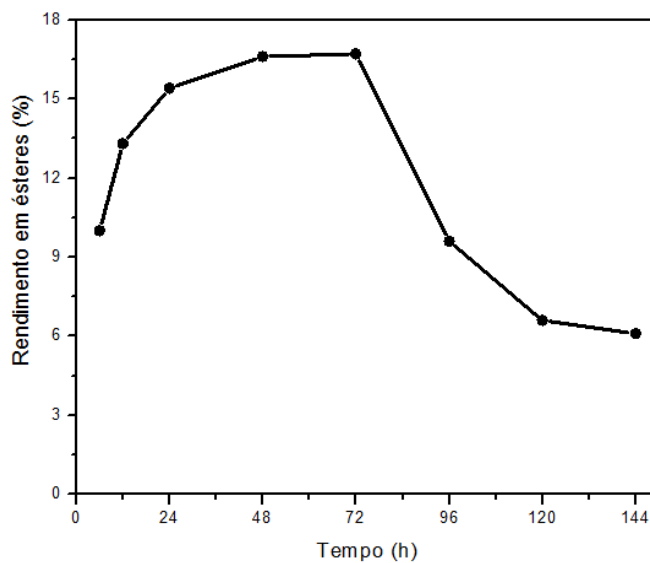
A seleção da enzima imobilizada foi realizada de acordo com os melhores resultados apresentados pela atividade de transesterificação e pela caracterização textural, para os biocatalisadores preparados usando diferentes precursores de sílica e tipos de secagem. A imobilização com o precursor de sílica TEOS mostrou os maiores valores de atividade, para ambas as secagens (Tabela 4.3). Como estes resultados foram próximos, optou-se pela utilização da secagem por evaporação, que torna o processo mais vantajoso economicamente. Os rendimentos de transesterificação foram calculados de acordo com a Equação (7), e pela quantificação, por meio de CLAE, dos ésteres produzidos.

Testes preliminares foram executados em reator batelada, com a enzima imobilizada, antes da realização da reação em reator de leito fixo, com o objetivo de

verificar os rendimentos alcançados pela enzima imobilizada. Os parâmetros da reação foram adotados de acordo com os maiores valores de rendimento em ésteres para as reações com a enzima livre (Tabelas 4.5 e 4.10). Assim, com temperatura de 50 °C, razão molar álcool:óleo de 9:1 e 7,5% de enzima imobilizada (aproximadamente 6 g) presente no meio reacional, reações com 144 h foram conduzidas, com agitação orbital constante (300 rpm), sem a adição de cossolvente. Os resultados, em duplicata, para o rendimento em ésteres são apresentados nas Figuras 4.16 e 4.17.



**Figura 4.16.** Rendimento em ésteres na transesterificação do óleo de canola e etanol catalisada por lipase imobilizada em matriz sol-gel (batelada).



**Figura 4.17.** Rendimento em ésteres na transesterificação do óleo de pinhão manso e etanol catalisada por lipase imobilizada em matriz sol-gel (batelada).

Os maiores rendimentos alcançados foram de 13,5% para o óleo de canola e 17% para o óleo de pinhão manso, ambos com 72 h de reação.

Os baixos rendimentos em ésteres obtidos nesta etapa podem ser justificados pela formação do glicerol no meio reacional. O coproduto formado tende a adsorver na superfície do suporte de sílica, dificultando o contato do substrato com o sítio ativo da enzima. Em comparação ao trabalho realizado por Kawakami, Oda e Takahashi (2011), os autores verificaram uma diminuição de 30% no rendimento em ésteres, sem o uso de cossolvente, na obtenção de metil ésteres por processo enzimático a partir do óleo de pinhão manso. Com o emprego de t-butanol no meio reacional, alcançaram um rendimento de 85%. Chang *et al.* (2005), Kumari *et al.* (2009) e Fernandes *et al.* (2007) obtiveram rendimentos em ésteres superiores a 90%, com a utilização de cossolventes no meio reacional. Os resultados apresentados por estes autores evidenciam que a presença de cossolvente, apesar de tornar o custo do processo mais elevado, pode diminuir o efeito negativo do glicerol na formação do produto de interesse. De acordo com Knothe (2006), a utilização de cossolventes propicia a solvatação dos ésteres e do glicerol presentes no meio reacional, favorecendo o deslocamento do equilíbrio reacional na direção dos produtos, promovendo um aumento no rendimento em ésteres. O emprego de isopropanol para a remoção do glicerol ou ainda a eliminação do coproduto por diálise realizada no meio reacional também são relatados por Xu *et al.* (2004) e Bako *et al.* (2002).

Robles-Medina *et al.* (2009) afirmam que a utilização de cossolventes orgânicos é necessária, procurando-se evitar o seu emprego em altas quantidades, para não causar a inibição ou desativação da enzima. Os óleos dissolvem-se bem em solventes orgânicos apolares, diminuindo a viscosidade da mistura reacional e evitando reações colaterais, como a hidrólise. O emprego de cossolventes na transesterificação pode propiciar um aumento da velocidade da reação, e não torna-se um obstáculo econômico ao processo, por serem relativamente baratos e de fácil recuperação. Uma das desvantagens da não utilização de cossolventes, segundo os autores, é que nem todo o álcool utilizado como receptor do grupo acila pode solubilizar-se no óleo, podendo assim gerar uma inativação da lipase.

Outro fator que pode afetar o rendimento em ésteres na reação é a formação de água durante a transesterificação, que favorecerá a reação de hidrólise (ARYEE *et al.*, 2013). Apenas uma quantidade relativamente pequena de água é necessária para manter a integridade da estrutura tridimensional da proteína e a polaridade do sítio ativo. Como a enzima imobilizada utilizada nesta etapa apresentou um teor de umidade de,

aproximadamente, 35%, acredita-se que esta quantidade de água, presente nos interstícios da matriz sólida, seja suficiente para estabilizar a estrutura da enzima. Assim, uma formação de água durante a transesterificação poderá favorecer a reação inversa (hidrólise), diminuindo o rendimento final do produto desejado. E uma maior formação de água pode ocorrer de maneira mais pronunciada pela reação de esterificação dos ácidos graxos livres, presentes em maior quantidade no óleo de pinhão manso. Isto justifica a queda mais acentuada nos rendimentos em ésteres para este óleo, após 72 h de reação.

Com relação aos resultados obtidos nesta etapa, o maior rendimento para o óleo de pinhão manso pode evidenciar a capacidade da enzima de converter os ácidos graxos livres presentes no óleo em etil ésteres. O óleo bruto de pinhão manso utilizado neste trabalho apresentou um elevado índice de acidez, em comparação ao óleo de canola comercial. Embora a velocidade de reação catalisada por lipases seja menor, quando comparada aos catalisadores químicos, Lam, Lee e Mohamed (2010) consideram as enzimas como uma alternativa promissora aos processos químicos, por tornarem o processo menos impactante ao ambiente e, principalmente pelo fato de serem resistentes aos ácidos graxos livres, reduzindo a necessidade de pré-tratamento dos substratos e minimizando a formação de sabões durante a reação.

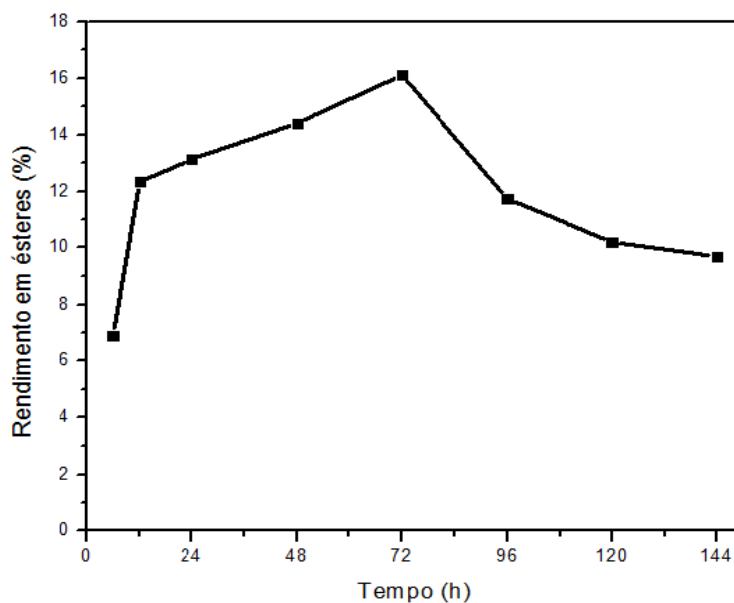
Como exemplos, Wu *et al.* (1999) obtiveram 85,4% de rendimento na produção de biodiesel a partir de resíduos de óleo de restaurantes, utilizando 13,7 g de lipase de *Pseudomonas cepacia*, a 38,4 °C, com uma razão molar de 6,6:1 de etanol:óleo. Empregando a mesma enzima, imobilizada em matriz sol-gel, Hsu *et al.* (2002) alcançaram 84% de rendimento na produção de biodiesel a partir de resíduos de óleo e álcool primário, com uma razão molar álcool:óleo de 4:1. Na produção de ésteres a partir do sebo, Nelson, Foglia e Marmer (1996) obtiveram rendimentos entre 14 e 29%, empregando alcoóis primários (metanol, etanol e isobutanol), com uma razão molar álcool:óleo de 3:1, em uma reação catalisada pela lipase de *Pseudomonas cepacia*.

Desta forma, apesar dos baixos rendimentos obtidos com a enzima imobilizada neste trabalho, os resultados apresentados na literatura, quando comparados aos resultados deste trabalho, demonstram que partindo de aprimoramentos no processo de obtenção dos ésteres, poderá haver viabilidade técnica e econômica no emprego da lipase de *Burkholderia cepacia* para a obtenção de biocombustível.

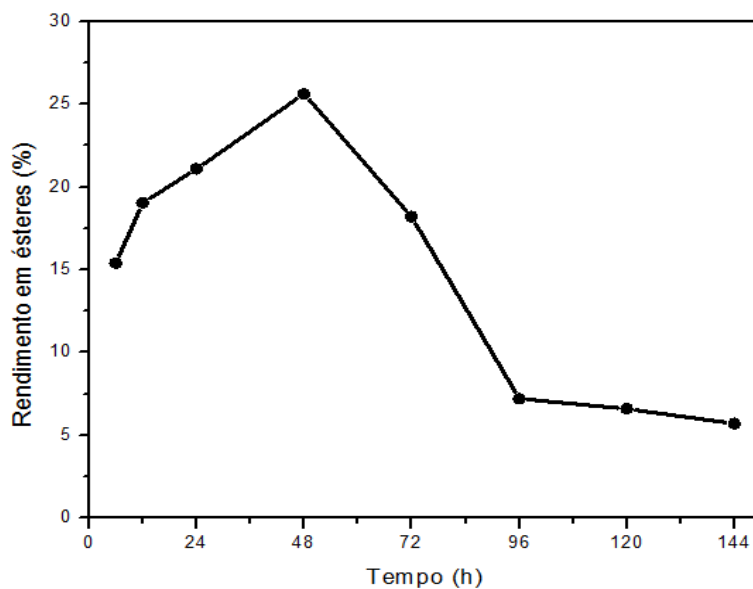
Para a realização dos ensaios em reator de leito fixo (seção 3.3.11), foram utilizados os mesmos parâmetros de reação empregados nos testes em batelada, com a enzima imobilizada, porém, com uma maior quantidade de biocatalisador (aproximadamente 13 g),

proporcionando uma altura de leito catalítico de 25 cm, com o objetivo de aumentar o tempo de residência e, conseqüentemente, o rendimento em ésteres na reação.

Nesta etapa foi utilizado como cossolvente n-hexano, com o intuito de aumentar a miscibilidade do óleo com o etanol e remover parte do glicerol formado na reação. Os rendimentos em ésteres para os óleos de canola e pinhão manso, após 144 h de reação, são apresentados nas Figuras 4.18 e 4.19.



**Figura 4.18.** Rendimento em ésteres na transesterificação do óleo de canola e etanol catalisada por lipase imobilizada e matriz sol-gel (leito fixo).



**Figura 4.19.** Rendimento em ésteres na transesterificação do óleo de pinhão manso e etanol catalisada por lipase imobilizada em matriz sol-gel (leito fixo).

Os maiores rendimentos em ésteres alcançados nas reações conduzidas em leito fixo foram de 16% para o óleo de canola, após 72 h de reação, e de 26% para o óleo de pinhão manso, após 48 h de reação. Assim como nas reações conduzidas em batelada com a enzima imobilizada, aqui um maior rendimento em ésteres para o óleo de pinhão manso é novamente observado. Como a lipase tem a característica de converter os ácidos graxos livres do substrato acredita-se que a maior quantidade destas moléculas presentes no óleo de pinhão manso, em comparação ao óleo de canola, possa ter propiciado uma maior formação de ésteres.

Nesta etapa, os rendimentos obtidos foram superiores aos rendimentos alcançados com a enzima imobilizada em reator batelada. Um dos fatores que pode justificar este aumento foi a utilização de um cossolvente na mistura reacional. A transesterificação é uma reação lenta, que requer de 30 min a algumas horas para conduzir à formação dos produtos, dependendo do tipo de catalisador utilizado. Isto ocorre porque os substratos utilizados (triacilgliceróis e alcoóis) não são miscíveis, causando limitações de transferência de massa, principalmente no início da reação (LAM; LEE; MOHAMED, 2010). Alguns autores apresentam um aumento no rendimento em ésteres com o uso de cossolventes, como o tetrahidrofurano, hexano e dietil éter (GUAN; KUSAKABE; YAMASAKI, 2009; CHAI *et al.*, 2007; PEÑA *et al.*, 2009). Robles-Medina *et al.* (2009) relatam que os óleos dissolvem-se muito bem em solventes apolares orgânicos, como o hexano. Estes solventes diminuem a viscosidade da mistura reacional, importante em experimentos conduzidos em leito, além de diminuir as reações colaterais. Sabe-se que as lipases são tolerantes a solventes orgânicos. Então, um dos principais fatores para a não utilização de cossolventes é o encarecimento do processo, nas etapas de separação e purificação dos produtos de interesse (SALUM *et al.*, 2010; GHARAT e RATHOD, 2013). Porém, em meios reacionais livres de cossolventes, nem todo o álcool presente é solubilizado e, conseqüentemente, consumido. Além disso, nestes casos a velocidade de reação é ainda menor, fato que implicaria em um maior tempo de reação, com maior consumo de energia, tornando o processo igualmente mais caro.

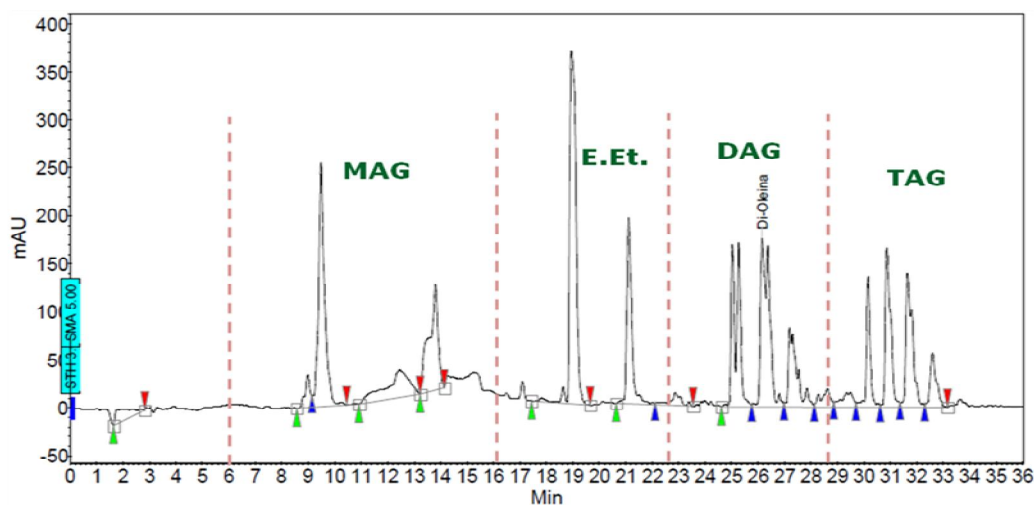
Outra condição que pode ter influenciado o aumento no rendimento em ésteres nas reações conduzidas em leito fixo foi a maior quantidade de enzima imobilizada empregada (cerca de 13 g). Com uma atividade de transesterificação de 1805 U·g<sup>-1</sup> de biocatalisador, a atividade enzimática total presente no meio reacional foi de 23465 U. De acordo com Aryee *et al.* (2013), um aumento da carga enzimática aumenta o número de sítios ativos disponíveis para se ligarem ao substrato, com conseqüente aumento de rendimento. Porém,

segundo os mesmos autores, nestas reações pode ocorrer o “sequestro” de sítios ativos da enzima com o aumento da carga enzimática, e a quantidade de sítios ativos disponíveis para catalisar a reação não é suficiente para que elevados rendimentos sejam alcançados. Isto pode ajudar a elucidar os baixos rendimentos em ésteres obtidos neste trabalho.

Ainda, o glicerol formado e presente no meio reacional pode ter contribuído para uma diminuição na atividade catalítica da lipase. O coproduto adsorve na superfície da matriz sólida, gera um entupimento dos poros da matriz e dificulta o acesso do substrato ao sítio ativo. Mesmo com a utilização do n-hexano como cossolvente, acredita-se que não foi possível remover todo o glicerol formado pela reação. O efeito do glicerol no rendimento da reação torna-se mais proeminente em sistemas contínuos (Antczak *et al.*, 2009). Alguns autores observaram uma queda acentuada na atividade de lipases imobilizadas em matrizes hidrofílicas em meios reacionais com formação de glicerol. As moléculas do glicerol se adsorveram na superfície, formando um revestimento hidrofílico na matriz, tornando inacessível o sítio ativo da enzima pelo substrato hidrofóbico. A utilização de outras substâncias hidrofílicas (como acetona ou sílica gel) promoveu a remoção parcial do glicerol, aumentando o rendimento da reação (DU; XU; LIU, 2003; DOSSAT; COMBES; MARTY, 1999).

#### 4.8.1. Quantificação e identificação dos produtos da transesterificação enzimática

A quantificação dos produtos da transesterificação etílica dos óleos de canola e pinhão manso (seção 3.3.8) foi realizada por CLAE. Um cromatograma típico para a identificação e quantificação dos produtos da reação é apresentado na Figura 4.20.



**Figura 4.20.** Identificação e quantificação dos produtos da transesterificação enzimática dos óleos de canola e pinhão manso na presença de etanol. MAG (monoacilgliceróis), DAG (diacilgliceróis), TAG (triacilgliceróis), E.Et. (ésteres etílicos).



Os picos correspondentes às faixas de cada um dos produtos identificados foram somados e quantificados por meio de CLAE, com padronização externa (curvas padrão), e o cálculo do rendimento em ésteres etílicos foi realizado pela relação entre a quantidade final de ésteres formados e a quantidade de ésteres que poderiam ser formados, caso houvesse uma conversão de 100% de todos os regentes no produto final de interesse (éster etílico).

Apesar dos rendimentos obtidos neste trabalho não terem sido elevados, a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* para a produção de ésteres etílicos mostrou-se viável, dentro das condições adotadas para a realização da reação de transesterificação. A enzima imobilizada teve atividade de transesterificação semelhante à enzima livre, e o óleo de pinhão manso, considerado um substrato alternativo por ser impróprio para o consumo humano apresentou rendimentos em ésteres superiores aos do óleo de canola com a enzima imobilizada.

## 5. CONCLUSÕES

A fundamentação teórica e os resultados experimentais obtidos neste trabalho permitem enunciar as seguintes conclusões:

- A lipase de *Burkholderia cepacia* apresenta uma boa capacidade para realizar a reação de transesterificação. Na determinação da atividade de transesterificação da enzima, os resultados para a enzima imobilizada (TEOS-Evaporação: 1805 U·g<sup>-1</sup>; TEOS-Supercrítico: 2028 U·g<sup>-1</sup>; TMOS-Evaporação: 1539 U·g<sup>-1</sup>; TMOS-Supercrítico: 1562 U·g<sup>-1</sup>) foram semelhantes ao resultado para a enzima livre (2131 U·g<sup>-1</sup>), e superiores aos resultados de atividade de esterificação.
- A enzima imobilizada em matriz hidrofóbica sol-gel empregando o precursor de sílica TEOS apresenta os melhores valores de atividade de transesterificação, em comparação aos resultados com a utilização do precursor TMOS. Isto é comprovado pelo maior valor de atividade de transesterificação e pelos resultados da caracterização textural, que, para o precursor TEOS, atingiu os maiores valores de área superficial (48,37 m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup>), volume de poros (0,0696 cm<sup>3</sup>·g<sup>-1</sup>) e diâmetro dos poros (60,17 Å).
- Com relação aos diferentes tipos de secagem, os biocatalisadores secos em meio supercrítico (aerogel) apresentaram as maiores atividades de transesterificação, em relação à secagem por evaporação (xerogel). Porém, valores da atividade da enzima para as duas secagens foram semelhantes.
- As imagens das micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostram indícios de uma superfície com maior quantidade de poros no aerogel. Contudo, não são conclusivas ao ponto de interferir na escolha do biocatalisador pela atividade de transesterificação, para a produção dos ésteres em meio contínuo.
- O planejamento experimental realizado para a enzima livre, com os óleos de canola e pinhão manso e etanol, sem a utilização de cossolvente, mostrou que as variáveis avaliadas no processo (temperatura, quantidade de enzima e razão molar álcool:óleo) não foram significativas, para o rendimento em ésteres.
- Os rendimentos em ésteres com a enzima livre não foram elevados (inferiores a 50%). Porém, pela análise dos resultados e por meio das superfícies de resposta, os maiores valores para os óleos de canola (45%) e pinhão manso (42,5%) foram obtidos no ponto central do experimento (temperatura de 50 °C, razão molar álcool:óleo de 9:1 e 7,5% de enzima, em massa, em relação à quantidade de óleo). Estes parâmetros da reação foram utilizados na condução dos experimentos em reator de leito fixo.

- A atividade de consumo dos triacilgliceróis ( $A_{CT}$ ) presentes no início da reação, calculada pelo método das velocidades iniciais, mostrou que as três variáveis avaliadas no planejamento experimental são significativas, com destaque para a razão molar e a quantidade de enzima. Pelos resultados alcançados, fica claro que o valor de  $A_{CT}$  diminui com o aumento da quantidade de etanol presente no meio, indicando uma inibição da enzima pelo excesso do álcool.
- Na transesterificação realizada com a enzima imobilizada, os ensaios realizados em reator batelada e sem a presença de cossolvente apresentaram um rendimento em ésteres inferiores, para os dois óleos (13,5% para o óleo de canola e 17% para o óleo de pinhão manso), em relação aos resultados obtidos em leito fixo (16% para o óleo de canola e 26% para o óleo de pinhão manso). Os baixos valores de rendimento podem evidenciar uma diminuição da atividade da enzima pela ação do glicerol formado na reação, além de uma possível formação de água no meio reacional, favorecendo a reação de hidrólise.
- Na condução dos experimentos em leito fixo com os dois óleos e etanol, a temperatura de 50 °C e a razão molar álcool:óleo de 9:1 foram mantidas, de acordo com os ensaios realizados com a enzima livre e imobilizada, em batelada. Nesta etapa, uma maior quantidade de enzima foi empregada (aproximadamente 13 g). Também foi adicionado um cossolvente (n-hexano), a fim de favorecer a mistura entre o óleo e o etanol e remover parte do glicerol adsorvido na superfície da matriz sólida. Estas metas foram parcialmente alcançadas. Os rendimentos em ésteres em meio contínuo, com a enzima imobilizada, foram superiores aos valores obtidos em batelada. Porém, não foram elevados, o que indica que os efeitos de inibição da enzima ainda continuaram presentes no meio reacional.
- Para os dois óleos utilizados neste trabalho, em todos os experimentos realizados, com a enzima imobilizada, com e sem a adição de cossolvente, os maiores rendimentos sempre foram obtidos para o óleo bruto de pinhão manso (17% em batelada e 26% em sistema contínuo), em relação ao óleo de canola comercial (13,5% em batelada e 16% em sistema contínuo).
- A partir dos parâmetros adotados para a condução da transesterificação de diferentes óleos em presença de etanol, por meio de catálise enzimática, os resultados alcançados neste trabalho demonstram a viabilidade do emprego da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada para a obtenção de ésteres de interesse comercial. Com o aprimoramento das condições de reação e das técnicas de quantificação do produto de interesse, os ésteres produzidos poderão ser caracterizados e aplicados como

biocombustível, ou em outras áreas de interesse comercial, como conservantes, aromatizantes e palatilizantes.

## 6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Na obtenção de ésteres para aplicação como biocombustível por meio da catálise enzimática, diversos fatores influenciam o processo e afetam diretamente o rendimento final do produto de interesse. Partindo dos resultados obtidos neste trabalho, algumas sugestões para trabalhos futuros podem ser mencionadas:

- Realização de reações de transesterificação empregando mais de uma lipase, com diferentes características quanto ao ataque das ligações do triaciglicerol utilizado como substrato;
- Investigação de diferentes tipos de solventes (n-hexano, n-heptano, t-butanol dentre outros) nas reações com enzima imobilizada (inclusive líquidos iônicos);
- Produção de ésteres com enzima imobilizada em sistema contínuo com reatores em série;
- Produção de ésteres com enzima imobilizada em sistema de batelada alimentada, que poderia amenizar o efeito do glicerol formado na reação;
- Condução de reações que promovam a produção de ésteres de interesse específico, com aplicação em indústrias farmacêuticas, de cosméticos, de alimentos e conservantes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE. **Associação Brasileira da Indústrias de Óleos Vegetais**. Disponível em: <<http://www.abiove.com.br>>. Consultado em 7 de maio de 2013.

ALFAYA, A.A.S., KUBOTA, L.T. **A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores**. Química Nova, v.25, p. 835-841, 2002.

AL-ZUHAIR, S., AL-HOSANY, M., ZOOPA, Y., AL-HAMMADI, A., AL-KAABI, S. **Development of a membrane bioreactor for enzymatic hydrolysis of cellulose**. Renewable Energy, v.56, p.85-89, 2013.

AMANO Method. **Lipase PS “AMANO” IM**. Boletim técnico. Amano Enzyme INC, 2007.

ANP. **Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Consultado em 08 de maio de 2013.

ANTCZAK, M.S., KUBIAK, A., ANTCZAK, T., BIELECKI, S. **Enzymatic biodiesel synthesis – key factors affecting efficiency of the process**. Renewable Energy, v.34, p.1185-1194, 2009.

ARRUDA, F.P., BELTRÃO, N.E.M., ANDRADE, A.P., PEREIRA, W.E., SEVERINO, L.S. **Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curca L.*) como alternativa para o semi-árido nordestino**. Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas, v.8, p.789-799, 2004.

ARYEE, A.N.A., DUTILLEUL, P., PASZTI, M., SIMPSON, B.K. **Optimized transformation of animal fats to alkyl esters**. Fuel Processing Technology, v.109, p.103-110, 2013.

BAKO, K.B., KOVA, F.C.S., GUBICZA, L., HANSCO, J.K. **Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent free system**. Biocatalysis and Biotransformations, v.20, p.437-439, 2002.

BALAT, M., BALAT, H. **A critical review of bio-diesel as a vehicular fuel.** Energy Conversion and Management, v.49, p. 2727–2741, 2008.

BARABÁS, I., TODORUT, I. **Predicting the temperature dependent viscosity of biodiesel-diesel-bioethanol blends.** Energy Fuels, v.25, p.5767-5774, 2011.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos.** Campinas: Editora Unicamp, 2007.

BOUSQUET-DUBOUCH, M., GRABER, M., SOUSA, N., LAMARE, S., LEGOY, M. **Alcoholysis catalysed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water.** Biochimica et Biophysica Acta, v.1550, p.90-99, 2001.

BRADFORD, M.M. **A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL. **Brasil será o maior produtor de biodiesel em 2012.** 2011. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2011/11/09/brasil-sera-o-maior-produtor-de-biodiesel-em-2012>>. Consultado em 23 de novembro de 2012

BUENO, L.S.R., VELÁSQUEZ, J.A. **Estudo da influência da composição do biodiesel sobre o atraso de ignição de misturas B10 no motor,** 2007. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/caracterizacao/27.pdf>. Consultado em 22 de fevereiro de 2013.

BUISSON, P., HERNANDEZ C., PIERRE, M., PIERRE, A. C. **Encapsulation of lipases in aerogels.** Journal of Non-Crystalline Solids, v.285, p.295-302, 2001.

CAMPÀS, M., MARTY, J. **Encapsulations of enzymes using polymers and sol-gel techniques.** In: GUISAN, J.M. Immobilization of enzymes and cells, 2<sup>nd</sup> edition, Humana Press Inc., New Jersey, USA, 2006.

CARMO, B.B.T, PONTES, H.L.J., ALBERTIN, M.R., BARROS NETO, J.F., DUTRA, N.G.S. **Avaliação da demanda por biodiesel em função de um modelo de previsão de demanda por diesel.** Revista Produção on line, v.9, p.511-535, 2009.

CARVALHO, P.O., CAMPOS, P.R.B., NOFFS, M.D., OLIVEIRA, J.G., SHIMIZU, M.T., SILVA, D.M. **Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados.** Química Nova, v.26, p. 75-80, 2003.

CASTRO, H.F., OLIVEIRA, P.C., SOARES, C.M.F. **Síntese de ésteres terpenóides por via enzimática: influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.17, p.224-228, 1997.

CASTRO, H.F., MENDES, A.A., SANTOS, J.C., AGUIAR, C.L. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação.** Química Nova, v.27, p.146-156, 2004.

CHAI, F., CAO, F., ZHAI, F., CHEN, Y., WANG, X., SU, Z. **Transesterification of vegetable oil to biodiesel using a heteropolyacid solid catalyst.** Advanced Synthesis and Catalysis, v.349, p.1057-1065, 2007.

CHANG, H.M., LIAO, H.F., LEE, C.C., SHIEH, C.J. **Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.80, p.307-312, 2005.

CHEN, S., XIAO, B., CHANG, J., FU, Y., LV, P., WANG, X. **Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor.** Energy Conversion and Management, v.50, p.668-673, 2009.

CLAUDE, S. **Research of new outlets for glycerol-recent developments in France.** Fett/Lipid, v.101, p.101-104, 1999.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento.** 2013. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_12\\_12\\_10\\_34\\_43\\_boletim\\_can\\_a\\_portugues\\_12\\_2012.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_12_10_34_43_boletim_can_a_portugues_12_2012.pdf)>. Consultado em 17 de maio de 2013.



CONTESINI, F.J., LOPES, D.B., MACEDO, G.A., NASCIMENTO, M.G., CARVALHO, P.O. ***Aspergillus* sp. lipase: potential biocatalyst for industrial use.** Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, v.67, p.163-171, 2010.

COSTA, V.E.U., AMORIM, H.L.N. **O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente.** Química Nova, v.22, p.863-873, 1999.

CYGLER, M., GROCHULSKI, P., KAZLAUSKAS, R. L., SCHRAG, J.D., BOUTILLIER, F., RUBIN, B., SERREGI, A. N., GUPTA, A. K. **A structural basis for the chiral preferences of lipases.** Journal of the American Chemical Society, v. 116, p. 3180-3186, 1994.

DALLA-VECCHIA, R., NASCIMENTO, M.G., SOLDI, V. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros.** Química Nova, v.27, p.623-630, 2004.

DA RÓS, P.C.M., CASTRO, H.F., CARVALHO, A.K.F., SOARES, C.M.F., MORAES, F.F., ZANIN, G.M. **Microwave-assisted enzymatic synthesis of beef tallow biodiesel.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v.39, p.529-536, 2012.

DEEBA, F., KUMAR, V., GAUTAM, K., SAXENA, R.K., SHARMA, D.K. **Bioprocessing of *Jatropha curcas* seed oil and deoiled seed hulls for the production of biodiesel and biogas.** Biomass and Bioenergy, v.40, p.13-18, 2012.

DEMIRBAS, A. **Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol.** Energy Conversion and Management, v.43, p.2349-2356, 2002.

DIZGE, N., KESKINLER, B. **Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase.** Biomass and Bioenergy, v.32, p.1274-1278, 2008.

DIZGE, N., KESKINLER, B., TANRISEVEN, A. **Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer.** Biochemical Engineering Journal, v.44, p.220-225, 2009.

DOSSAT, V., COMBES, D., MARTY, A. **Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.25, p.194-200, 1999.

DU, W., XU, Y., LIU, D. **Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation.** *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.38, p.103-106, 2003.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.** 2007. Disponível em <<http://www.embrapa.br>>. Consultado em 20 de setembro de 2011.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry.** Textbook, 5<sup>th</sup> edition. Springer, New York, USA, 2004, Cap. 1.

FERNANDES, M.L.M., SAAD, E.B., MEIRA, J.A., RAMOS, L.P., MITCHELL, D.A., KRIEGER, N. **Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media.** *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, v.44, p.8-13, 2007.

FERNANDO, S., KARRA, P., HERNANDEZ, R., J.H.A, S.K. **Effect of incompletely converted soybean oil on biodiesel quality.** *Energy*, v.32, p.844-851, 2007.

FORESTI, M.L., FERREIRA, M.L. **Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.48, p.769-777, 2007.

FREEDMAN, B., BUTTERFIELD, R.O., PRYDE, E.H. **Transesterification kinetics of soybean oil.** *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.63, p.1375-1380, 1986.

FUKUDA, H., KONDO, A., NODA, H. **Biodiesel fuel production by transesterification of oils.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.92, p.405-416, 2001.

GAO, Y., TAN, T., NIE, K., WANG, F. **Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media.** *Chinese Journal of Biotechnology*, v.22, p.114-118, 2006.

GAO, B., XU, T., LIN, J., ZHANG, L., SU, E., JIANG, Z., WEI, D. **Improving the catalytic activity of lipase LipK107 from *Proteus* sp. by site-directed mutagenesis in the lid domain based on computer simulation.** Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, v.68, p.286-291, 2011.

GHANDI, N.N. **Applications of lipase.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v.74, p.621-634, 1997.

GHARAT, N., RATHOD, V.K. **Enzyme catalyzed transesterification of waste cooking oil with dimethyl carbonate.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.88, p.36-40, 2013.

GOMES, F.M., PAULA, A.V., SILVA, G.S., CASTRO, H.F. **Determinação das propriedades catalíticas em meio orgânico e aquoso da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol.** Química Nova, v.29, p.710-718, 2006.

GUAN, G., KUSAKABE, K., YAMASAKI, S. **Tri-potassium phosphate as a solid catalyst for biodiesel production from waste cooking oil.** Fuel Processing Technology, v.90, p.520-524, 2009.

GUISAN, J.M. **Immobilization of enzymes as the 21<sup>st</sup> century begins.** In: GUIBAN, J.M. Immobilization of enzymes and cells, 2<sup>nd</sup> edition, Humana Press Inc., New Jersey, USA, 2006, Cap. 2.

HAAS, M.J., FOGLIA, T.A. **Matérias-primas alternativas e tecnologias para a produção de biodiesel.** In: KNOTHE, G., GERPEN, J. V., KRAHL, J., RAMOS, L. P. Manual do Biodiesel. 1<sup>a</sup> edição. Blucher, São Paulo, Brasil, 2006.

HALIM, S.F.A., KAMARUDDIM, A.H., FERNANDO, W.J.N. **Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies.** Bioresource Technology, v.100, p.710-716, 2009.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E., OTERO, C. **Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM.** *Bioresource Technology*, v.99, p.277-286, 2008.

HOLCAPEK, M., JANDERA, P., FISCHER, J., PROKES, B. **Analytical monitoring of the production of biodiesel by highperformance liquid chromatography with various detection methods.** *Journal of Chromatography A*, v.858, p.13-31, 1999.

HSU, A.F., JONES, K., FOGLIA, T.A., MARMER, W.N. **Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel.** *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.36, p.181-186, 2002.

INNOCENTINI, M.D.M. **Biodiesel: energia renovável.** 2007. Disponível em <<http://www.labcat.org/ladebio/semanal/palestra/SemanaBiodiesel-1-Murilo.pdf>>. Consultado em 07 de agosto de 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4ª edição, 1ª edição digital. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil, 2008, pg. 576-581.

ISO, M., CHEN, B.X., EGUCHI, M., KUDO, T., SHRESTHA, S. **Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase.** *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, v.16, p.53-58, 2001.

JAEGER, K.E., REETZ, M.T. **Microbial lipases form versatile tools for biotechnology.** *Trends in Biotechnology*, v.16, p.396-403, 1998.

JAEGER, K.E., DIJKSTRA, B.W., REETZ, M.T. **Bacterial biocatalysts: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases.** *Annual Review of Microbiology*, v.53, p.315-351, 1999.

KAWAKAMI, K., ODA, Y., TAKAHASHI, R. **Application of a *Burkholderia cepacia* lipase-immobilized silica monolith to batch and continuous biodiesel production with a stoichiometric mixture of methanol and crude *Jatropha* oil.** *Biotechnology for Biofuels*, v.4, n.42, p.1-11, 2011.

KAZLAUSKAS, R.J., BORNSCHEUER, U.T. **Biotransformations with lipases**. In: REHM, H.J., PIHLER, G., STADLER, A., KELLY, P.J.W. *Biotechnology*, vol.8, VCH, New York, USA, 1998.

KEELING-TUCKER, T., RAKIC, M., SPONG, C., BRENNAN, J. D. **Controlling the material properties and biological activity of lipase within sol-gel derived bioglasses via organosilane and polymer doping**. *Chemistry of Materials*, v.12, p.3695-3704, 2000.

KHALIL, C. N. **As tecnologias de produção de biodiesel**. In: *O Futuro da Indústria: Biodiesel. Série Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior*, nº 14. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior-MDIC/Instituto Euvaldo Lodi-IEL/Núcleo Central, 2006.

KNOTHE, G. **Dependence of biodiesel fuel properties on the structures of fatty acid alkyl esters**. *Fuel Processing Technology*, v.86, p.1059-1070, 2005.

KNOTHE, G. **A história dos combustíveis derivados de óleos vegetais**. In: KNOTHE, G., GERPEN, J. V., KRAHL, J., RAMOS, L. P. *Manual do Biodiesel*. 1ª ed. São Paulo: Blucher, 2006.

KOSE, O., TUTER, M., AKSOY, H.A. **Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium**. *Bioresource Technology*, v. 83, p.125-129, 2002.

KUMARI, A., MAHAPATRA, P., GARLAPATI, V.K., BARNEJEE, R. **Enzymatic transesterification of *Jatropha* oil**. *Biotechnology for Biofuels*, v.2, p.1-7, 2009.

LAM, M.H., LEE, K.T., MOHAMED, A.R. **Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of a high free fatty acid oils (waste cooking oil) to biodiesel: a review**. *Biotechnology Advances*, v. 28, p.500-518, 2010.

LEUNG, D.Y.C., WU, X., LEUNG, M.K.H. **A review on biodiesel production using catalyzed transesterification**. *Applied Energy*, v.87, p.1083-1095, 2010.

LIMA, P.C.R. **O biodiesel e a inclusão social**. Consultoria Legislativa, Câmara dos Deputados, Brasília, 2004. Disponível em: [http://bd.camara.gov.br/bd/bitstream/handle/bdcamara/1142/biodiesel\\_inclusao\\_lima.pdf?sequence=1](http://bd.camara.gov.br/bd/bitstream/handle/bdcamara/1142/biodiesel_inclusao_lima.pdf?sequence=1). Consultado em 12 de novembro de 2011.

LÔBO, I.P., FERREIRA, S.L.C., CRUZ, R.S. **Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos**. Química Nova, v.32, p.1596-1608, 2009.

MA, F. HANNA, M. **Biodiesel production: a review**. Bioresource Technology, n.70, p.1-15, 1999.

MACARIO, A., MOLINER, M., CORMA, A., GIORDANO, G. **Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system**. Microporous and Mesoporous Materials, v.118, p.334-340, 2009.

MACEDO, J.M.; USSUI, V.; LIMA, N.B.; MIRANDA, L.F.; FALDINI, S.B.; KIYOHARA, P.K.; MUNHOZ Jr., A.H. **Estudo da síntese de alumina pelo processo sol-gel utilizando um planejamento experimental fatorial 2<sup>n</sup>**. 17<sup>o</sup> CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. Foz do Iguaçu, 2006. Disponível em <http://www.ipen.br/biblioteca/2006/cbecimat/12552.pdf>. Consultado em 03 de abril de 2011.

MACRAE, A.R., HAMMOND, R.C. **Present and future applications of lipases**. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, v.3, p.193-217, 1985.

MANSUR, H.S., ORÉFICE, R.L., VASCONCELOS, W.L., SILVA, R.F., LOBATO, Z.P. **Biomateriais para fixação de proteínas: Desenvolvimento de um processo de fabricação de vidros porosos via sol-gel para fixação de proteínas**. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, n.9, p.16-18, 1999.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Consultado em 12 de maio de 2013.

MARTY, A., DOSSAT, V., CONDORET, J.S. **Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: influence of the production of hydrophilic compounds.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 56, 232-237, 1997.

MAURY, S., BUISSON, P., PERRARD, A., PIERRE, A.C. **Influence of the sol-gel chemistry on the activity of a lipase encapsulated in a silica aerogel.** *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.29, p.133-148, 2004.

MAURY, S., BUISSON, P., PERRARD, A., PIERRE, A.C. **Compared esterification kinetics of the lipase from *Burkholderia cepacia* either free or encapsulated in a silica aerogel.** *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, v.32, p.193-203, 2005.

NARWAL, S.K., GUPTA, R. **Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase.** *Biotechnology Letters*, v.35, p.479-490, 2013.

NELSON, L.A., FOGLIA, T.A., MARMER, W.N. **Lipase-catalyzed production of biodiesel.** *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.73, p.1191-1195, 1996.

NELSON, D.L., COX, M.M. Lehninger. **Principles of biochemistry.** 3<sup>rd</sup> edition. Worth Publishers, New York, USA, 2000, Cap. 3.

NELSON, D.L., COX, M.M. Lehninger. **Princípios de Bioquímica.** 4<sup>a</sup>edição. Sarvier, São Paulo, Brasil, 2006, Cap. 4.

NICOLA, G., PACETTI, M., POLONARA, F., SANTORI, G., STRYJEK, R. **Development and optimization of a method for analyzing biodiesel mixtures with non-aqueous reversed phase liquid chromatography.** *Journal of Chromatography A*. v.1190, p. 120-126, 2008.

NIE, K., XIE, F., WANG, F., TAN, T. **Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production.** *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, v.43, p.142-147, 2006.

NOBLE, M.E.M., CLEASBY, A., JOHNSON, L.N., EGMONDB, M.R., FRENKENB, L.G.J. **The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas ghae* reveals a partially redundant catalytic aspartate.** Federation of Biochemical Society, v.331, p.123-128, 1993.

NOUREDDINI, H., GAO, X., PHILKANA, R. S. **Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil.** Bioresource Technology, v.96, p.769-777, 2005.

OLIVEIRA, F.C.C., SUAREZ, P.A.Z., SANTOS, W.L.P. **Biodiesel: possibilidades e desafios.** Química e Sociedade, n.28, p.3-8, 2008.

PAN, S., LIU, X., XIE, Y., YI, Y., LI, C., YAN, Y., LIU, Y. **Esterification activity and conformation studies of *Burkholderia cepacia* lipase in conventional organic solvents, ionic liquids and their co-solvent mixture media.** Bioresource Technology, v.101, p.9822-9824, 2010.

PAQUES, F.W., MACEDO, G.A. **Lipases de latex vegetais: propriedades e aplicações industriais.** Química Nova, v.29, p.93-99, 2006.

PAROUL, N., GRZEGOZESKI, L.P., CHIARADIA, V., TREICHEL, H., CANSIAN, R.L., OLIVEIRA, J.V., OLIVEIRA, D. **Solvent-free geranyl oleate production by enzymatic esterification.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v.34, p.323-329, 2011.

PAULA, A.V., MOREIRA, A.B.R., BRAGA, L.P., CASTRO, H.F., BRUNO, L.M. **Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias.** Química Nova, v.31, p.35-40, 2008.

PAULILLO, L.F., VIAN, C.E.F., SHIKIDA, P.F.A., MELLO, F.T. **Álcool combustível e biodiesel no Brasil: quo vadis?** Revista de Economia e Sociologia Rural, v.45, n.3, p.531-565, 2007.



PEÑA, R., ROMERO, R., MARTÍNEZ, S.L., RAMOS, M.J., MARTÍNEZ, A., NATIVIDAD, R. **Transesterification of castor oil: effect of catalyst and co-solvent.** Industrial and Engineering Chemistry Research, v. 48, p. 1186-1189, 2009.

PIERRE, A., BUISSON, P. **Influence of the porous texture of silica gels on the enzymatic activity of lipases in esterification reactions.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.11, p.639-647, 2001.

RAMOS, L.P., DOMINGOS, A.K., KUCEK, K.T., WILHELM, H.M. **Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil.** Biotecnologia, Ciência Desenvolvimento, v.31, p.28-37, 2003.

RANGANATHAN, S.V., NARASIMHAN, S.L., MUTHUKUMAR, K. **An overview of enzymatic production of biodiesel.** Bioresource Technology, v. 99, p.3975-3981, 2008.

REETZ, M.T., ZONTA, A., SIMPELKAMP, J. **Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials.** Biotechnology and Bioengineering, v.49, p.527-534, 1996.

ROBLES-MEDINA, A., GONZÁLEZ-MORENO, P.A., ESTEBAN-CERDÁN, L., MOLINA-GRIMA, L. **Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production.** Biotechnology Advances, v.27, p.398-408, 2009.

RODRIGUES, D.S., CAVALCANTE, G.P., FERREIRA, A.L.O., GONÇALVES, L.R.B. **Effect of additives on the hydrolytic and synthetic activity of immobilized *Candida antarctica* lipase.** 2<sup>nd</sup> Mercosur Congress on Chemical Engineering, 4<sup>th</sup> Mercosur Congress on Process Systems Engineering, 2005. Disponível em: <http://www.enpromer2005.eq.ufrj.br/ing/en/index.php>. Consultado em 17 de fevereiro de 2013.

RODRIGUES, R.C., VOLPATO, G., WADA, K., AYUB, M.A.Z. **Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reaction of vegetable oils and short chain alcohols.** Journal of the American Oil Chemist's Society, v.85, p.825-830, 2008a.

RODRIGUES, R.C., VOLPATO, G., AYUB, M.A.Z., WADA, K. **Lipase-catalyzed ethanolysis of soybean oil in a solvent-free system using central composite design and response surface methodology.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.83, p.849-854, 2008b.

RODRIGUES, R.C. **Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Tese de Doutorado, 2009.

ROYON, D., DAZ, M., ELLENRIEDER, G., LOCATELLI, S. **Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent.** Bioresource Technology, v.98, p.648-653, 2007.

SALIS, A., PINNA, M., MONDUZZI, M., SOLINAS, V. **Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis.** Journal of Biotechnology, v.119, p.291-299, 2005.

SALUM, T.F.C., VILLENEUVE, P., BAREA, B., YAMAMOTO, C.I., CÔCCO, L.C., MITCHELL, D.A., KRIEGER, N. **Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11.** Process Biochemistry, v.45, p.1348-1354, 2010.

SCHRAG, J.D., LI, Y., CYGLER, M., LANG, D., BURGDORF, T., HECHT, H-J., SCHMID, R., SCHOMBURG, D., RYDEL, T.J., OLIVER, J.D., STRICKLAND, L.C., DUNAWAY, C.L., LARSON, S.B., DAY, J., MCPHERSON, A. **The open conformation of a *Pseudomonas* lipase.** Structure, v.5, p.187-202, 1997.

SCHWAB, A.W., BAGBY, M.O., FREEDMAN, B. **Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oil.** Fuel, v.66, p.1372-1378, 1987.

SÉVERAC, E., GALY, O., TURON, F., PANTEL, C.A., CONDORET, J.S., MONSAN, P., MARTY, A. **Selection of CALB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: analysis of the economical impact.** Enzyme and Microbial Technology, v.48, p.61-70, 2011.

SHAH, S., SHARMA, S., GUPTA, M.N. **Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil.** Energy and Fuels, v.18, p.154-159, 2004

SHAH, S., GUPTA, M.N. **Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system.** Process Biochemistry, v.42, p.409-414, 2007.

SHIMADA, Y., WATANABE, Y., SAMUKAWA, T., SUGIHARA, A., NODA, H., FUKUDA, H., TOMINAGA, Y. **Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase.** Journal of the American Chemists' Society, v.76, p.789-793, 1999.

SIMÕES, A.S., MORI, R.Y., FARIA, R., CASTRO, H.F., MENDES, A.A. **Desempenho da matriz híbrida SiO<sub>2</sub>-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*.** Química Nova, v.34, p.33-38, 2011.

SOARES, C.M.F., CASTRO, H.F., MORAES, F.F., ZANIN, G.M. **Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v.77, p.745, 1999.

SOARES, C.M.F., SANTANA, M.H., ZANIN, G.M., CASTRO, H.F. **Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico.** Química Nova, v.26, p.832-838, 2003.

SOARES, C.M.F., SANTOS, O.A., OLIVO, J.E., CASTRO, H.F., 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, v.29, p.69-79, 2004.

SOARES, C.M.F., DE CASTRO, H.F., ITAKO, J.E., MORAES, F.F., ZANIN, G.M. **Characterization of sol-gel bioencapsulates for ester hydrolysis and synthesis.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 121-124, p. 845-859, 2005.

SOARES, C.M.F., SANTOS, O.A., CASTRO, H.F., MORAES, F.F., ZANIN, G.M. **Characterization of sol–gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor.** Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, v.39, p.69-76, 2006.

SOUZA, R.L., RESENDE, W.C., BARÃO, C.E., ZANIN, G.M., DE CASTRO, H.F., SANTOS, O.A.A., FRICKS, A.T., FIGUEIREDO, R.T., LIMA, A.S., SOARES, C.M.F. **Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol–gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.84, p.152-159, 2012.

SUAREZ, P.A.Z, MENEGHETTI, S.M.P., MENEGHETTI, M.R., WOLF, C.R. **Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica.** Química Nova, v.30, p.667-676, 2007.

TOMIN, A., WEISER, D., HELLNER, G., BATA, Z., CORICI, L., PÉTER, F., KOCZKA, B., POPPE, L. **Fine-tuning the second generation sol–gel lipase immobilization with ternary alkoxysilane precursor systems.** Process Biochemistry, v.46, p.52-58, 2011.

TURKAN, A., KALAY, S. **Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Elucidation of the mechanisms of lipases.** Journal of Chromatography A. v.1127. p.34 -44. 2006.

UYANIK, A., SEN, N., YILMAZ, M. **Improvement of catalytic activity of lipase from *Candida rugosa* via sol–gel encapsulation in the presence of calix(aza)crown.** Bioresource Technology, v. 102, p.4313-4318, 2011.

VICENTE, G., MARTÍNEZ, M., ARACIL, J. **Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems.** Bioresource Technology, v.92, p.297-305, 2004.

VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J.M., GRAILLE, J., HAAS, M.J. **Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches.** Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, v.9, p.113-148, 2000.

VULFSON, E.N. **Enzymatic synthesis of food ingredients in low-water media.** Trends in Food Science and Technology, v.4, p.209-215, 1993.

WATANABE, Y., SHIMADA, Y., SUGIHARA, A., TOMINAGA, Y. **Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor.** Journal of the American Chemists' Society, v.78, p.703-707, 2001.

WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology.** West Sussex: Ellis Horwood Limited, England, 1985, Cap. 1.

WU, W.H., FOGLIA, T.A., MARMER, W.N., PHILLIPS, J.G. **Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v.76, p.517-521, 1999.

XU, Y., DU, W., ZENG, J., LIU, D. **Conversion of soyabean oil to biodiesel fuel using lipozyme TL IM in a solvent free medium.** Biocatalysis and Biotransformation, v.22, p.45-48, 2004.

YADAV, G.D., DEVI, K.M. **Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling.** Chemical Engineering Science, v.59, p.373-383, 2004.

YANG, J., GUO, D., YAN, Y. **Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63.** Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, v.45, p.91-96, 2007.

YANG, G., WU, J., XU, G., YANG, L. **Improvement of catalytic properties of lipase from *Arthrobacter* sp. by encapsulation in hydrophobic sol-gel materials.** Bioresource Technology, v.100, p.4311-4316, 2009.

ZANIN, G.M., MORAES, F.F. **Enzimas Imobilizadas.** In: SAID, S., PIETRO, R.C.L. Enzimas como agentes Biotecnológicos. Legis Summa. Ribeirão Preto, Brasil, 2004, Cap. 2.

ZARCULA, C., CORICI, L., CROITORU, R., URSOIU, A., PETER, F. **Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during the immobilization of lipase by the sol-gel method.** Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, v.65, p.79-86, 2010.

ZHOU, W., KONAR, S.K., BOOCOCK, D.G.B. **Ethyl esters from the single-phase base-catalyzed ethanolysis of vegetable oils.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v.80, p.367-371, 2003.

ZONIN, V.J., WINCK, C.A., SCARTON, L.M., SILVA, T.N. **Utilização da canola como alternativa na cadeia de suprimentos do biodiesel: estudo de caso em duas empresas do RS.** 2010. 48º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Campo Grande. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/15/1134.pdf>>. Consultado em 07 de maio de 2013.

## ANEXO I

## TRABALHOS APRESENTADOS EVENTOS

C. E. BARÃO, L. D. PARIS, W. A. ANDRETTO, C. M. F. SOARES, H. F. de CASTRO, G. M. ZANIN, F. F. MORAES. **Medidas de atividades hidrolítica da enzima lipase imobilizada com TEOS.** V Workshop de Biocatálise e Biotransformação. Maringá, Brasil, 20 a 23 de julho de 2010.

C. E. BARÃO, L. D. PARIS, M. H. MIZOGUCHI, C. M. F. SOARES, H. F. de CASTRO, G. M. ZANIN, F. F. MORAES. **Medidas de atividades hidrolítica da enzima lipase imobilizada com TMOS.** V Workshop de Biocatálise e Biotransformação. Maringá, Brasil, 20 a 23 de julho de 2010.

C. E. BARÃO, L. D. PARIS, C. M. F. SOARES, H. F. CASTRO, F. F. MORAES, G. M. ZANIN. **Utilização de biocatalisadores sol-gel em reações de transesterificação.** 4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel. Belo Horizonte, Brasil, 05 a 08 de outubro de 2010.

L. D. PARIS, C. E. BARÃO, C. M. F. SOARES, H. F. CASTRO, F. F. MORAES, G. M. ZANIN. **Utilização de lípase imobilizada em matriz sol-gel em reação de transesterificação.** 4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel. Belo Horizonte, Brasil, 05 a 08 de outubro de 2010.

C. P. ZANUTTO, O. C. BAVIA FILHO, C. E. BARÃO, L. D. PARIS, A. M. S. VIEIRA, G. M. ZANIN, F. F. MORAES. **Produção de biodiesel a partir do óleo de semente de moringa.** 4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel. Belo Horizonte, Brasil, 05 a 08 de outubro de 2010.

O. C. BAVIA FILHO, C. P. ZANUTTO, C. E. BARÃO, L. D. PARIS, A. M. S. VIEIRA, G. M. ZANIN, F. F. MORAES. **Extração e caracterização do óleo de moringa.** 4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel. Belo Horizonte, Brasil, 05 a 08 de outubro de 2010.

L. D. PARIS, C. E. BARÃO, C. M. F. SOARES, H. F. CASTRO, F. F. MORAES, G. M. ZANIN. **Imobilização de lipase em matriz sol-gel para aplicação em reação de transesterificação.** I Simbiomercosul. Foz do Iguaçu, Brasil, 26 a 28 de outubro de 2010.

C. E. BARÃO, L. D. PARIS, C. M. F. SOARES, H. F. CASTRO, F. F. MORAES, G. M. ZANIN. **Estudo da reação de transesterificação utilizando biocatalisadores sol-gel.** I Simbiomercosul. Foz do Iguaçu, Brasil, 26 a 28 de outubro de 2010.

C. P. ZANUTTO, O. C. BAVIA FILHO, C. E. BARÃO, L. D. PARIS, J. V. VISENTAINER, A. M. S. VIEIRA, G. M. ZANIN, F. F. MORAES. **Obtenção de biodiesel a partir do óleo de *Moringa oleifera*.** I Simbiomercosul. Foz do Iguaçu, Brasil, 26 a 28 de outubro de 2010.

O. C. BAVIA FILHO, C. P. ZANUTTO, C. E. BARÃO, L. D. PARIS, J. V. VISENTAINER, A. M. S. VIEIRA, G. M. ZANIN, F. F. MORAES. **Extração e caracterização do óleo de semente de *Moringa oleifera*.** I Simbiomercosul. Foz do Iguaçu, Brasil, 26 a 28 de outubro de 2010.

C.E. BARÃO, L. D. PARIS, O. C. BAVIA FILHO, C. P. ZANUTTO, G. M. ZANIN, F. F. MORAES. **Transesterification of vegetable oils with *Thermomyces lanuginosus* lipase in presence of ethanol.** 33<sup>rd</sup> Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Seattle, EUA, 2 a 5 de maio de 2011.

C.E. BARÃO, L. D. PARIS, J.H. DANTAS, C. P. ZANUTTO, O. C. BAVIA FILHO, G. M. ZANIN, F. F. MORAES. **Caracterização da enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* e produção de biodiesel empregando diferentes óleos vegetais e etanol.** 16<sup>o</sup> CBCat. Campos do Jordão, Brasil, 2 a 6 de outubro de 2011.

C.E. BARÃO, L. D. PARIS, J.H. DANTAS, G. M. ZANIN, F. F. MORAES. **Transesterificação enzimática do azeite de oliva em presença de etanol.** XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Caxias do Sul, Brasil, 24 a 27 de julho de 2011.



J.H. DANTAS, L. D. PARIS, C.E. BARÃO, P.A. ARROYO, F. F. MORAES, G. M. ZANIN. **Production of ethyl esters via enzymatic catalysis with different canola oil/alcohol molar ratios.** Biotrans 2011, Sicília, Itália, 2 a 6 de outubro de 2011.

L. D. PARIS, J.H. DANTAS, C.E. BARÃO, P.A. ARROYO, C.M.F. SOARES, F. F. MORAES, G. M. ZANIN. **Production of ethyl esters by transesterification of canola oil with *Burkholderia cepacia* lipase: influence of alcohol to oil ratio, temperature and amount of enzyme.** 20<sup>th</sup> International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA. Praga, República Tcheca 25 a 29 de agosto de 2012.

C.E. BARÃO, L. D. PARIS, J.H. DANTAS, H.F. de CASTRO, P.A. ARROYO, F. F. MORAES, G. M. ZANIN. **Influence of temperature and moisture content on immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase action in transesterification reactions.** 20<sup>th</sup> International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA. Praga, República Tcheca 25 a 29 de agosto de 2012.

L.D. PARIS, J.H.DANTAS, C.E. BARÃO, F.F. de MORAES, G.M. ZANIN. **Produção de ésteres pela transesterificação enzimática dos óleos de canola e pinhão manso na presença de etanol.** V Encuentro Regional de Biotatálisis y Biotransformaciones, La Plata, Argentina, 5 a 8 de novembro de 2012.

L.D. PARIS, J.H.DANTAS, C.E. BARÃO, N. LOPES, P.A. ARROYO, F.F. de MORAES, G.M. ZANIN. **Produção de ésteres etílicos utilizando lípase de *Burkholderia cepacia*.** XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Búzios, Rio de Janeiro, 9 a 12 de setembro de 2012.

L.D. PARIS, J.H. DANTAS, C.E. BARÃO, C.M.F. SOARES, H.F. CASTRO, P. A. ARROYO, F.F. MORAES, G.M. ZANIN. **Assessment of the effect of temperature, oil:alcohol molar ratio and enzyme dosage in the transesterification of canola, *Jatropha curcas* L. and radish (*Raphanus sativus*) oils for the production of ethyl esters.** 34<sup>th</sup> Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. New Orleans, USA, 30 de abril a 3 de maio de 2012.

N. LOPES, J.H. DANTAS, L. D. PARIS, C.E. BARÃO, P.A. ARROYO, F. F. MORAES, G. M. ZANIN. **Estudo da atividade de consumo de triacilglicerídeos com lipase de *Burkholderia cepacia* do óleo de nabo forrageiro.** X Encontro Regional de Catálise. Araraquara, Brasil, 18 e 19 de maio de 2012.

J.H. DANTAS, L. D. PARIS, C.E. BARÃO, P.A. ARROYO, F. F. MORAES, G. M. ZANIN. **Influência da temperatura, razão molar e quantidade de enzima na atividade de produção de ésteres etílicos catalisada pela lipase de *Thermomyces lanuginosus*.** X Encontro Regional de Catálise. Araraquara, Brasil, 18 e 19 de maio de 2012.

J.H. DANTAS, L. D. PARIS, C.E. BARÃO, C.M.F. SOARES, P.A. ARROYO, F. F. MORAES, G. M. ZANIN. **Biotransformação de óleo de canola utilizando lipase de *Thermomyces lanuginosus* e *Burkholderia cepacia*.** V Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, La Plata, Argentina, 5 a 8 de novembro de 2012.

J.H. DANTAS, L. D. PARIS, C.E. BARÃO, P.A. ARROYO, F. F. MORAES, G. M. ZANIN. **Production of ethyl esters from radish (*Raphanus sativus*) oil using lipase from *Burkholderia cepacia*: evaluation of temperature, oil:alcohol molar ratio and amount of enzyme in relation to the reaction time.** 35<sup>th</sup> Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Portland, USA, 29 de abril a 2 de maio de 2013.

L.D. PARIS, J.H. DANTAS, C.E. BARÃO, L. CARDOZO FILHO, F.F. MORAES, G.M. ZANIN. **Transesterificação etílica do óleo de pinhão manso em reator de leito fixo empregando lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em matriz sol-gel.** XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos. X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. Foz do Iguaçu, Brasil, 30 de julho a 2 de agosto de 2013.

C.E. BARÃO, D.F. MARCHI, L.D. DE PARIS, J. H. DANTAS, C.M F. SOARES, G.M. ZANIN, F. F. DE MORAES. **Determinação da atividade de transesterificação da lipase de *Bacillus* ITP-001 livre e imobilizada.** XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos. X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. Foz do Iguaçu, Brasil, 30 de julho a 2 de agosto de 2013.

J.H. DANTAS, L. D. PARIS, P.A. ARROYO, F.F. MORAES, G.M. ZANIN.  
**Planejamento fatorial como ferramenta para estudo da reação de produção de ésteres etílicos por lipase.** XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos. X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. Foz do Iguaçu, Brasil, 30 de julho a 2 de agosto de 2013.