

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

**IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES PARA  
REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO**

CARLOS EDUARDO BARÃO

M. Sc., UEM, 2008

Orientadores: Prof. Flávio Faria de Moraes, PhD

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

Tese de doutorado submetida à  
Universidade Estadual de Maringá,  
como parte dos requisitos necessários  
à obtenção do Grau de Doutor em  
Engenharia Química, área de  
Desenvolvimento de Processos.

Maringá – PR – Brasil

2012

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

Esta é a versão final da tese de doutorado apresentada por Carlos Eduardo Barão perante a Comissão Julgadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em 27 de novembro de 2012.

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes  
Orientador / Presidente



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



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nadia Krieger  
Membro



Dr<sup>a</sup> Luiza Pedrina Vilxenski Calsavara  
Membro



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Camila da Silva  
Membro



Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo  
Membro

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por tudo que tem me proporcionado de maneira muito mais que especial

Agradecer a minha mãe, por tudo que alcancei, por quem eu sou e por estar sempre ao meu lado me apoiando.

A minha família, Vó Benta, Tia Tata, Tia Célia, Tio Elizeu, meus primos Junior, Josi, Juli, Neide, Cristiano, Bruno e as crianças da casa, Maria Eduarda, Maria Clara, Neto, Maria Alice e meu afilhado Lucas. Vocês são parte essencial da minha vida e agradeço todos os dias por ter todos vocês ao meu lado sempre me apoiando. Aos meus tios Gilberto (*in memorian*) e Dalcírio (*in memorian*) os dois foram chamados mais cedo por Deus, mas sei que continuam cuidando de mim e me guiando para o bem.

Aos meus amigos irmãos André e Mauro que acompanharam toda essa trajetória do meu doutorado sempre do lado me ajudando. As amigas de longa data Fabiana e Fran que mesmo longe sempre estivemos perto compartilhando as vitórias desde o início da faculdade.

Aos meus amigos e alunos do Instituto Federal do Paraná/Paranavaí, em especial Denis, Suellen, Dayane, Vanessa, Ayslan, Thais, Junior, Priscila, Evandro, Douglas, Valeriê, Angela, Dailhane, Katia, Ricardo, Antônio, Amarildo, Éber, Dani, Fabiano, Tedy, Barbara, Daryne, Alencar, Renata e todos que formam a família IFPR/Paranavaí. Tenho aprendido muito com todos vocês e como já foi dito, acho que não poderíamos ter melhor grupo não só de trabalho mas de amigos.

Aos meus professores e orientadores Flávio e Gisella. A minha formação pessoal e profissional se deve muito aos seus conselhos.

Aos amigos Marcelo, Fabrício, Elizeu, Laís e Maricir, sem esquecer duas pessoas fundamentais que são o Leandro e o João que me auxiliaram para a conquista desse título, sempre contribuindo para o alcance dos meus objetivos.

Aos órgãos financiadores CAPES e CNPQ pelo suporte financeiro por meio do projeto Pró-Engenharia N°: 23038-028317/2008-44.

*"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."*

*Anatole France*

## RESUMO

Barão, Carlos Eduardo. **Imobilização e Caracterização de Lipases para Reações de Transesterificação**. Tese de Doutorado em Engenharia Química – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química – Universidade Estadual de Maringá. Maringá – PR. 27 de novembro de 2012.

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* e de *Bacillus sp.* ITP-001, livres e imobilizadas em matrizes sol-gel produzidas com os precursores tetraetoxissilano (TEOS) e tetrametoxissilano TMOS, na presença de diferentes aditivos, e secas com as técnicas xerogel – dessecador a vácuo – e aerogel – CO<sub>2</sub> supercrítico – foi utilizada em reações de transesterificação de óleo vegetal, para verificar a influência desses fatores sobre a reação. Inicialmente a lipase livre foi caracterizada quanto as suas atividades hidrolítica e de transesterificação, fornecendo os resultados de 504 U mg<sup>-1</sup> e 1233 U g<sup>-1</sup>, a 37 °C, respectivamente, e foi verificado que menores temperaturas fornecem maiores valores de atividades na faixa estudada. Na sequência, quando a enzima livre foi utilizada para a produção de ésteres etílicos por meio de um planejamento fatorial, comprovou-se que menores temperaturas (37 °C) e menores razões molares óleo:álcool (1:6) forneciam novamente os maiores rendimentos em ésteres, mas sendo somente a temperatura um fator de influência com 95 % de confiança. Em uma segunda etapa verificou-se a influência da umidade da enzima lípase imobilizada com TEOS, seca em aerogel com aditivo PEG e através de um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (variando condições de umidade e temperatura), e constatou-se que maiores umidades (30 %) e menores temperaturas (40 °C) forneciam os maiores valores de atividade de transesterificação e que tanto os fatores quanto a sua interação eram fatores de influencia, com 95 % de confiança. O biocatalisador nessas condições forneceu valores de área superficial de 502 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, volume de poros de 0,643 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> e diâmetro médio de poros de 51,2 Å. Na etapa seguinte foi verificada a influência do aditivo (líquido iônico) na imobilização com TEOS xerogel e aerogel das enzimas de *Thermomyces lanuginosus* e de *Bacillus sp* ITP 001. Nesse caso foram obtidos altos rendimentos de imobilização, de 232,4 % e 243,3 % para lipase ITP 001 e 83,9 % e 111,7 % para a lipase de *Thermomyces*, respectivamente nas secagens xerogel e aerogel. Os valores de atividades hidrolítica e de transesterificação a 37 °C foram superiores para a enzima ITP e comparando-se os dois tipos estudados de secagem, a forma aerogel forneceu maiores valores de atividade. A caracterização pela técnica BET demonstrou maior área

superficial, volume de poros e tamanho de poros nas preparações aerogel para ambas as enzimas, além de se verificar uma maior rugosidade superficial da partícula de biocatalisador para esse tipo de secagem. Finalizando os estudos foi verificada então a influência do precursor de sílica (TEOS e TMOS) sobre os biocatalisadores secos pelas técnicas xerogel e aerogel. Os resultados de atividade hidrolítica, esterificação e transesterificação a 37 °C demonstraram novamente a superioridade da preparação aerogel com altos valores nas atividades de transesterificação com precursor TEOS, enquanto para os outros dois tipos de atividade estudados foi observada a superioridade do precursor TMOS. Na caracterização por BET os maiores valores de área superficial e de volume de poros foram obtidos na preparação TEOS xerogel (resultados contraditórios aos obtidos anteriormente) e todas as preparações eram compostas de mesoporos. Os biocatalisadores obtidos foram ainda caracterizados por MEV (demonstrando a rugosidade e material retido nas superfícies dos produtos), por TGA e DSC, nas quais foi verificado o comportamento das preparações obtidas com o aumento da temperatura, observando-se estágios definidos de perdas de massa e fluxo de calor. Essas preparações ainda foram utilizadas na produção de ésteres etílicos nas condições de quantidade de massa de enzima de 7,5 % em relação à massa de óleo, temperatura de 37 °C e razão molar óleo:álcool de 1:9, para todas as preparações. Nessas condições, verificou-se um rendimento muito superior da preparação utilizando TMOS, principalmente na secagem xerogel, quando comparada ao precursor TEOS, em ambas as secagens. Os maiores rendimentos relativos observados (em comparação ao precursor TMOS e secagem xerogel) foram obtidos nos tempos de 48 h para precursor TEOS com secagem xerogel (44%), e TMOS aerogel (60 %), enquanto para o precursor TEOS com secagem aerogel observou-se o maior rendimento em 96 h (27%). Ao final, foi realizado um ciclo de reutilização com ambos os biocatalisadores obtidos pela secagem aerogel, usando tempo de reação de 48 h com as mesmas condições definidas inicialmente e verificou-se que após um ciclo, o precursor TMOS reteve 91,4 % da sua atividade inicial, enquanto o precursor TEOS manteve apenas 2,8 %, confirmando a elevada eficiência do precursor TMOS na produção de ésteres etílicos.

## ABSTRACT

Barão, Carlos Eduardo. **Immobilization and Characterization of the Lipase Enzyme for Transesterification Reactions**. Doctoral Thesis in Chemical Engineering – Graduate Program in Chemical Engineering – State University of Maringá. Maringá – PR. November 27, 2012.

The lipase from *Thermomyces lanuginosus* and *Bacillus sp.* ITP-001, free and immobilized in sol-gel matrices produced with TMOS and TEOS precursors in the presence of different additives and dried by the techniques of xerogel – vacuum desiccator – and aerogel – supercritical CO<sub>2</sub> – was used in the transesterification of vegetable oil to determine the influence of these factors on the reaction. Initially free lipase enzyme was characterized by its hydrolytic and transesterification activities, giving the results of 504.4 U mg<sup>-1</sup> and 1233.79 U g<sup>-1</sup> at 37 °C and it was found that lower temperatures give higher values of activities within the range studied. Further, when the free enzyme was used for the production of ethyl esters via a factorial design, it was found that lower temperatures (37 °C) and lower molar ratios of oil:ethanol (1:6) gave again the highest yields in esters, but temperature is the only factor of influence with 95 % confidence. In a second step the influence of moisture content was verified for the immobilized lipase with TEOS, dried as aerogel with PEG additive and through a factorial design 2<sup>2</sup> (varying moisture content and temperature), and it was found that higher moisture content (30 %) and lower temperatures (40 °C) provided the highest values of transesterification activity and that both factors, as their interaction, were influencing factors, with 95 % confidence. The biocatalyst at these conditions gave values of surface area of 502.4 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, pore volume of 0.643 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> and average pore diameter of 51.18 Å. In the next step it was verified the influence of additive (ionic liquid) on the immobilization with TEOS xerogel and aerogel with enzymes from *Thermomyces lanuginosus* and *Bacillus* ITP 001. In this case high yields of immobilization were obtained as 232.4 % and 243.3 % for the ITP 001 enzyme and 83.9 % and 111.7 % for the enzyme from *Thermomyces* dried as xerogel and aerogel, respectively. The values of hydrolytic and transesterification activities at 37 °C were superior for the ITP enzyme and comparing the two types of drying studied, the aerogel provided higher values of activity. The characterization by BET technique demonstrated a greater surface area, pore volume and pore size in aerogel preparations for both enzymes and also gave greater surface roughness for biocatalyst particles of this type of drying. Finally, it was verified

then the influence of the silica precursor (TMOS and TEOS) on the biocatalysts dried by the xerogel and aerogel techniques. The results of hydrolytic activity, esterification and transesterification at 37 °C again demonstrated the superiority of the aerogel preparations that gave high values for the transesterification activities with biocatalysts having TEOS as precursor, while for the other two types of activity studied it was observed superiority of the TMOS precursor. In characterizing by the BET technique the highest values for surface area and pore volume were obtained for xerogel prepared with TEOS (contradictory results to those obtained previously) and all preparations were composed of mesopores. The biocatalysts obtained were further characterized by SEM (demonstrating the roughness and material retained on surfaces of products) and by DSC and TGA, in which it was observed the behavior of the preparations with increasing temperature, observing defined stages of mass loss and heat flux. These preparations were also used in the production of ethyl esters under the conditions of mass amount of enzyme of 7.5 % relative to the mass of oil, at 37 °C and molar ratio oil:ethanol 1:9 for all preparations. Under these conditions, there was a much higher ester yield for the preparation using TMOS, particularly for that dried as xerogel compared to the precursor TEOS in both drying. The largest relative yields observed (as compared to the precursor TMOS and drying xerogel) were obtained in times of 48 h for drying xerogel with precursor TEOS (44%) and TMOS aerogel (60%), whereas for the TEOS precursor aerogel drying the highest yield was observed for 96 h (27 %). At the end, a cycle of reuse was performed with both biocatalysts obtained by aerogel and using reaction time of 48 h with the same conditions as initially defined and it was found that after one cycle, the precursor TMOS retained 91.4 % of its initial activity while the TEOS precursor remained with only 2.8%, confirming the high efficiency of the TMOS precursor in the production of ethyl esters.



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. OBJETIVOS DO TRABALHO</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. ESTRUTURA DA TESE</b> .....	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>4</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. ENZIMAS</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS PELO MÉTODO SOL-GEL</b> .....	<b>7</b>
2.3.1 Procedimentos de secagem .....	9
<b>2.4. LIPASES</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5. IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES</b> .....	<b>14</b>
<b>2.6. ÉSTERES ETÍLICOS E BIODIESEL</b> .....	<b>16</b>
<b>2.7. PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS VIA LIPASE LIVRE E</b> <b>IMOBILIZADA</b> .....	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>25</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1. MATERIAIS</b> .....	<b>25</b>
3.1.1. Reagentes e substratos .....	25
3.1.2. Equipamentos .....	25
<b>3.2. MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3.2.1. Seleção da enzima lipase e dos métodos de imobilização.....	27
3.2.1.1. <i>Procedimentos de Imobilização utilizando-se Tetraetoxissilano (TEOS) e</i> <i>Tetrametoxissilano (TMOS)</i> .....	28
3.2.2. Caracterização da enzima livre e imobilizada .....	29
3.2.2.1. <i>Determinação do teor de proteína</i> .....	29
3.2.2.2. <i>Determinação da atividade hidrolítica pelo método titulométrico com</i> <i>azeite de oliva</i> .....	30
3.2.2.3. <i>Determinação da atividade de transesterificação pela produção de 2-</i> <i>fenetil acetato</i> .....	30
3.2.2.4. <i>Caracterização física pelo calculo da área superficial, diâmetro e volume</i> <i>de poros</i> .....	31
3.2.2.5. <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i> .....	31
3.2.2.6. <i>Análise Termogravimétrica</i> .....	31
3.2.2.7. <i>Calorimetria Exploratória Diferencial</i> .....	31
3.2.2.8. <i>Cálculo do rendimento de imobilização</i> .....	32
3.2.3. Produção de ésteres etílicos a partir da enzima livre em meio livre de solventes .....	32
3.2.4. Produção de ésteres etílicos com enzima imobilizada.....	33
3.2.5. Quantificação dos ésteres etílicos por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE).....	34
3.2.5.1. <i>Cálculo do Rendimento em ésteres</i> .....	34

<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>35</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1. ETAPA 1 – ESTUDOS ENVOLVENDO A LIPASE LIVRE DE</b>	
<b><i>Thermomyces lanuginosus</i> .....</b>	<b>35</b>
4.1.1. Caracterização da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> livre.....	35
4.1.2. Produção e caracterização dos ésteres etílicos produzidos pela lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> livre .....	36
<b>4.2. PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM O DESEMPENHO DA LIPASE DE</b>	
<b><i>Thermomyces lanuginosus</i> IMOBILIZADA.....</b>	<b>41</b>
4.2.1. Influência da umidade da enzima imobilizada na reação de transesterificação	41
4.2.2. Caracterização textural da enzima imobilizada .....	45
<b>4.3. INFLUÊNCIA DO LÍQUIDO IÔNICO NA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE</b>	
<b>DE <i>Thermomyces lanuginosus</i> (COMERCIAL) E DE <i>Bacillus sp.</i> ITP 001 .....</b>	<b>45</b>
4.3.1. Determinação dos rendimentos de imobilização, atividade hidrolítica e de transesterificação dos preparados enzimáticos .....	46
4.3.2. Determinação da área superficial, volume e diâmetro de poros (BET).....	48
4.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	49
<b>4.4. IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Thermomyces lanuginosus</i> EM MATRIZES OBTIDAS DE DIFERENTES PRECURSORES DE SÍLICA E SECOS PELAS TÉCNICAS AEROGEL E XEROGEL .....</b>	<b>50</b>
4.4.1. Determinação das atividades de transesterificação, hidrolítica e de esterificação dos biocatalisadores .....	50
4.4.2. Determinação da área superficial, volume e diâmetro de poros (BET) .....	52
4.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	53
4.4.4. Análise Termogravimétrica (TGA) .....	55
4.4.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	57
4.4.6. Produção de ésteres etílicos .....	58
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO VI .....</b>	<b>63</b>
<b>RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>63</b>
<b>CAPÍTULO VII.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Principais métodos para imobilização de enzimas.....	6
Figura 2.2. Reação de Esterificação e Hidrólise.....	12
Figura 2.3. Reação de transesterificação .....	13
Figura 2.4. Reação de síntese do biodiesel.....	17
Figura 2.5. Distribuição de oleaginosas para produção de biodiesel no território .....	19
Figura 2.6. % do uso de matérias-primas até o 1º semestre de 2012 na produção de biodiesel no Brasil. ....	20
Figura 3.1. Planejamento de imobilização enzimática .....	28
Figura 4.1: Rendimento de éster do óleo de soja em função do tempo, para a reação de transesterificação com álcool etílico e lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> livre.....	36
Figura 4.2: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para o rendimento em ésteres etílicos do óleo de soja com a lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> livre. ....	38
Figura 4.3: Gráfico dos valores observados em função dos valores preditos pelo modelo de regressão para o rendimento em ésteres etílicos do óleo de soja com a enzima lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> livre. ....	39
Figura 4.4: Superfície de resposta para rendimento em ésteres etílicos do óleo de soja com a lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> livre, em função da razão molar e temperatura. ....	40
Figura 4.5: Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de transesterificação pela lipase <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada.....	43
Figura 4.6: Gráfico de normalidade dos valores observados em função dos valores preditos pelo modelo de regressão para a atividade de transesterificação da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada. ....	44
Figura 4.7: Superfície de resposta para a atividade de transesterificação em função da temperatura e umidade, obtida com a lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada, na reação entre o acetato de vinila e o álcool 2-fenetílico, conforme procedimento metodológico 3.2.2.4. ....	44
Figura 4.8. Micrografia dos suportes e das enzimas imobilizadas, obtidos com diferentes lipase pelas diferentes técnicas de secagem, de acordo com as Seção 3.2.2.6. ....	49
Figura 4.9. Micrografia dos suportes e das enzimas imobilizadas, obtidas com diferentes precursores e diferentes técnicas de secagem.....	54

Figura 4.10. Curvas de análise termogravimétricas dos suportes obtidos pelo precursor: (a) TEOS xerogel; (b) TEOS aerogel; (c) TMOS xerogel e (d) TMOS aerogel.....	56
Figura 4.11. Curvas de análise termogravimétricas das enzimas imobilizadas pelo precursor: (a) TEOS xerogel; (b) TEOS aerogel; (c) TMOS xerogel e (d) TMOS aerogel.	56
Figura 4.12. Curvas de DSC dos suportes obtidos pelo precursor: (a) TMOS xerogel; (b) TMOS aerogel; (c) TEOS xerogel e (d) TEOS aerogel.....	57
Figura 4.13. Curvas de DSC das enzimas imobilizadas obtidas pelo precursor: (a) TEOS xerogel; (b) TMOS aerogel; (c) TEOS aerogel e (d) TMOS xerogel.....	58
Figura 4.14. Rendimento relativo de éster obtido do óleo de soja em função do tempo de reação, utilizando a lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada como biocatalisador. .....	59

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 3.1 Planejamento experimental para produção de ésteres etílicos com enzima livre .....	32
Tabela 4.1 Medidas de atividade de transesterificação da enzima livre .....	36
Tabela 4.2 Análise de variância para o rendimento de ésteres etílicos do óleo de soja obtidos com a enzima lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> livre.....	37
Tabela 4.3 Valores de atividade de transesterificação obtidos no planejamento 2 <sup>2</sup>	41
Tabela 4.4 Análise de variância para a atividade de transesterificação da enzima lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em precursor de sílica TEOS, na reação entre o acetato de vinila e o álcool 2-fenetílico, conforme procedimento metodológico 3.2.2.4 .....	42
Tabela 4.5 Rendimentos de imobilização .....	46
Tabela 4.6 Medidas de Atividade Hidrolítica .....	47
Tabela 4.7 Medidas de Atividade de transesterificação a 37°C.....	47
Tabela 4.8 Análise B.E.T. dos biocatalisadores obtidos para as diferentes enzimas com diferentes métodos de secagem .....	48
Tabela 4.9 Valores de atividades da enzima lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada.....	51
Tabela 4.10 Análise B.E.T. dos biocatalisadores obtidos pelos precursores de sílica com diferentes métodos de secagem .....	52

## NOMENCLATURA

- ANP: Agência Nacional do Petróleo
- ASTM: American Society for Testing and Materials
- B. E. T.: Brunauer, Emmett e Teller (técnica)
- BMIM TFSI: 1-butil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imide
- CLAE: Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)
- CTMABr: Brometo de Cetiltrimetilamônio
- DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial
- LI: Líquido iônico
- LITA: Líquido iônico a temperatura ambiente
- MEV: Microscopia eletrônica de varredura
- OTES: octiltrióxissilano
- TEOS : Tetraetoxissilano
- TGA: Análise Termogravimétrica
- TL: lipase de *Thermomyces lanuginosus*
- TMOS: Tetrametoxissilano

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

#### 1.1. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas como biocatalisadores alcançou notável desenvolvimento devido ao elevado potencial de aplicação em reações de grande interesse científico, farmacológico e industrial. Sua crescente comercialização deriva da facilidade de obtenção das enzimas naturais ou apropriadamente modificadas por técnicas da moderna biotecnologia e às suas vantagens em relação aos catalisadores químicos convencionais, como maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação, para alguns processos. Além disso, a catálise enzimática tem outros benefícios, como o aumento da qualidade dos produtos, em relação à catálise química; a redução dos custos de laboratório e de maquinário, graças à melhoria do processo; ou a fabricação controlada de pequenas quantidades.

Entre as enzimas de maior utilização, as lipases possuem grande potencial para atuação nos mais diversos tipos de reações, principalmente envolvendo triglicerídeos, entre elas a hidrólise, esterificação, transesterificação, interesterificação e outras que auxiliam na obtenção dos mais diversos produtos de interesse comercial. Sua utilização no processo fornece um produto com um alto grau de pureza, uma menor produção de contaminante, uma maior seletividade com bons rendimentos. No entanto, ainda persiste uma desvantagem principal, não completamente solucionada, que se refere ao alto custo associado à sua utilização. Para procurar minimizar esse problema, faz-se uso de técnicas adequadas de imobilização enzimática, permitindo a reutilização da enzima, tornando-a aplicável em nível industrial.

As técnicas de imobilização de lipases têm sido temas dos mais variados estudos, sempre buscando melhores condições para utilizá-la nas reações de interesse, fornecendo produtos com alto rendimento, baixo custo, menor tempo de reação e possível reutilização no mesmo processo.

Óleos vegetais, ou seus triacilgliceróis, têm se tornado alvo de pesquisas utilizando-se lipases como biocatalisador, nas quais esforços têm sido realizados no desenvolvimento de derivados de óleos vegetais que se aproximem das propriedades e desempenho do diesel

derivado de hidrocarbonetos. Os obstáculos encontrados na substituição do diesel por triacilgliceróis são principalmente associados à sua baixa volatilidade, viscosidade, e caráter poliinsaturado dos ácidos graxos.

Levantado esses aspectos, tem-se as pesquisas concentradas na produção de biodiesel, que pode ser obtido a partir da reação de transesterificação de diferentes óleos vegetais (soja, palma, pinhão manso, canola, entre outros), de gordura animal, descartes (óleos usados em frituras) ou algas. Nesse tipo de reação, há a rota química (utilizando catalisadores como NaOH) ou a rota enzimática utilizando a enzima lipase, que é foco principal desse trabalho.

## 1.2. OBJETIVOS DO TRABALHO

Esse trabalho, portanto tem como **objetivo principal** a imobilização e caracterização de lipases para verificar sua viabilidade em reações de transesterificação através de medidas de atividade e sua posterior utilização na produção de ésteres etílicos (biodiesel) a partir da reação de transesterificação entre o óleo de soja e etanol.

Como **objetivos específicos**:

- Escolha da enzima lipase e das técnicas de imobilização enzimática adequadas;
- Caracterização da enzima livre e imobilizada quanto às suas atividades, características morfológicas e físico-químicas (BET, MEV, TGA e DSC);
- Produção de ésteres etílicos em condições pré-definidas de reação a partir da reação de transesterificação;

## 1.3. ESTRUTURA DA TESE

Este trabalho foi dividido em 7 capítulos, sendo que este primeiro proporciona uma visão geral do problema, os objetivos a serem atingidos, os métodos utilizados e a sua contribuição científica.

No segundo capítulo, introduz-se a revisão bibliográfica, onde são mostradas algumas informações a respeito da enzima lipase e aspectos de imobilização enzimática,



além de trabalhos realizados por diferentes autores que tratam da utilização da lipase livre e imobilizada, para a produção de ésteres etílicos e biodiesel.

O terceiro capítulo apresenta os principais materiais, equipamentos utilizados e as metodologias realizadas para a obtenção dos resultados propostos nos objetivos deste trabalho.

No quarto capítulo, trata-se da análise crítica e discussão dos resultados obtidos, fazendo-se análises e comparações com dados da literatura, para verificar a confiabilidade do estudo e verificar se os resultados estão sendo obtidos de maneira satisfatória ou não. Esse capítulo foi dividido em 4 subitens para abordar os estudos referentes à lipase livre, à influência da umidade na reação de transesterificação com lipase imobilizada em tetraetoxossilano (TEOS), e à imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* e de *Bacillus sp.* ITP – 001 imobilizada em TEOS e líquido iônico 1-butil-3-metilimidazólio bis(trifluorometilsulfonil)imide (BMIM TFSI), seca por diferentes técnicas e seguidas pela sua caracterização, finalizando com a imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em tetraetoxossilano (TEOS) e tetraetoxossilano TMOS e aditivo PEG e seca por diferentes técnicas, seguidas pela sua caracterização e produção de ésteres etílicos.

No quinto capítulo encontram-se as conclusões obtidas no trabalho, com os resultados dos procedimentos realizados.

No sexto capítulo apresentam-se as recomendações para trabalhos futuros.

Por fim sétimo capítulo encontram-se as principais referências que contribuíram para a concretização deste trabalho.

## **CAPÍTULO II**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **2.1. ENZIMAS**

Enzimas são uma classe proteínas que atuam como catalisadores biológicos participando nas reações metabólicas de todos os organismos vivos. Elas são chamadas de biocatalisadores, e aceleram uma reação bioquímica, reduzindo a energia de ativação, sem, no entanto modificar a constante de equilíbrio ou a energia livre da reação. Não são consumidas nas reações e sua ação catalítica é semelhante à dos catalisadores inorgânicos, distinguindo-se de um catalisador químico comum pela sua capacidade de catalisar uma reação sob condições brandas, como em soluções aquosas em pressão e temperaturas normais, com conseqüente diminuição do risco de desnaturação térmica dos compostos termolábeis, além da redução das necessidades energéticas e dos efeitos corrosivos (ZANIN, 1989).

Uma grande vantagem das enzimas sobre os catalisadores químicos é que elas possuem uma alta especificidade ao substrato, conduzindo a um maior rendimento na reação e uma baixa formação de subprodutos. No entanto, as reações enzimáticas têm uma alta sensibilidade às variações de temperatura e pH, e a separação catalisador/produto é difícil e dispendiosa (LIMA, 1996).

Alguns fatores externos que influenciam na velocidade de uma reação enzimática são:

- **Temperatura:** Quanto maior a temperatura, maior a velocidade da reação, até se atingir a temperatura ótima; a partir dela, a atividade volta a diminuir, por desnaturação da molécula. As temperaturas elevadas podem afetar o estado de dissociação dos grupos funcionais envolvidos nas reações enzimáticas, a afinidade da enzima por ativadores ou inibidores.
- **pH:** Idem à temperatura; existe um pH ótimo, na qual a distribuição de cargas elétricas da molécula da enzima e, em especial do sítio catalítico, é ideal para a catálise.

Outros fatores podem influir na capacidade funcional enzimática, como acontece com as substâncias denominadas inibidores, que podem agir diretamente sobre a própria enzima ou substrato, sobre o cofator ou a coenzima (EVANGELISTA, 2003)

A maioria das enzimas empregadas na indústria são enzimas extracelulares de origem microbiana. Estas enzimas são empregadas na forma solúvel sem recuperação no final do processo. O custo do tratamento enzimático por lote de substrato ainda é baixo e o emprego de enzimas imobilizadas recicláveis no processo ainda tem custo não justificável. O custo global de produção de enzimas intracelulares é maior que o de enzimas extracelulares e como consequência, as intracelulares geralmente são utilizadas imobilizadas para que se propicie a recuperação após o processo. Sabe-se ainda que o custo de produção de enzimas esteja associado não só ao tipo de excreção celular, mas também ao grau de pureza requerido no processo. Por necessidade, portanto, as tecnologias para produção de enzimas cada vez mais puras evoluíram em diversas direções (PASTORE, 2001).

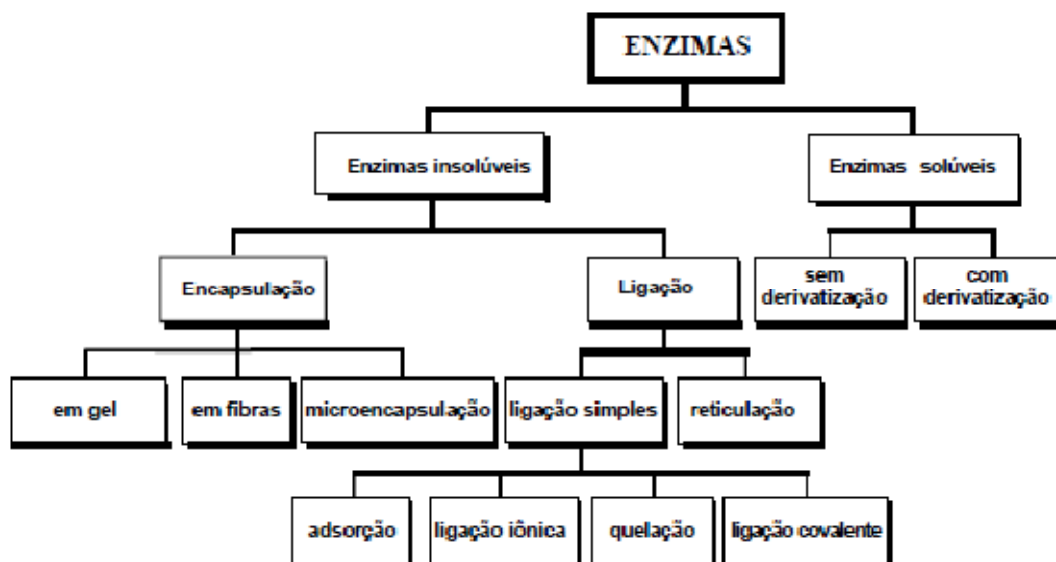
## **2.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS**

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 geralmente é uma enzima ou uma mistura de enzimas ou enzimas contidas no interior de uma célula e está retido no interior (poros) ou na superfície de um material utilizado como suporte. O complexo enzima-suporte mantém as características físicas do suporte e ao mesmo tempo, 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 (ZANIN e MORAES, 2004).

Do ponto de vista comercial, as principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas, em relação às enzimas solúveis são, praticamente, aquelas relativas à catálise heterogênea: (i) aproveita a atividade catalítica por um maior período de tempo, uma vez que a enzima não deve ser desnaturada ao final do processo em batelada; (ii) pode operar de forma contínua possibilitando um maior controle das variáveis do processo, pois o biocatalisador é retido no interior do biorreator, e o substrato passa pelo leito catalítico em escoamento contínuo, ou transfere-se o biocatalisador para novas bateladas contendo

solução de substrato novo (processo em batelada repetidas); (iii) facilita a separação do catalisador e do produto da reação, a enzima imobilizada, por estar na forma insolúvel ao meio reacional, é retida no interior do biorreator, e o substrato que não reagiu e o produto são retirados sem contaminação com o biocatalisador; (iv) reduz o volume de reação pois a enzima estando imobilizada e retida no biorreator, permite uma alta concentração enzimática em menor volume de reator, isto é, uma alta atividade por unidade de volume, muito superior à que se seria obtida com a enzima livre. Isto conduz a uma alta produtividade volumétrica (kg) por volume de reator (m<sup>3</sup>) e por hora. Ainda, pelo fato do substrato e produto serem expostos a condições de reação mais brandas e por um menor tempo de reação, previne-se a ocorrência de reações indesejáveis e a contaminação do meio reacional; (v) altera, em alguns casos, as propriedades catalíticas da enzima em relação à sua forma solúvel, como por exemplo: confere maior estabilidade ao pH e à temperatura, reduz os efeitos de inibição pelo substrato e produto, pois estes são removidos continuamente do biorreator; e, (vi) facilita a interrupção da reação, quando se atinge um determinado grau de conversão, pela remoção do biocatalisador se a operação está sendo realizada em batelada, ou pelo ajuste do tempo de residência se é utilizado um reator contínuo (ROSEVEAR *et al.*, 1987; ZANIN e MORAES, 2004).

As técnicas usualmente empregadas para imobilizar enzimas em suportes sólidos são baseadas em mecanismos físicos e químicos (Figura 2.1). Os principais processos de imobilização podem ser promovidos pela encapsulação ou ligação.



**Figura 2.1.** Principais métodos para imobilização de enzimas

Fonte: Zanin e Moraes, 2004

Vários estudos já foram realizados visando o desenvolvimento de novas metodologias de imobilização de enzimas devido a grande quantidade de fatores que podem influenciar no processo (técnicas de imobilização, suportes utilizados, variação dos precursores de sílica no caso de suporte obtido pela técnica sol-gel, tipos de aditivos, técnicas de secagem entre outros).

Cita-se, como exemplo recente, o procedimento desenvolvido por Klein et al (2011), que utilizaram celulose preparada com líquido iônico BMI (NTf)<sub>2</sub>, juntamente com poliamina (para fornecer grupos aminos aos filmes celulósicos), e então realizaram a imobilização da beta-galactosidase via ligação convencional por glutaraldeído, conseguindo preservar 60 % da atividade inicial da enzima livre. Os parâmetros cinéticos obtidos para a enzima imobilizada variando-se as condições de temperatura e pH forneceram os valores máximos de  $K_m$  e  $V_m$  de 11,22 mM e 460,83 mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de enzima, à temperatura de 35 °C e pH 7,0. Foi observado uma eficiente conversão da lactose a glicose e galactose em repetidas bateladas a 7 °C e nas quais foi possível a reutilização da enzima imobilizada por 16 ciclos repetidos, sem queda drástica da atividade da enzima imobilizada. Uma vantagem da utilização desses materiais na imobilização foi que ainda forneceu maior conformação e flexibilidade dos produtos obtidos (KLEIN et al., 2011)

Como muitas das enzimas são flexíveis quando estão em ambiente aquoso, as ligações covalentes geralmente conduzem a uma perda parcial de atividade devida às mudanças nas conformações protéicas. Dessa maneira Zhu et al (2011) realizaram a imobilização covalente de enzimas em meio micro-aquoso para verificar as diferenças entre dois ambientes de imobilização com água e com solventes orgânicos micro-aquosos, e determinaram a atividade e estabilidade das enzimas imobilizadas resultantes. Nesse caso, foram utilizadas as enzimas catalase, tripsina, lacase, glicose oxidase e peroxidase para imobilização em microesferas de quitosana ativada com glutaraldeído, usando-se 4 tipos diferentes de solventes orgânicos que mostraram uma grande vantagem, principalmente no que se refere à manutenção da atividade catalítica (ZHU et al., 2011).

### **2.3. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS PELO MÉTODO SOL-GEL**

No processo de imobilização por sol-gel está envolvida a síntese de uma matriz inorgânica por meio da formação de um sol e sua transformação em um gel úmido, que

após a retirada do líquido forma o gel seco e poroso que produz um sólido denso e amorfo (SILVA e VASCONCELOS, 1999). Aditivos químicos de controle da secagem são adicionados ao sol a fim de reduzir o tempo de processamento e de se evitar o aparecimento de trincas nas membranas durante a etapa de secagem.

Esse método de imobilização envolve a hidrólise e a policondensação do alcoóxido metálico em solventes apropriados seguido pelo tratamento térmico. O biocatalisador a ser encapsulado é adicionado ao sol após a hidrólise parcial do alcoóxido (SOARES, 2004).

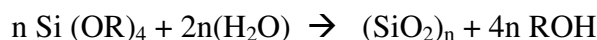
Os precursores geralmente utilizados são soluções aquosas de alcoóxidos ou sais inorgânicos dissolvidos em solventes orgânicos. Os precursores mais versáteis são os alcoóxidos metálicos, sendo os mais usados os alcoxissilanos como o tetrametoxissilano (TMOS) e o tetraoxissilano (TEOS), pois reagem facilmente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

As etapas de obtenção são: complexação (hidrólise e policondensação), solidificação por resfriamento (gelação) e secagem. Nas duas primeiras etapas, diferentes componentes estão uniformemente incorporados uns com os outros em um polímero coloidal contendo solvente; finalmente um coágulo tridimensional é produzido por meio deste polímero bidimensional. Em tais polimerizações, a homogeneidade da composição do estado líquido parece ser mantida no gel e, finalmente, refletida no catalisador. O coágulo obtido parece ter uma pequena quantidade de água não reagida, grandes quantidades de diol e monoálcool fisicamente adsorvidos e absorvidos na estrutura tridimensional e alguma quantidade de resíduo orgânico não hidrolisado quimicamente permanecem inalterados no processo de secagem por evaporação (SANTOS, 1999).

Os compósitos obtidos no estágio de xerogel (secagem por evaporação), além de apresentarem normalmente uma elevada porosidade, possuem também uma elevada densidade de óxidos metálicos por unidade de volume. Além disso, a natureza das partículas de óxidos aprisionados (o grau de dispersão) nos poros da matriz é um fator importante (AVNIR *et al.*, 1994).

A técnica de sol-gel consiste no processo em que uma certa quantidade de materiais orgânicos parece estar envolvida com polímeros coloidais durante a solidificação por resfriamento natural. Estes materiais podem ser os responsáveis pela formação da estrutura superficial do catalisador sólido, como tamanho dos poros e área superficial. Esta definição refere-se à preparação do óxido inorgânico por meio de um método químico, formando um produto monolítico, cristalino ou amorfo (SANTOS, 1999).

As reações de hidrólise e condensação do monômero de silício em presença de um catalisador ácido ou básico atuam como agente de ligação cruzada com a formação da estrutura amorfa SiO<sub>2</sub>, na qual o reticulado tridimensional é formado ao redor da enzima, representada pela reação:



O ponto de gelação é definido como o ponto no qual a ligação no sol forma uma rede tridimensional capaz de suportar tensões elasticamente. Neste momento, a fase sólida está permeada pela fase líquida que preenche os poros (HENCH *et al.*, 1992).

Ao contrário dos métodos convencionais de fusão de sílica vítrea que requerem elevadas temperaturas, a técnica sol-gel envolve baixas temperaturas nas reações de hidrólise e condensação, que são ideais para as aplicações de inclusão ou imobilização de uma grande variedade de moléculas orgânicas sensíveis a altas temperaturas, como as enzimas, que podem desnaturar e perder sua atividade biológica (MANSUR, *etal.*, 1999).

### 2.3.1 Procedimentos de secagem

No processo de obtenção dos catalisadores sol-gel pode-se empregar as metodologias de secagem em dessecador a vácuo (xerogel), com CO<sub>2</sub> supercrítico (aerogel) e sublimação sob vácuo (criogel).

O xerogel é obtido quando a fase líquida remanescente é retirada por processo convencional de secagem em estufas com temperaturas inferiores a 100 °C. Durante esse processo, a estrutura do gel é profundamente modificada, havendo uma enorme contração com diminuição da área superficial e do volume dos poros (SCHERER, 1988).

Três estágios distintos normalmente podem ser identificados com relação à taxa de evaporação da fase líquida num processo usual de secagem para obtenção de xerogéis: o período de taxa constante (CRP), o primeiro período de queda de taxa e o segundo período de queda de taxa. No período de taxa constante ocorrem as maiores modificações no volume, massa e estrutura do gel, e é controlado por evaporação na superfície externa do corpo. O menisco líquido / vapor é mantido na superfície externa do corpo, enquanto a rede sólida do gel colapsa dentro do líquido como resultado de forças compressivas impostas pela tensão superficial do líquido (SCHERER, 1988). O primeiro período de

queda de taxa se inicia quando a rede sólida do gel se torna suficientemente forte para resistir às maiores contrações. O raio do menisco, citado acima, torna-se suficientemente pequeno para o menisco entrar no poro que começa a se esvaziar. Este estágio é controlado pelo fluxo do líquido através de pequenos poros e camadas de líquido sobre a superfície dos poros, o que resulta em variações pequenas no peso e no volume do gel (HENCH, WILSON, 1992). Neste estágio, as tensões internas provocadas pelo esvaziamento dos poros, frequentemente causam aparecimento de trincas nos géis. Portanto, apenas taxas de aquecimento muito pequenas permitem manter a monoliticidade dos géis durante o tratamento térmico. O segundo período de queda de taxa se inicia quando a trajetória do líquido até a superfície externa torna-se descontínua, sendo este processo controlado por evaporação dentro dos poros e difusão do vapor até a superfície, proporcionando apenas uma perda de peso muito pequena até o equilíbrio final.

Os aerogéis são obtidos quando a fase líquida é retirada por processo supercrítico. Neste processo evitam-se as forças capilares, pois acima da temperatura e pressão crítica não existe descontinuidade entre a fase líquida e gasosa. Numa primeira etapa, troca-se a fase líquida (remanescente das reações de hidrólise e policondensação) por um único solvente, tais como: etanol, metanol, acetona, CO<sub>2</sub> líquido ou água. Em seguida, em uma autoclave, o solvente é removido por extração com fluido supercrítico, isto é, em condições de temperatura e pressão acima das do ponto crítico do solvente usado (FRICKE, 1987). Os aerogéis assim obtidos possuem características muito próximas das do gel úmido e podem apresentar até cerca de 98% de espaço livre (alta porosidade). O processo aerogel possui a vantagem de aumentar os valores de área superficial e porosidade fazendo-se a secagem dos géis em condições supercríticas (método aerogel). Nesse tipo de secagem elimina-se a interface líquido-vapor no gel que causa o colapso da textura porosa, comum nos processos convencionais de secagem.

A extração da água dos biomateriais com fluido supercrítico permite à matriz hidrofóbica uniformidade na forma e no tamanho dos poros, e segundo Nugyen *et al.* (2002), esta técnica de secagem evita, possivelmente, o colapso da estrutura da enzima durante a extração. A encapsulação de lipases utilizando a extração da água com fluido supercrítico evita as contrações capilares do reticulado de sílica (SiO<sub>2</sub>), fornecendo altas atividades quando comparada a outras técnicas de secagem (MAURY *et al.*, 2004).

A sílica gel seca por essa técnica usualmente possuem alta área superficial (800 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> ou mais) e principalmente um alto volume de poro (maior que 98% de porosidade). Esses contêm uma alta proporção de mesoporos (tamanho de poros entre 2 e 50 nm) e são



denominados aerogéis. O maior problema com a secagem em CO<sub>2</sub> supercrítico é a baixa miscibilidade com o líquido dentro dos poros do gel úmido. Devido a isso, é necessário proceder uma troca intermediária com um líquido miscível, com o fluido no gel úmido (maioria metanol e água) e CO<sub>2</sub> líquido (MAURY et al., 2004). Na matriz aerogel, a lipase, por exemplo, é capaz de ajustar a melhor conformação devido ao alto desenvolvimento da rede porosa

Os criogéis são obtidos quando a fase líquida da amostra é congelada e removida por sublimação sob vácuo. Dessa maneira também se evitam as forças capilares (não há menisco líquido/vapor). Os géis obtidos possuem propriedades estruturais bem parecidas com as dos aerogéis, porém exigem um tempo mais longo de preparação. É o menos usual dos processos.

O método de secagem das matrizes hidrofóbicas obtidas pela técnica sol-gel vêm apresentando considerável interesse nos últimos anos, sendo que resultados similares foram observados quanto ao desempenho inferior dos xerogéis em relação aos aerogéis (KUNCOVA *et al.*, 2003; MARLIÈRE *et al.*, 2001; PIERRE e BUISSON, 2001).

## 2.4. LIPASES

As lipases (glicerol-ester-hidrolases, EC.3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas encontradas em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Em seu ambiente natural, estas enzimas catalisam a hidrólise de triacilglicerol em ácidos graxos correspondentes e glicerol.

As lipases são biocatalisadores extremamente versáteis e muito eficientes que, ao lado de esterases e proteases, tem uma posição de destaque nestes meios reacionais, devido à gama de reações catalisadas por estas enzimas em sistemas orgânicos com baixo teor de água entre elas: esterificação, transesterificação, interesterificação, aminólise lactonização (KIM *et al.*, 2006), a estabilidade apreciável nestes ambientes e a possibilidade de utilização de condições reacionais brandas (BOUAID *et al.* 2007).

As lipases têm um importante papel nos processos industriais, devido a sua químió-regio- e estereo-especificidade muito difícil de ser encontrado em qualquer outro tipo de catalisador (MACARIO et al., 2009). Em termos de regioespecificidade, ou seja, a posição

de quebra das ligações ésteres, as lipases têm sido divididas em três tipos (ANTCKAZ et al., 2009):

- *sn-1,3-específicas* (atuando na hidrólise das ligações ésteres nas posições R1 ou R3 do TAG);
- *sn-2-específica* (atuando na hidrólise da ligação éster na posição R2 do TAG);
- não específica (não distinguem a posição das ligações ésteres para realizar a clivagem).

O sítio ativo das lipases é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa (ou borda). Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface

Embora sua função primária seja a de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com consumo de moléculas de água (reação de hidrólise), as lipases também possuem a capacidade de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ésteres a partir de álcoois e ácidos carboxílicos. Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para efetuar reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes empregados (BALCÃO *et al.*, 1996).

Algumas das reações da lipase são:

**Esterificação e Hidrólise:** Processo de obtenção de ésteres (Figura 2.2), formado a partir da substituição de uma hidroxila (-OH) de um ácido por um radical alcoxila (-OR). O método mais comum é a reação reversível de um ácido carboxílico com um álcool, havendo eliminação de água. A reação inversa da esterificação é a hidrólise:

**Reação de Hidrólise**



**Reação de Esterificação**



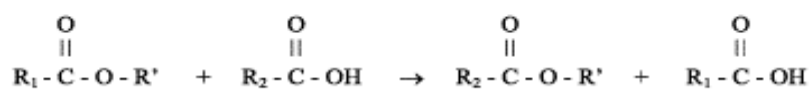
**Figura 2.2.** Reação de Esterificação e Hidrólise

Fonte: Carvalho et al., 2003

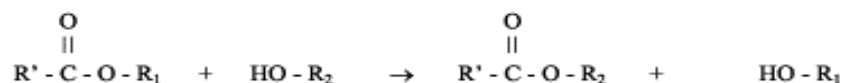
Processos de esterificação são importantes na produção de ésteres de interesse comercial principalmente nas áreas de solventes, extractantes, diluentes, plastificantes, surfatantes, polímeros, essências e fragrâncias sintéticas, e como intermediário químico para indústrias farmacêuticas, herbicidas e pesticidas.

**Transesterificação:** quando ésteres são colocados para reagir com álcoois, ácidos orgânicos, ou com outros ésteres, observa-se a transferência dos grupos álcool ou ácido entre eles, levando à formação de outros ésteres (Figura 2.3).

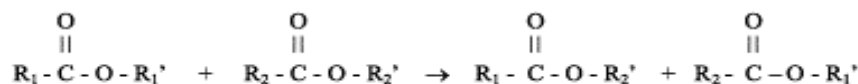
**Acidólise (reação de éster com ácido)**



**Alcoólise (reação de éster com álcool)**



**Transesterificação (reação de éster com éster)**



**Figura 2.3.** Reação de transesterificação

Fonte: Carvalho et al., 2003

Nesse trabalho foi escolhida a enzima Lipolase, (lipase de *Thermomyces lanuginosus* produzida por fermentação submersa do microrganismo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado) para ser utilizada nas reações de produção de ésteres etílicos (biodiesel) a partir do óleo de soja e etanol. A enzima é uma preparação comercial encontrada na forma granular, ou líquida, com atividade declarada de 100.000 U g<sup>-1</sup> (isto é, unidades de lipase/grama). É uma lipase 1,3 específica, ou seja, atua no éster quebrando as ligações 1,3 do triacilglicerol. Em meio aquoso é bastante estável mostrando-se ativa na faixa de pH de 7-11 e mantém uma atividade com pouca perda, num período de duas horas, entre 55 – 60 °C, entretanto as temperaturas recomendadas de utilização estão entre 30 - 40 °C (BOLETIM NOVOZYMES, 2001).

Foi utilizada também a lipase de *Bacillus* ITP-001 foi obtida por fermentação de um tipo de *Bacillus* isolado do solo contaminado de petróleo (ITP, Aracaju, Sergipe, Brasil). O cultivo foi feito em frascos erlenmeyer com a seguinte composição:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ , extrato de levedura, peptona e amido como o fonte de carbono. As condições de fermentação foram: pH inicial de 5,0; temperatura de incubação 32 °C e agitação de 200 rpm . Após 72 h de cultivo, foi adicionado óleo de coco como indutor da enzima lipolítica. A lipase obtida a partir do meio de fermentação foi purificado usando o sistema aquoso bifásico polietileno glicol e solução tampão de fosfato de potássio. Após o procedimento de purificação a fase do fundo foi recolhida com o auxílio de uma pipeta, dialisada novamente, liofilizada e mantido a 4 °C. Essa enzima apresenta boa estabilidade em pH 5,0 e temperatura de 37°C, mas também apresentou altos valores de atividade a pH 7,0 e temperatura de 80°C com alta tolerância a solventes orgânicos (BARBOSA et al., 2011)

## 2.5. IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

A utilização de lipases no processo fornece um produto com um alto grau de pureza, uma menor produção de contaminante, uma maior seletividade com bons rendimentos, possuindo como principal desvantagem o alto custo associado à sua utilização. Para sanar esse problema faz-se usos de técnicas adequadas de imobilização, permitindo a reutilização da enzima, tornando-a aplicável em nível industrial. Já foram testados sistemas para lipases de fontes animais ou microbianas que incluem a utilização de diferentes precursores de sílica (tetrametoxissilano, metiltrimetoxissilano, etiltrimetoxissilano e outros), aditivos estabilizantes alternativos (álcool polivinílico, albumina, gelatina e outros) e diversos solventes (metanol, etanol e outros). O comportamento da lipase encapsulada pela técnica sol-gel depende da estrutura física e estrutural do suporte, das propriedades químicas e físicas da lipase utilizada, e do método de secagem utilizado, entre eles utilizando-se dessecadores (xerogel) ou gases em condições supercríticas como  $\text{CO}_2$  (aerogel) (SOARES et al., 2004).

Alguns trabalhos com lipases encapsuladas em sílica-aerogel mostram que a lipase e a sílica tem uma interação. As possíveis causas são de que a cadeia polimérica peptídica

atua como catalisador na hidrólise e na condensação do processo de imobilização, e possivelmente também atua como modelo na absorção dos precursores silano terminal em intervalos regulares ao longo do peptídeo. As menores cadeias peptídicas oligoméricas na solução protéica podem ajudar a formar silanóis por um mecanismo prótico tradicional catalítico eletrolítico. Por sua vez, após a gelação, o gel mantém as enzimas em um estado disperso, similar a solução aquosa antes da encapsulação. Tal dispersão previne que ocorra a aglomeração enzimática quando a enzima encapsulada é utilizada em solvente orgânico, tornando possível a aplicação da secagem supercrítica para as enzimas (RASSY *et al.*, 2004).

Diferentes métodos vêm sendo desenvolvidos para imobilização enzimática. Esses incluem a deposição da enzima dentro de materiais inorgânicos, como celite ou sílica gel, a encapsulação, a ligação covalente, como exemplo usando polímeros funcionais epóxi, e a adsorção em bases poliméricas, entre outros. Mais recentemente, metodologias como a adsorção e a ligação cruzada de lipases estão sendo empregadas.

Quando se considera a escolha das metodologias de imobilização para aplicações da lipase em larga escala, vários cuidados devem ser tomados: a imobilização deve preferencialmente aumentar a estabilidade da lipase à temperatura e também de produtividade com a utilização do mínimo de enzima. A enzima deve ser estável durante cada etapa do processo de imobilização, a imobilização deve ser de baixo custo, o procedimento deve ser reprodutível e ser aplicável tanto em processos de batelada quanto em leitos fixos (NOUREDDINI e ZHU, 1997).

Lipase de *Candida rugosa* foi encapsulada em um suporte inerte pela técnica sol-gel preparado por policondensação com tetraetoxissilano (TEOS) e octiltrióxissilano (OTES) com uma nova categoria de aditivos derivados de calixarenos (YILMAZ, SEZGIN, YILMAZ, 2011). Essa nova classe de aditivos, quando encapsulados com lipase, fornecem alta conversão e enantiosseletividade nas reações de hidrólise com (R,S) ésteres de metil naproxeno. As condições de pH, temperatura e estabilidade térmica foram observadas para enzima livre e encapsulas, tendo como pH ótimo igual a 7,0, temperatura ótima de enzima livre em 35 °C e encapsulada em 45 °C. Para o teste de estabilidade térmica verificou-se que a enzima livre perdeu sua atividade inicial quando mantida em tampão durante 100 minutos a 60 °C, já a enzima imobilizada manteve cerca de 33 % a 62 % de atividade dependendo do tipo de derivado utilizado. A reação do éster de metil naproxeno resultou em 48,4 % de conversão em 24 horas e continuou mantendo cerca de

18% de conversão após 6 ciclos de utilização na reação de enantiosseletividade (UYANIK, SEN, YILMAZ, 2011).

A lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em sílica aerogel apresentou temperatura ótima (tanto na forma imobilizada quanto livre) de 37 °C e a imobilização da lipase proporcionou um aumento considerável na estabilidade a altas temperaturas, além de alta tolerância a solventes apolares, retendo totalmente sua atividade em suspensão depois de 4 meses armazenada a 4 °C. A enzima imobilizada ainda foi aplicada na síntese do n-butil oleato pela esterificação do ácido oléico com n-butanol, usando hexano como solvente orgânico a 37 °C com uma relação molar de 1:1 e 450 U de lipase imobilizada, com rendimentos de 85 % para lipase imobilizada e 35 % com lipase livre. Foram aplicados ainda testes de reutilização e a enzima manteve sua funcionalidade por até 12 ciclos, sem perda significativa de sua atividade catalítica (KHARRAT et al. 2011).

A lipase pancreática foi imobilizada também em sílicas mesoporosa (utilizando-se silicato de sódio como fonte de sílica e uma gelatina biodegradável como agente estruturante) com área superficial de 518,8 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> e tamanho de poro variando de 3,6 a 13,7 nm. A enzima imobilizada foi utilizada na reação de hidrólise da triacetina e comparada com a enzima livre sendo verificada uma melhor adaptabilidade em meio alcalino, já que a enzima livre exibiu pH ótimo em 7,0 e temperatura de 35 °C, enquanto para a enzima imobilizada, os mesmos parâmetros foram pH 8,0 e 45 °C, permanecendo ainda com 45% da atividade inicial após 6 ciclos de utilização (WANG et al., 2011).

## 2.6. ÉSTERES ETÍLICOS E BIODIESEL

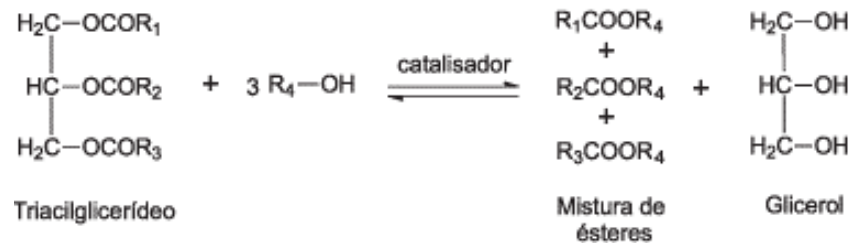
Biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis como óleos vegetais e gorduras animais que, estimulados por um catalisador, reagem quimicamente com o álcool. Existem diferentes espécies de oleaginosas no Brasil das quais se pode produzir o biodiesel, entre elas mamona, dendê, girassol, babaçu, soja e algodão.

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

*”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)*

A Figura 2.4 apresenta a reação de transesterificação, para síntese de biodiesel. O catalisador utilizado pode ser de origem química, ou biocatalisadores, como as enzimas.



**Figura 2.4.** Reação de síntese do biodiesel

Fonte: Geris et al. 2007.

Para que a qualidade do biodiesel produzido e antes de ser empregado em veículos ou motores esteja dentro de uma faixa normalizada de qualidade, foram estabelecidas especificações nacionais e internacionais que determinam os limites que determinadas características físico-químicas a que os (bio)combustíveis devem atender. Estas especificações contemplam desde os limites até as normas e técnicas de análises a serem utilizadas na determinação de cada um dos parâmetros considerados.

Cada norma específica, portanto, traz consigo uma metodologia padrão adequada, com todos os detalhes sobre equipamentos e calibrações a serem utilizadas na determinação em questão. Além disso, cada norma contém informações pertinentes sobre a necessidade de determinação daquele parâmetro da análise para combustíveis. A maioria das normas para o biodiesel foram adaptadas das normas estabelecidas para especificação da qualidade dos combustíveis derivados de petróleo, o que pode ser claramente observado no descritivo das normas ASTM (ASTM D 6571).

As especificações de qualidade para biocombustíveis devem atender as necessidades do país consumidor e, portanto, cada país produtor tem autonomia para decidir sobre o limite de suas especificações, uma vez que fatores específicos que vão desde o tipo de matéria-prima utilizada na produção, condições climáticas em que o combustível é armazenado no tanque antes de sua queima, até o tipo de motor e de sistema de injeção, irão influenciar na eficiência energética global do biocombustível. Sendo assim, foram estabelecidas as normas americanas **ASTM D 6751**, européias **EN 14214**,

brasileiras **ABNT NBR**, dentre outras, para a comercialização de biocombustíveis nos EUA, países da Europa e Brasil, respectivamente.

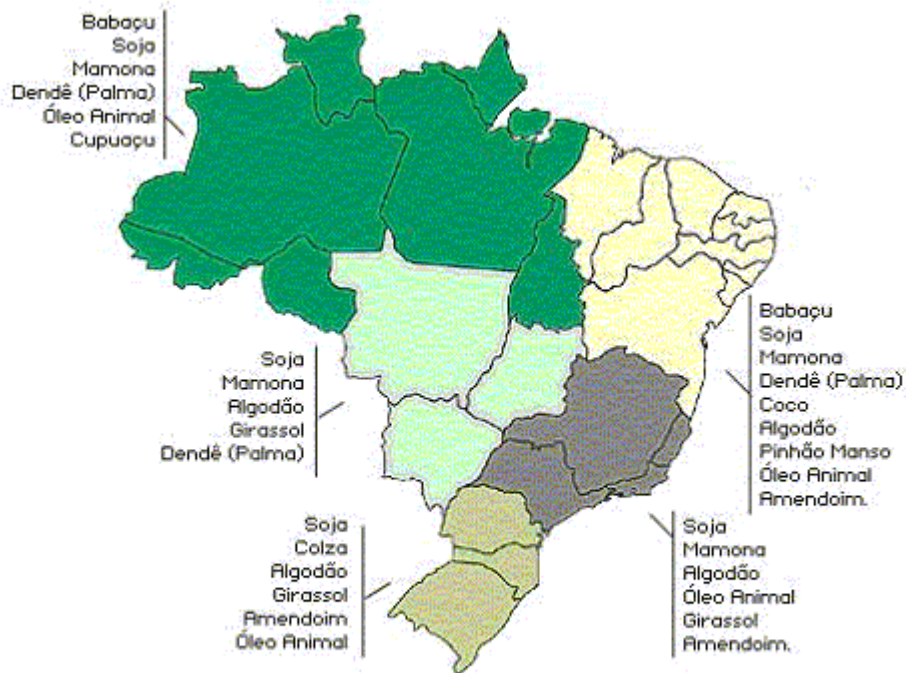
O maior país produtor e consumidor mundial de biodiesel é a Alemanha, responsável por cerca de 42% da produção mundial. Sua produção é feita a partir da colza, produto utilizado principalmente para nitrogenização do solo. A extração do óleo gera farelo protéico, para ração animal. O biodiesel é distribuído de forma pura, isento de mistura ou aditivos, para a rede de abastecimento de combustíveis compostas por cerca de 1700 postos (Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/mundo/biodiesel-no-mundo.htm>. Acesso em 26 mai 2010). De acordo com a ANP, a produção de biodiesel no Brasil, no ano de 2011 foi de 16.943.555 (BEP – barril equivalente de petróleo) e a PETROBRAS prevê investimentos da ordem de 2,5 bilhões de reais em investimentos na produção de biodiesel e etanol. (Agencia Nacional do Petróleo. Disponível em: [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br). Acesso em 27 out 2010). De acordo ainda com o presidente da PETROBRAS o Brasil deverá se tornar o maior produtor de biodiesel ainda nesse ano de 2012, já que em 2011 o país se tornou o principal consumidor desse tipo de combustível (Agencia Brasil, 2012. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/noticia/2011-11-09>. Acesso em 15 jan 2012)

As principais tecnologias que podem ser aplicadas para a obtenção de biodiesel a partir de óleos vegetais e sebo animal são a tecnologia de transesterificação e a tecnologia de craqueamento. A tecnologia para a produção de biodiesel predominante no mundo é a rota tecnológica de transesterificação metálica, nas quais óleos vegetais ou sebo animal são misturados com metanol que, associados a um catalisador, produzem biodiesel.

As matérias-primas para a produção de biodiesel podem ser de variadas fontes como óleos vegetais, gorduras animais e óleos, e gorduras residuais. Em relação ao uso de oleaginosas para a produção nacional de biodiesel, há diversas possibilidades como soja, girassol, milho, pequi, dendê, babaçu, macaúba, algodão, amendoim, entre outras (Figura 2.5).

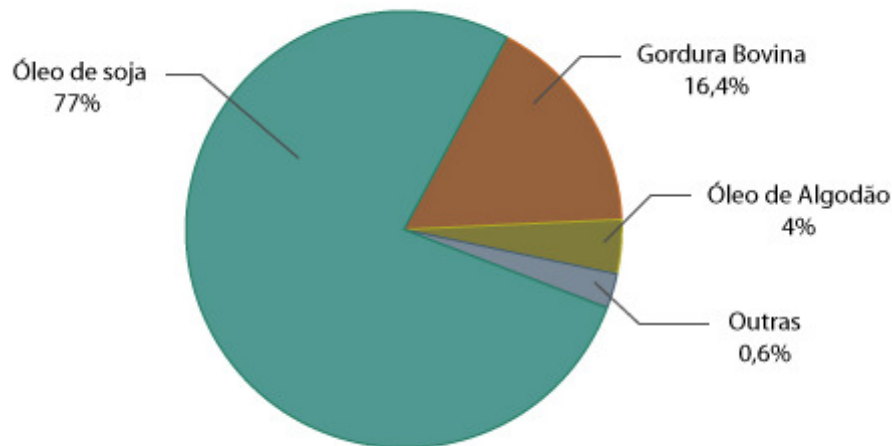
A soja, o girassol, a mamona, o amendoim e o algodão apresentam menor produtividade, porém o retorno do capital investido é mais rápido, além de serem culturas rotativas, que tem a possibilidade de se ter uma safra de duas culturas diferentes em um mesmo terreno, somando-se assim suas produtividades. Por exemplo, em um hectare pode-se produzir 1.600 litros de óleo de babaçu ou 500 litros de óleo de soja e 900 litros de óleo de girassol, totalizando 1.400 litros de óleo.





**Figura 2.5.** Distribuição de oleaginosas para produção de biodiesel no território  
 FONTE: Caires, 2009.

A motivação para a utilização da soja (Figura 2.6), a cultura mais produzida no Brasil, é o valor de seu subproduto, pois esta é uma das oleaginosas que menos produz óleo por hectare. O quilo do farelo de soja, por exemplo, é mais caro que o próprio grão de soja. O mesmo pode-se dizer das proteínas que podem ser extraídas deste óleo, que têm um alto valor no mercado. O resultado disso é que o óleo de soja, apesar de ter pequena produtividade por hectare, é produzido praticamente de graça, tornando-se o subproduto do farelo e das proteínas, o que acarreta, nesse caso, uma inversão de valores. Fato semelhante ocorre com o algodão, que tem a pluma como seu produto de valor, sendo o caroço, parte que produz o óleo, atualmente até considerado um passivo ambiental por não ter aplicação suficiente para o volume produzido, fato que o coloca como uma ótima alternativa (PETROBIO, 2010).



**Figura 2.6.** % do uso de matérias-primas até o 1º semestre de 2012 na produção de biodiesel no Brasil.

Fonte: Biodieselbr.com

## **2.7. PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS VIA LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA**

O interesse principal desse estudo visa à utilização da enzima lipase imobilizada em matriz hidrofóbica sol-gel para a síntese de ésteres etílicos a partir de óleo vegetal de soja. Dessa maneira, uma revisão dos principais métodos empregados para esse propósito se faz necessária.

Na produção de ésteres etílicos via catálise enzimática, alguns fatores devem ser levados em consideração, entre eles:

- Fonte de enzima lipase utilizada, já que há vários tipos de enzima, tanto produzidas comercialmente quanto produzidas em laboratórios. Além da necessidade de imobilização, já que conforme citado, não é comercialmente viável utilizar a enzima em sua forma livre e vários métodos de imobilização são utilizados para melhoria do processo, entre eles, adsorção física, ligação covalente, método sol gel, entre outros;
- O óleo utilizado, já que na produção de biodiesel pode ser utilizado tanto óleo de fontes vegetais (soja, canola, palma), como animais (sebo) e mais atualmente algas. Cabe então definir qual matéria prima utilizar de acordo com a disponibilidade;

- O tipo de álcool, que pode ser etanol ou metanol (quanto menor a cadeia do álcool, melhor para produção de biodiesel. No Brasil, devido à disponibilidade de etanol acaba sendo matéria prima básica mais interessante na produção, enquanto nos EUA o mais utilizado é o metanol;

- O modo de adição do álcool pode ser adição total logo no início da reação, ou em bateladas consecutivas, já que uma grande quantidade de álcool no início do processo pode inibir a atuação da enzima;

- A quantidade mínima de álcool deve ser uma razão molar óleo:álcool de 1:3, que é necessária para a conversão completa do triacilglicerol, mas frequentemente faz-se necessário maiores razões, que podem chegar até 1:18;

- Em alguns casos, há necessidade de adição de água no processo, já que a lipase atua predominantemente em meio não aquoso, a água exerce grande influência na atividade catalítica e de estabilidade da lipase. Uma mínima quantidade de água é essencial para manter a enzima ativa em solventes orgânicos e em reações de transesterificação auxilia no equilíbrio da reação;

- Por último e não menos importante a temperatura de reação, já que cada enzima possui uma temperatura específica de atuação;

Uma combinação de duas lipases foi empregada para catalisar a metanólise do óleo de soja em meio aquoso para produção de biodiesel. Os dois genes de lipase foram clonados dos fungos de *Rhizomucor miehei* (RM) e *Penicillium cyclopium* (PC). A lipase de *R. miehei* é uma lipase 1,3 específica enquanto a de *P. cyclopium* é não específica para mono e diacilgliceróis, ambas apresentando atividades de 550 e 1545 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Após a otimização do processo, a utilização da enzima RM atuando de forma isolada forneceu somente 68,5 % de conversão, e quando as duas foram combinadas nas mesmas condições, a taxa de conversão aumentou para 95 %, mostrando que a combinação de duas lipases com diferentes especificidades pode ser uma eficiente estratégia para a produção de biodiesel (GUANA et al. 2010).

Na síntese de biodiesel por transesterificação enzimática de óleos vegetais com a lipase de *Thermomyces lanuginosus*, foi verificado através de um planejamento experimental (pelo uso da metodologia de superfície de resposta e delineamento composto central rotacional), que as melhores condições para a produção de biodiesel foram: temperatura de 31,5 °C, tempo de reação de 7 horas, razão molar de substrato (óleo:etanol) de 1:7,5, concentração da enzima de 15 % e quantidade de água de 4 % (em relação ao

meio reacional). Nessas condições experimentais foi possível obter uma conversão de cerca de 96 %, valor próximo ao previsto pelo modelo resultante do planejamento (94,4 %). Pelos resultados os autores verificaram que temperaturas superiores a 50 °C causavam uma inativação térmica da enzima, levando a baixas conversões e estabeleceram a temperatura de 45 °C como o maior nível na análise. Outra observação é que depois de 8 h de reação, as taxas de conversão diminuía devido, provavelmente, à uma inibição do produto na reação de alcoólise (RODRIGUES *et al.*, 2008).

Em seu trabalho, Yücel *et al.* (2011), utilizaram duas diferentes fontes de lipase imobilizadas dentro de uma matriz microporosa polimérica (com grupos funcionais aldeídos) por adsorção física e ligação covalente. As enzimas Lipozyme TL – 100 e Novozym (lipases 1,3 específicas) foram utilizadas na produção de ésteres metílicos com óleo de canola. A matriz polimérica foi sintetizada a partir de esteril e divinilbenzeno usando uma emulsão com fase interna para as duas lipases. A produção de biodiesel foi realizada em operação semi-contínua, sendo o metanol adicionado ao reator por adições sucessivas de 1:4 para evitar inibição enzimática. As condições de reação foram de 40 °C, com razão molar óleo:álcool de 1:4 e tempo total de reação de 6 horas, sendo o maior rendimento em ácidos graxos metílicos (92 %) obtido pela enzima Lipozyme imobilizada por adsorção física. A estabilidade operacional mostrou que a enzima pode ser utilizada em 10 reações sucessivas, podendo ser utilizada em nível industrial

A lipase comercial de *Candida antarctica*, Lipozyme® foi encapsulada em aerogéis de sílica reforçado com feltro de fibras de quartzo para produção de biodiesel pelo processo de transesterificação do óleo de girassol, com metanol e sem nenhum outro solvente. Com a taxa molar de metanol:óleo de 1:1, a enzima encapsulada forneceu uma conversão de 90 % depois de 50 h a 40 °C. Fazendo novamente o uso da enzima por 5 ciclos, verificou-se que a atividade aumentou cerca de 40 % depois do primeiro teste, e depois do 5º teste, permaneceu 20 % a mais quando comparada com o primeiro. As amostras de aerogéis também foram comparadas com amostras de lipases comerciais CALB imobilizadas em matrizes poliméricas, que mostraram melhor atividade durante o primeiro teste, mas depois diminuíram sua atividade em 20 % durante o segundo teste. Foi verificado então que o aerogel melhora depois do primeiro teste devido à adsorção de glicerol no gel produzido do primeiro teste, que permite um ambiente favorável para as enzimas (PIERRE *et al.* 2008).

O estudo envolvendo os fatores que influenciam a produção de biodiesel em condições de fluidos supercríticos envolvendo lipase B de *C. antarctica* foi realizado por

Lee *et al.*, (2009) de modo a definir as melhores condições para esse tipo de tratamento. No estudo obtiveram-se como melhores condições: pressão de 130 bar, temperatura de 45 °C, velocidade de agitação de 200 rpm, concentração de enzima de 20 % e conteúdo de água de 10 %. Dos diversos óleos testados, o que apresentou maior conversão foi o azeite de oliva (65,18 %), mas é interessante destacar que no caso da produção ser realizada em processo batelada, o rendimento não foi superior a 65 %. Visando aumentar o rendimento do processo, conduziu-se a adição do álcool em etapas, e manteve-se a concentração de metanol no meio reacional em 60 mmol L<sup>-1</sup>, que foi ajustada a cada 1,5 h durante a produção de biodiesel, obtendo-se conversão de 98,92 % em 6 horas. Com a intenção de se verificar a eficiência do processo industrial, foi produzido biodiesel repetidamente e obteve-se conversão de 85 % após 8 utilizações da enzima (LEE *et al.*, 2009).

Na produção de biodiesel utilizando processos com CO<sub>2</sub> supercrítico e combinando as lipases de *C. rugosa* e *R. oryzae* (1:1) as condições ótimas obtidas foram com pressão de 130 bar, temperatura de 45 °C, agitação de 250 rpm, 10 % de água e 20 % de enzima imobilizada, obtendo-se 99,13% de rendimento em 3 horas. Quando foi utilizado 90 mmol L<sup>-1</sup> de etanol na reação, o rendimento foi de 99,99 % em 2 horas, permanecendo com até 85 % de rendimento após a utilização de 20 vezes da enzima na reação (LEE *et al.*, 2011).

A síntese de biodiesel com a lipase de *Burkholderia cepacia* utilizando-se 19 diferentes líquidos iônicos (com estruturas catiônicas e aniônicas) em temperatura ambiente (LITA) mostrou que os aniônicos tiveram maior influência, fornecendo rendimentos de cerca de 82,2 % com [O<sub>m</sub>P<sub>y</sub>][BF<sub>4</sub>]. Verificou-se ainda que os LITA com maior solubilidade em água forneceram os menores rendimentos e por meio do FTIR e que a utilização de ultra-som no processo (visando aumentar a transferência de massa) reduziu em 83 % o tempo de reação de produção do biodiesel (LYU *et al.*, 2011).

A síntese de biodiesel com lipase comercial imobilizada de *C. antarctica* forneceu rendimentos de 87 % quando analisado por RMN H<sub>1</sub> e 82,9 % quando analisado por CG em um tempo de reação de 24 h, temperatura de 32 °C com 5 % de lipase em relação ao óleo. A produção de biodiesel não foi influenciada pela utilização de álcool hidratado (96 %), e o biocatalisador mostrou boa estabilidade mesmo após 5 ciclos de reação, com baixa concentração de glicerol, aproximadamente 0,74% (ROSSET *et al.*, 2011).

A produção da segunda geração de biodiesel com baixo custo foi obtida pela utilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus*. Esse novo produto integra o glicerol e monoacilglicerol (que melhora a lubricidade do combustível) na composição do biodiesel, evitando as etapas de remoção dos subprodutos. Por meio da análise de superfície de

resposta avaliou-se as condições de reação da conversão do óleo de girassol com etanol. Os resultados mostraram que em baixas temperaturas (20 °C) altos valores de pH (próximo de 12) e razão de volume de etanol:óleo de 3,4:1 são os parâmetros para melhores condições de reação, fornecendo conversões de 70 % com 1 h de reação (VERDUGO *et al.*, 2011).

## CAPÍTULO III

### MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os principais materiais e equipamentos utilizados, assim como a metodologia empregada no desenvolvimento experimental do trabalho.

#### 3.1. MATERIAIS

##### 3.1.1. Reagentes e substratos

Os principais materiais utilizados no desenvolvimento do trabalho são apresentados nessa seção:

- Lipase na forma líquida de *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase) adquirida comercialmente da Sigma Co, St. Louis, MO, EUA e lipase na forma granular de *Bacillus sp.* ITP 001, produzido por fermentação submersa pelo grupo de pesquisa da Universidade Tiradentes, Aracaju, Sergipe.
- Precursores de sílica: Tetrametoxissilano (TMOS) e Tetraetoxissilino (TEOS), adquirido da Aldrich (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, EUA);
- Reagentes: Azeite de Oliva, etanol anidro, butirato de metila, butanol, ácido butírico, álcool 2-fenetílico, acetato de vinila, óleo de soja, etanolamina, etanol, ácido clorídrico, hidróxido de amônio, brometo de cetiltrimetilamônio (CTMABr), heptano, hexanol, hexano, acetona, goma arábica em pó, pura e polietilenoglicol – PEG-1.500, e líquido iônico 1-butil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imide (BMIM TFSI) todos da marca Synth. Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

##### 3.1.2. Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho foram:

- Balança analítica METLER AE200;
- 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 para CLAE marca Thermo Scientific, ODS-C18 de fase reversa, 250x70 mm e tamanho de partícula de 5 µm.
- Equipamento de análise de BET - NOVA 1200 da Quantachrome;
- Microscópio eletrônico de varredura (MEV), marca Leica, modelo: LEO 440i;
- Equipamento TGA-50 Shimadzu – Thermogravimetric Analyser;
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Varian, modelo Mercury plus BB, 300 MHz.

### 3.2. MÉTODOS

O desenvolvimento desse trabalho foi realizado em quatro etapas:

- A primeira trata dos estudos envolvendo a lipase livre de *Thermomyces lanuginosus* que foi caracterizada quanto a sua atividade hidrolítica com azeite de oliva a 37 °C e atividade de transesterificação pela reação de acetato de vinila com álcool 2-fenetílico, em diferentes temperaturas. Na sequência foi realizado um planejamento 2<sup>2</sup> para produção de ésteres etílicos variando as condições de temperatura e relação óleo:álcool;

- A segunda etapa envolveu a imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em precursor de sílica TEOS e secagem pela técnica xerogel variando as condições de umidade e temperatura em um planejamento 2<sup>2</sup> para verificar a influência desses fatores na reação de transesterificação pela reação de acetato de vinila com álcool 2-fenetílico;

- Na terceira etapa foram realizadas as imobilizações das lipases de *Thermomyces lanuginosus* e da enzima produzida em laboratório por fermentação submersa de *Bacillus sp.* ITP-001 com o precursor de sílica (TEOS), tendo o líquido iônico 1-butil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imide (BMIM TFSI) como aditivo, secagem pelas técnicas xerogel e aerogel. Após o processo de imobilização, foi determinado o rendimento de imobilização, medidas de atividade hidrolítica e de transesterificação a 37



°C, seguidas pelas caracterizações dos biocatalisadores quanto ao seu volume e diâmetro de poros, área superficial, além da microscopia eletrônica de varredura (MEV);

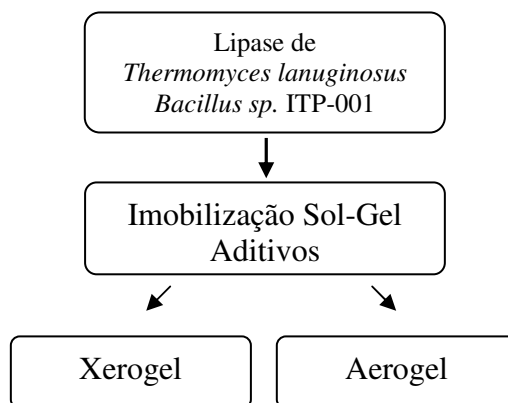
- Na última etapa foi estudada a imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em diferentes precursores de sílica (TEOS e TMOS) e secagem pelas técnicas xerogel e aerogel. Após sua produção, foram determinadas as atividades hidrolítica e transesterificação dos produtos obtidos e suas caracterizações quanto ao seu volume e diâmetro de poros, área superficial, além da microscopia eletrônica de varredura (MEV), Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Na sequência, foi realizada a produção de ésteres etílicos nas seguintes condições: temperatura de 37 °C, razão óleo álcool de 1:9, quantidade de enzima de 7,5 % em relação ao óleo, durante o tempo de 72 horas;

Os procedimentos metodológicos utilizados na realização desses trabalhos estão citados a seguir, as modificações realizadas no planejamento em cada capítulo serão citados nos resultados.

### 3.2.1. Seleção da enzima lipase e dos métodos de imobilização

Foi escolhida a lipase de *Thermomyces lanuginosus* como biocatalisador das reações de transesterificação do óleo de soja baseado em estudos na literatura, considerando os trabalhos realizados por Rodrigues (2008). Os métodos de imobilização utilizados são os propostos por Macario (2009) e pela Patente PI0306829- 3 (2003) que utilizam como precursores do suporte de imobilização de sílica, o TMOS e o TEOS, respectivamente. Em alguns casos, foram variadas as condições de secagem do suporte pelos métodos de xerogel (dessecador) e aerogel (CO<sub>2</sub> super crítico), além da utilização de diferentes aditivos nos procedimentos de imobilização.

A Figura 3.1 mostra como foi realizado o planejamento da etapa de imobilização da lipase.



**Figura 3.1.** Planejamento de imobilização enzimática

### **3.2.1.1. Procedimentos de Imobilização utilizando-se Tetraetoxissilano (TEOS) e Tetrametoxissilano (TMOS)**

A solução sol-gel foi preparada de acordo com a metodologia de Macario *et al.* (2009) com modificações para o precursor TMOS e pela metodologia da Patente PI0306829-3 (2003) para o precursor TEOS.

Na primeira metodologia, a enzima foi dissolvida em uma solução aquosa de brometo de cetiltrimetilamônio (CTMABr) e agitada a 300 rpm por 1 h à temperatura ambiente, e então adicionou-se o TMOS e etanolamina (20 % massa) para a gelação da sílica. A solução de preparação do biocatalisador, contendo TMOS (tetrametilortosilicato) e a enzima, foi submetida à agitação durante 24 h, após a adição de agente geleificante (etanolamina).

A matriz sol-gel com precursor TEOS foi preparada pela adição da sílica diluída em etanol absoluto em atmosfera inerte de nitrogênio. A esta solução adicionou-se o ácido clorídrico diluído em água ultra pura (solução pré-hidrolisante) a 35 °C. Após, deixou-se a mistura sob agitação, durante 90 min. Em seguida, adicionou-se a enzima solubilizada em água deionizada. A solução enzimática foi adicionada juntamente com um aditivo (16 mL de uma solução preparada com 0,8 g de PEG-1450 em 20 mL de água deionizada ou 1 % de líquido iônico 1-butil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonyl)imide em relação ao volume reacional). Para gelação da sílica, foi adicionado hidróxido de amônio dissolvido em etanol (solução hidrolisante) e mantido em repouso por 24 h. O material foi filtrado sob vácuo, empregando hexano e acetona para remover o excesso de água. Após a preparação, os biocatalisadores foram divididos em duas alíquotas para secagem por evaporação em

dessecador (xerogel) e em meio supercrítico utilizando CO<sub>2</sub> como gás de arraste (aerogel) nas seguintes condições: pressão de 100 bar, temperatura do extrator de 40°C, temperatura da válvula de extração de 90°C, tempo de secagem de 4 horas com uma vazão CO<sub>2</sub> de 2 ml min<sup>-1</sup>. Na preparação do suporte (controle), substituiu-se a enzima por água.

Após a obtenção dos biocatalisadores os mesmos foram caracterizados quanto as suas atividades e características morfológicas e físico químicas.

### 3.2.2. Caracterização da enzima livre e imobilizada

Durante o trabalho foram realizadas as medidas de atividades hidrolítica para a enzima livre e imobilizada pelo método titulométrico com azeite de oliva, atividade de esterificação pelo teor de ácido butírico e de atividade de transesterificação pela reação do álcool 2-fenetílico com acetato de vinila. Os produtos obtidos pelas imobilizações foram caracterizados quanto sua área superficial, diâmetro e volume de poro, microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Os procedimentos metodológicos são citados abaixo.

#### 3.2.2.1. Determinação do teor de proteína

O teor de proteína da enzima lipase foi determinado pelo método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando-se o reagente Azul Brilhante de Coomassie e a albumina bovina padrão. A coloração da solução é convertida de castanho escuro a azul, após sua ligação com a proteína, num processo rápido (aproximadamente 2 min). O complexo formado (proteína-corante) permanece disperso em solução por longo tempo (aproximadamente 1 h) e as absorvâncias foram medidas a 595 nm.

Amostras de lipase (*Thermomyces lanuginosus*) foram diluídas 1:400 e a concentração de proteínas foi calculada utilizando-se uma equação do segundo grau ajustada aos pontos da curva-padrão, que dá melhor ajuste do que uma reta.

### ***3.2.2.2. Determinação da atividade hidrolítica pelo método titulométrico com azeite de oliva***

A atividade enzimática da lipase, nas formas livre e imobilizada, foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia modificada por Soares *et al* (2004).

Em erlenmeyers de 125 mL, foram adicionados 5 mL de substrato (mistura de azeite de oliva, água, e goma arábica), 2 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 0,5 mL da solução enzimática livre, ou cerca de 0,04 g de enzima imobilizada (em base seca), a 37 °C em banho termostatizado, com agitação constante. Decorrido o tempo de 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de mistura de acetona, etanol e água destilada (1:1:1), sendo a reação realizada em triplicata. Para o branco substitui-se a enzima por água destilada.

Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,04 M, utilizando-se fenolftaleína como indicador. A atividade da enzima livre foi expressa em U mL<sup>-1</sup> e as atividades para enzima imobilizada foram expressas em U g<sup>-1</sup>, sendo que mL refere-se ao volume para a lipase livre e grama refere-se à massa de enzima imobilizada.

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

A atividade de transesterificação foi medida pela reação do álcool 2-fenetílico com acetato de vinila, produzindo 2-fenetil acetato. O produto da reação foi dosado em cromatógrafo líquido de alta eficiência com coluna ODS e detector UV -254 nm, fase móvel de mistura de acetonitrila e água (42:58), na temperatura desejada para os testes e vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> (AMANO Method, 2004).

A mistura de reação foi preparada adicionando-se 0,6 mL de álcool 2-fenetílico, 2,4 mL de acetato de vinila e 20 mg de enzima livre ou imobilizada e colocada sob agitação por 20 min nas temperaturas desejadas. Decorrido esse tempo, pipetou-se 0,1 mL da mistura e adicionou-se a 0,6 mL de éter isopropílico, seguida pela diluição 1:10 na fase móvel acetonitrila:água (42:58) seguida pela dosagem dos produtos em CLAE.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que irá produzir 1 µmol de 2-fenetil acetato por minuto na temperatura desejada, através da

reação do álcool 2-fenetílico com acetato de vinila. A atividade da enzima livre foi expressa em  $\text{U mL}^{-1}$  e as atividades para a enzima imobilizada foram expressas em  $\text{U g}^{-1}$ , sendo que mL refere-se ao volume para a lipase livre e grama refere-se à massa de enzima imobilizada.

#### ***3.2.2.4. Caracterização física pelo cálculo da área superficial, diâmetro e volume de poros***

As amostras foram analisadas no equipamento de análise NOVA 1200 da Quantachrome. Os experimentos foram realizados com a finalidade de se determinar a área superficial, tamanho médio dos poros e volume médio dos poros pela técnica de B.E.T. (técnica proposta por Brunauer, Emmett e Teller)

#### ***3.2.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura***

As análises das amostras foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV), marca Leica, modelo: LEO 440i. As amostras foram colocadas sobre o porta amostra do microscópio, em fitas de carbono, e sob vácuo, e 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.

#### ***3.2.2.6. Análise Termogravimétrica***

As amostras de lipase livre e dos preparados imobilizados foram submetidos à Análise Termogravimétrica (Equipamento TGA-50 Shimadzu – Thermogravimetric Analyser), tomando-se por base a perda da massa em função da temperatura. As seguintes condições operacionais foram empregadas: razão de aquecimento de  $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , na faixa de temperatura de ambiente a  $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com variação de massa de 2 a 6 mg.

#### ***3.2.2.7. Calorimetria Exploratória Diferencial***

Massas de aproximadamente 6 mg das amostras dos produtos obtidos, foram analisados em um calorímetro da marca SHIMADZU, modelo DSC-50, 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> empregando-se cápsulas de alumínio.

### 3.2.2.8. Cálculo do rendimento de imobilização

O rendimento de imobilização ( $\eta\%$ ) foi calculado pela Equação 3.1.

$$\eta (\%) = \frac{U_s}{U_0} \times 100 \quad (3.1)$$

em que:  $U_0$  = unidades de atividade hidrolítica oferecidas para imobilização;  $U_s$  = unidades de atividade enzimática total presente no suporte (atividade x massa seca).

### 3.2.3. Produção de ésteres etílicos a partir da enzima livre em meio livre de solventes

A produção de ésteres etílicos foi realizada inicialmente para a enzima livre em um planejamento 2<sup>2</sup> de acordo com a Tabela 3.1, variando-se as condições de temperatura e razão óleo:álcool:

**Tabela 3.1** Planejamento experimental para produção de ésteres etílicos com enzima livre

Temperatura (°C)		Razão molar óleo:álcool	
37	(-1)	1:6	(-1)
53	(+1)	1:6	(-1)
37	(-1)	1:9	(+1)
53	(+1)	1:9	(+1)
45	(0)	1:7,5	(0)
45	(0)	1:7,5	(0)
45	(0)	1:7,5	(0)

Os ensaios para a síntese de ésteres etílicos a partir do óleo de soja com enzima livre foram conduzidos em reatores batelada encamisados, de 30 mL, com agitação

magnética e condensadores acoplados para se evitar a evaporação do álcool. O tempo total de reação foi de 96 h e a quantidade de biocatalisador utilizado foi de 7,5 % em massa, em relação ao óleo. Amostras foram retiradas do meio reacional de forma que o volume total do reator no final do experimento fosse de 90% em relação ao volume inicial.

Nos tempos determinados, foi retirada uma alíquota do produto formado, na qual foi adicionada a mesma quantidade de água destilada e levada à fervura para inativação da enzima. Após esse tempo a mistura foi submetida à centrifugação por 10 min, para separação das fases e o sobrenadante foi recolhido e submetido a secagem em dessecador a vácuo, para evaporação da água. A amostra de ésteres etílicos purificada foi submetida à análise dos parâmetros de interesse do projeto.

#### **3.2.4. Produção de ésteres etílicos com enzima imobilizada**

Para síntese de ésteres etílicos com lipase imobilizada foram utilizados potes hermeticamente fechados, e com agitação mecânica. Amostras foram retiradas do meio reacional de forma que o volume total do reator no final do experimento fosse de 90% em relação ao volume inicial. Para produção de ésteres etílicos foram feitos diferentes testes com o intuito de verificar a influência do suporte e da secagem no desempenho dos biocatalisadores.

As condições utilizadas foram de massa total de enzima de 7,5 % em massa seca, em relação ao óleo, razão óleo:álcool de 1:9, temperatura de 37 °C em um tempo total de reação de 72 h. O tratamento dos produtos foram os mesmos realizado para os produtos obtidos para a reação com a enzima livre.

Após o estabelecimento dos tempos de reação para os quais se obtém os maiores valores de conversão, o biocatalisador foi reutilizado, sendo lavado pela adição de hexano para remoção dos ésteres etílicos e com água destilada para remoção da glicerina.

### 3.2.5. Quantificação dos ésteres etílicos por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

Para identificação dos triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ésteres em CLAE, foi utilizado o método de gradiente combinado linear aquoso-orgânico/não aquoso, adaptado de Holcapek *et al.* (1999). Este método consiste na construção de um gradiente ternário com tempo total de 42 minutos, dividido em duas etapas, uma de separação (aquosa/orgânica) e outra de eluição (não aquosa), sendo o eluente composto por água ultra pura (A), acetonitrila (B) e uma solução 5:4 (v/v) de iso-propanol/hexano (C). A condição inicial foi de 30 % de A + 70 % de B, 100 % de B em 15 min, 50 % de B + 50 % de C em 24 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 da coluna. A coluna foi operada a 40 °C, com detecção UV-VIS a 205 e 210 nm, com injeção de 20 µL de amostra e vazão do eluente de 1 mL·min<sup>-1</sup>. As curvas de calibração foram construídas a partir de diluições consecutivas das misturas de padrões de ésteres e a quantificação foi realizada somando as áreas relativas das espécies químicas comuns, submetidas à curva de calibração. Os grupos de espécies químicas comuns foram selecionados a partir de estudos de revisão bibliográfica dos trabalhos de Holcapek *et al.* (1999), Di Nicola *et al.* (2008) e com base na análise dos cromatogramas obtidos dos padrões de ésteres.

#### 3.2.5.1. Cálculo do Rendimento em ésteres

O rendimento em éster nas amostras foi calculado como descrito pela Equação (3.2), na qual “*mol de componentes i formados*”, refere-se ao número de moles de éster formados no meio reacional, até o momento da retirada da amostra e “*mol de componente i possíveis de serem formados*” é a quantidade máxima possível de ser obtida, calculada a partir da quantidade de triacilgliceróis presente no meio reacional no início do ensaio (FOGLER, 2009).

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{mol de componentes } i \text{ formados}}{\text{mol de componentes } i \text{ possíveis de serem formados}} \times 100 \quad (3.2)$$



## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1. ETAPA 1 – ESTUDOS ENVOLVENDO A LIPASE LIVRE DE *Thermomyces lanuginosus*.

##### 4.1.1. Caracterização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* livre

Na primeira etapa, a enzima livre de *Thermomyces lanuginosus* foi caracterizada quanto ao seu teor de proteína pelo método de Bradford, além da medida de atividade hidrolítica a 37°C, conforme procedimentos 3.2.2.1 e 3.2.2.2, respectivamente.

A concentração média de proteína da preparação comercial de lipase de *Thermomyces lanuginosus* obtida por esse método, em unidades de massa de proteína por volume de solução, foi de 27,3 mg mL<sup>-1</sup>. A atividade hidrolítica obtida foi de 503,5 U mg<sup>-1</sup>, (atividade específica expressas em termos de unidade de atividade por massa de enzima). O maior valor obtido para a atividade hidrolítica ocorre por tratar-se de uma enzima que atua em reações de hidrólise de éster, quebrando as ligações 1,3 do triacilgliceról.

As medidas de atividade de transesterificação da enzima livre, obtidas de acordo com o procedimento 3.2.2.3, foram realizadas em diferentes temperaturas conforme Tabela 4.1.

**Tabela 4.1. Medidas de atividade de transesterificação da enzima livre**

Temperatura (°C)	Atividade de Transesterificação (U g <sup>-1</sup> )*
37	1233
45	1093
53	1067

\*Atividade específica

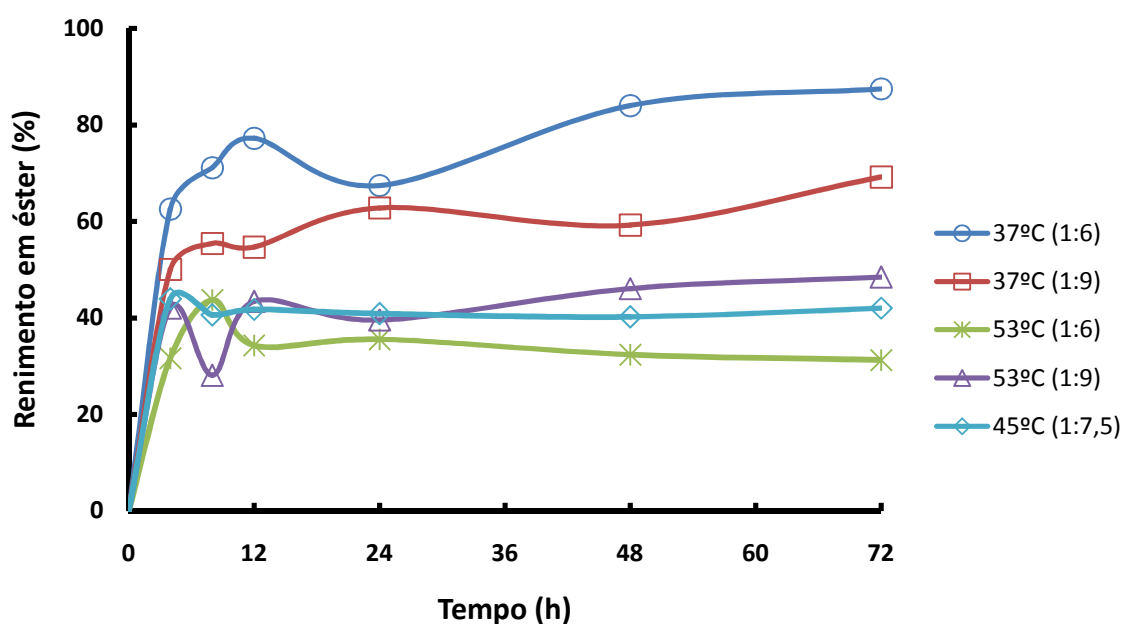
Pela Tabela 4.1 verifica-se que a temperatura mais baixa fornece melhores resultados de atividade de transesterificação quando, a enzima é utilizada na sua forma livre. A temperatura possui uma grande influência na atividade, seletividade e estabilidade do

biocatalisador e também no equilíbrio da reação e o interesse de caracterizar essa enzima para esse tipo de reação é que a mesma se assemelha a de produção de biodiesel.

A lipase de *Thermomyces lanuginosus*, em meios aquosos é muito estável, mantendo sua atividade em uma faixa de pH de 7 a 11, que para enzimas é bem ampla. Essa enzima também mantém razoavelmente bem sua atividade em temperaturas de 55 a 60 °C, mesmo que a temperatura recomendada para aplicações seja entre 30 e 40 °C, conforme pode ser observado nos resultados apresentados (FERNANDES et al., 2004).

#### 4.1.2. Produção e caracterização dos ésteres etílicos produzidos pela lipase de *Thermomyces lanuginosus* livre

Nessa etapa foram realizados os testes de síntese de ésteres etílicos em meio livre de solventes (conforme procedimento descrito no item 3.2.3), fixando a quantidade de massa de enzima em 7,5 % (em relação à massa de óleo). Observou-se que os maiores rendimentos ocorreram para a condição de temperatura de 37 °C e razão óleo:álcool de 1:6, fornecendo um rendimento em éster superior a 85%. Em concordância com os resultados obtidos na atividade de transesterificação, a menor temperatura utilizada forneceu os melhores resultados de rendimentos em ésteres, conforme pode ser verificado na Figura 4.1.



**Figura 4.1:** Rendimento de éster do óleo de soja em função do tempo, para a reação de transesterificação com álcool etílico e lipase de *Thermomyces lanuginosus* livre.

De acordo como os resultados apresentados na Tabela 4.2, pela análise do *p*-valor o efeito da temperatura se mostrou significativo, quando utilizado o intervalo de confiança de 90%. Pelos testes de atividade de transesterificação, já se constatou a influência da temperatura nesse tipo de reação, em que menores valores de temperaturas fornecem melhores rendimentos em éster. É possível verificar uma rápida produção de éster no início de reação e, depois, esses valores vão alcançando estado de equilíbrio, em que a concentração permanece constante.

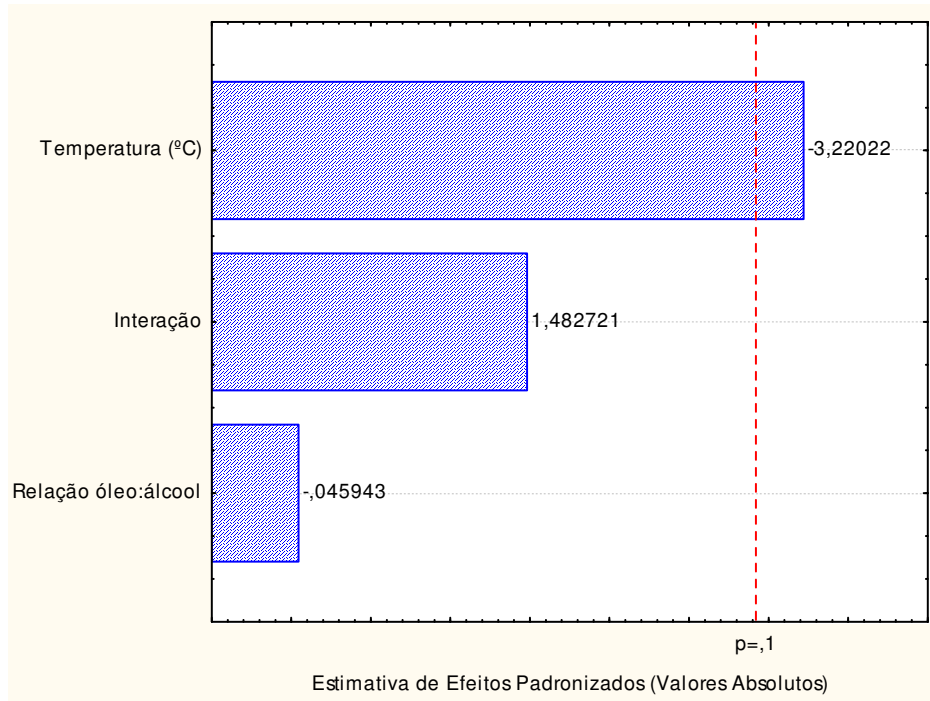
Tabela 4.2 Análise de variância para o rendimento de ésteres etílicos do óleo de soja obtidos com a enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* livre.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média Quadrática	F <sub>calc</sub>	p-valor
Temperatura (°C)	1486,103	1	1486,103	10,36981	0,084404
Razão óleo:alcool	0,303	1	0,303	0,00211	0,967530
Interação	315,063	1	315,063	2,19846	0,276374
Erro	286,621	2	143,310		
Total SS	2088,088	5			

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

Estudos realizados por Rodrigues *et al.* (2009) demonstraram que o aumento de temperatura na reação de etanolise do óleo de soja causa inativação da enzima, fornecendo menores rendimentos em ésteres. As melhores condições observadas pelos autores, na reação de etanolise do óleo de soja com a lipase de *Thermomyces lanuginosus*, foram de temperatura de 31,5 °C, tempo de reação de 7 horas, razão óleo:álcool de 1:7,5 e conteúdo de enzima de 15 % em relação ao óleo. Pela Figura 4.1, pode-se constatar que nos tempos iniciais já são fornecidos grandes rendimentos, que permanecem constantes para tempos maiores.

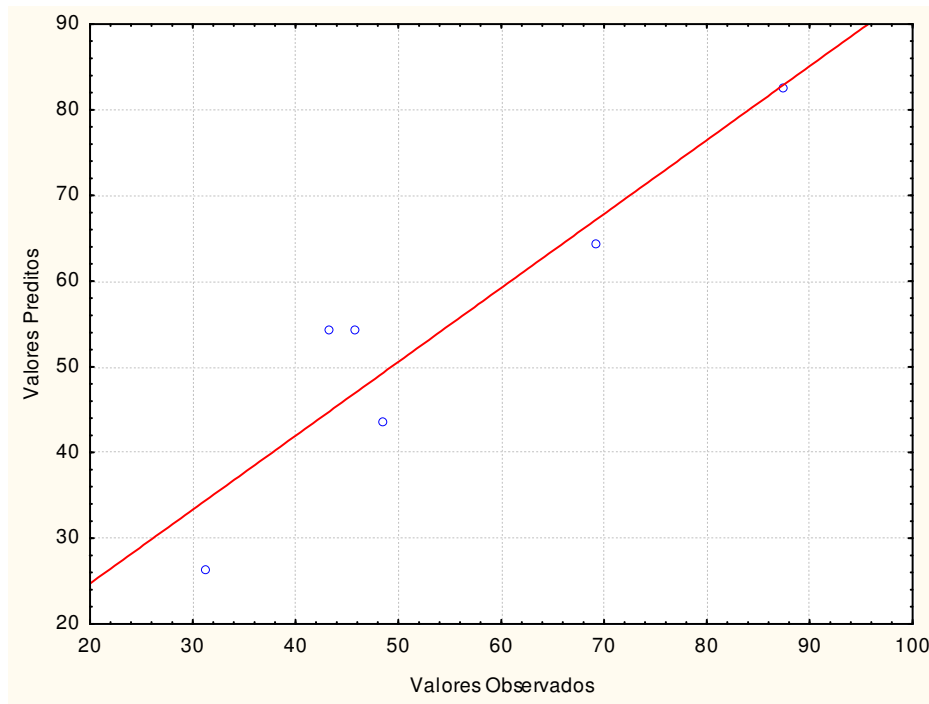
O diagrama de Pareto apresentado na Figura 4.2 mostra as estimativas dos efeitos padronizados. Foi possível identificar que o efeito da temperatura apresenta maior influência com o rendimento em éster, com um valor de alfa = 0,1.



**Figura 4.2:** Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para o rendimento em ésteres etílicos do óleo de soja com a lipase de *Thermomyces lanuginosus* livre.

Com a análise do gráfico de normalidade (Figura 4.3), foi possível identificar que os valores preditos pelo modelo de regressão usado para construção das superfícies de resposta estão distribuídos ao longo da reta de normalidade. O fato de alguns pontos estarem afastados sugere que o modelo de regressão usado para a construção das superfícies de respostas não foi totalmente preciso em relação aos dados observados experimentalmente.

O valor do  $R^2$  apresentado pelo modelo estatístico de regressão foi de 0,8627.

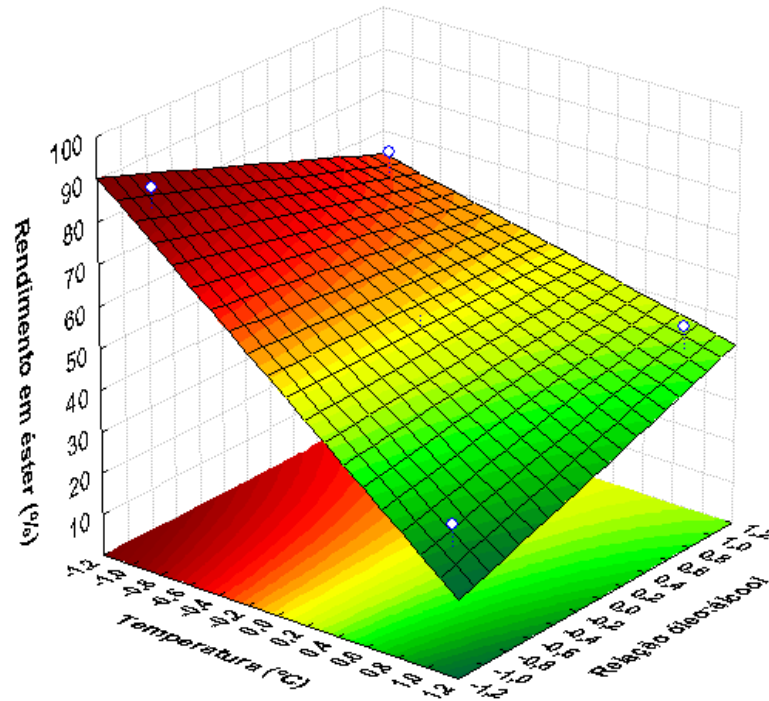


**Figura 4.3:** Gráfico dos valores observados em função dos valores preditos pelo modelo de regressão para o rendimento em ésteres etílicos do óleo de soja com a enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* livre.

O modelo de regressão dos dados de rendimento em éster do óleo de soja utilizando lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* é mostrado pela Equação (4.1):

$$\text{Rendimento} = 54,22 - (19,28 \times T) - (0,275 \times R) + (8,88 \times T \times R) \quad (4.1)$$

A superfície de resposta para o rendimento em éster mostrada na Figura 4.4, demonstra claramente um ponto de rendimento máximo, quando a temperatura é mínima.



**Figura 4.4:** Superfície de resposta para rendimento em ésteres etílicos do óleo de soja com a lipase de *Thermomyces lanuginosus* livre, em função da razão molar e temperatura.

Os rendimentos apresentados nesse trabalho com lipase livre de *Thermomyces lanuginosus* em meio livre de solvente foram da ordem de cerca de 90 % em 72 horas de reação na temperatura de 37 °C, semelhantes aos obtidos em meio na presença de solventes pois na reação de transesterificação do óleo de girassol realizada com um mosto fermentado liofilizado de lipase de *Burkholderia cepacia*, verificou-se rendimentos de 40 % em 48 horas e 100 % em 96 horas, utilizando-se heptano como co-solvente. A utilização de heptano apresentou indícios de melhorias no rendimento em éster, no entanto dificultou a recuperação dos produtos (KÖSE *et al.*, 2002; SALUM *et al.*, 2010). O aumento do rendimento quando se utiliza co-solventes pode estar ligado com a solvatação do éster e do glicerol do meio reacional. Isso permite o deslocamento do equilíbrio da reação em direção à formação de produtos (KNOTHE *et al.*, 2006).

## 4.2. PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM O DESEMPENHO DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* IMOBILIZADA

### 4.2.1. Influência da umidade da enzima imobilizada na reação de transesterificação

Nessa etapa a lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi imobilizada pela técnica sol-gel com precursor de sílica TEOS de acordo com procedimento metodológico 3.2.1.1. Essa parte do trabalho consistiu em verificar a influência da umidade do biocatalisador na reação de transesterificação pela reação entre o acetato de vinila com álcool 2-fenetílico, conforme procedimento metodológico 3.2.2.3.

Foi realizado um planejamento  $2^2$  variando as condições de temperatura e umidade, (Tabela 4.3) com a intenção de verificar qual das condições de estudo, fornecia maior atividade de transesterificação.

**Tabela 4.3** Valores de atividade de transesterificação obtidos no planejamento  $2^2$ .

Temperatura (°C)		Umidade (%)		At. Transesterificação (U/g)
40	(-1)	10	(-1)	1382
60	(+1)	10	(-1)	1403
40	(-1)	30	(+1)	1814
60	(+1)	30	(+1)	1327
50	(0)	20	(0)	1473
50	(0)	20	(0)	1560
50	(0)	20	(0)	1480

De acordo com os resultados obtidos, constatou-se que a enzima atua de forma mais ativa em condições de menores temperaturas (seguindo o mesmo comportamento verificado para lipase livre) e maiores teores de umidade, atingindo o valor de 1814 U g<sup>-1</sup> na temperatura de 40 °C e 30 % de umidade no biocatalisador.

Em reações de transesterificação, principalmente envolvendo a produção de biodiesel, uma pequena quantidade de água presente no sistema geralmente auxilia aumentando o rendimento da reação. De acordo com Ahn *et al.* (2011), a água que se encontra presente no interior dos poros mantém a lipase ativada interfacilmente nas reações de reutilização da enzima.

Outros trabalhos já demonstraram a necessidade da adição de água em processos envolvendo lipases, como no caso da reação de transesterificação do óleo de palma com etanol e metanol, no qual para a atuação da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em carbono ativado foi utilizado 1,0 mL de água em 0,5 mg de enzima (PIRAJÁN, GIRALDO, 2010). A adição de 1,0 mL de água por 0,33 g de biocatalisador também resultou em alta seletividade em ácidos graxos metílicos insaturados, produzidos na reação de metanólise do óleo de soja, com lipase imobilizada em sílica mesoporosa, além de aumentar consideravelmente a estabilidade da lipase imobilizada (AHN *et al.* 2011).

Pelos resultados obtidos na análise de variância (Tabela 4.4) nota-se que todos os efeitos, juntamente com sua interação apresentaram forte influência na atividade de transesterificação dos preparados com TEOS, pois esses fatores apresentam *p*-valor igual ou inferior a 0,05.

**Tabela 4.4** Análise de variância para a atividade de transesterificação da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em precursor de sílica TEOS, na reação entre o acetato de vinila e o álcool 2-fenético

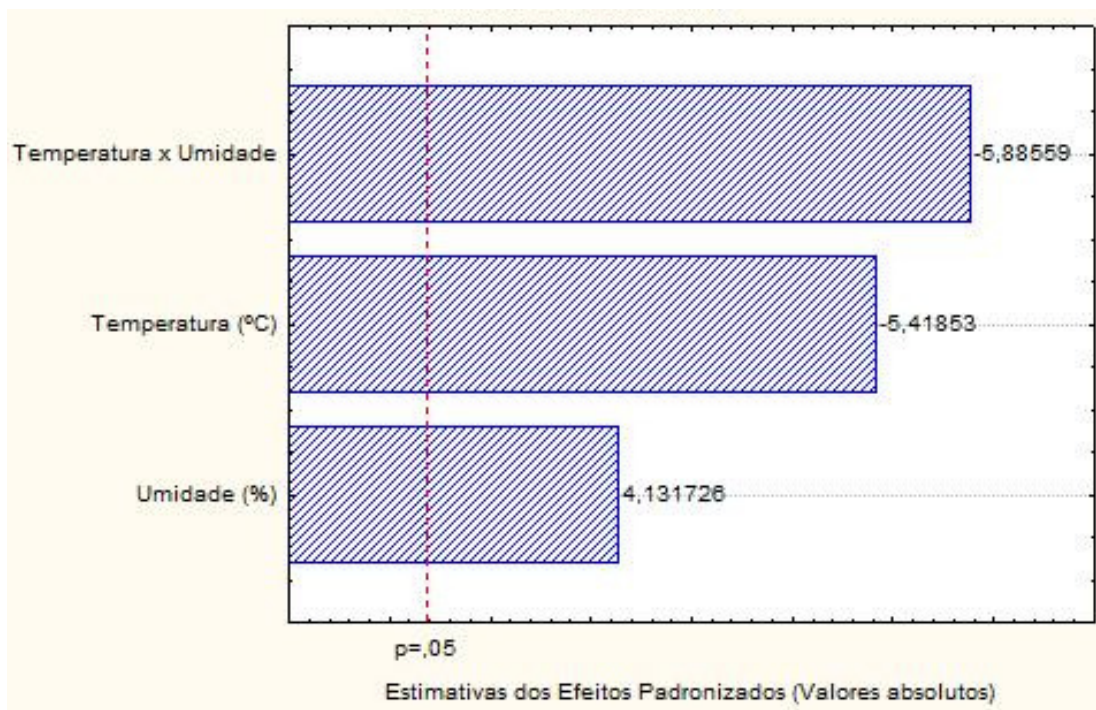
Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média Quadrática	F <sub>calc</sub>	p-valor
Temperatura (°C)	54321,6	1	54321,62	29,36048	0,012331
Umidade (%)	31584,4	1	31584,40	17,07116	0,025723
T × U	64090,0	1	64089,99	34,64021	0,009788
Erro	5550,5	3	1850,16		
Total SS	155546,5	6			

O diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos é apresentado na Figura 4.5. É possível identificar pela estimativa dos efeitos padronizados que todos os efeitos exerceram influência na atividade de transesterificação, com destaque principal para a interação dos efeitos, seguido



pela temperatura e umidade. Esse fato já era esperado, diante da análise de variância, pois o efeito da interação apresenta  $p$ -valor menores que 0,05.

O valor do  $R^2$  apresentado pelo modelo estatístico de regressão foi de 0,9643.

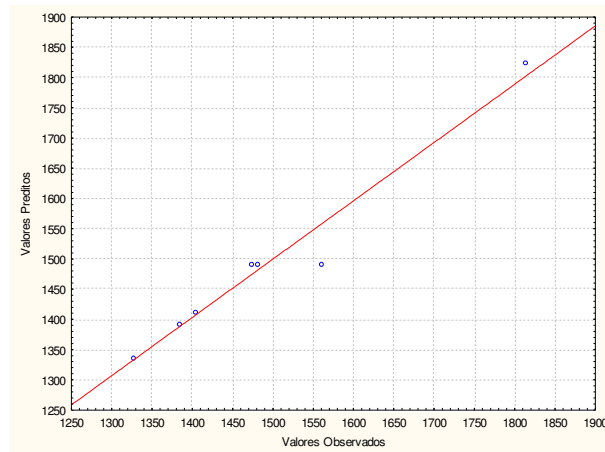


**Figura 4.5:** Diagrama de Pareto da estimativa dos efeitos padronizados para a atividade de transesterificação pela lipase *Thermomyces lanuginosus* imobilizada

O modelo de regressão dos dados de atividade de transesterificação, em função da umidade e temperatura de reação, para a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em TEOS é dado por:

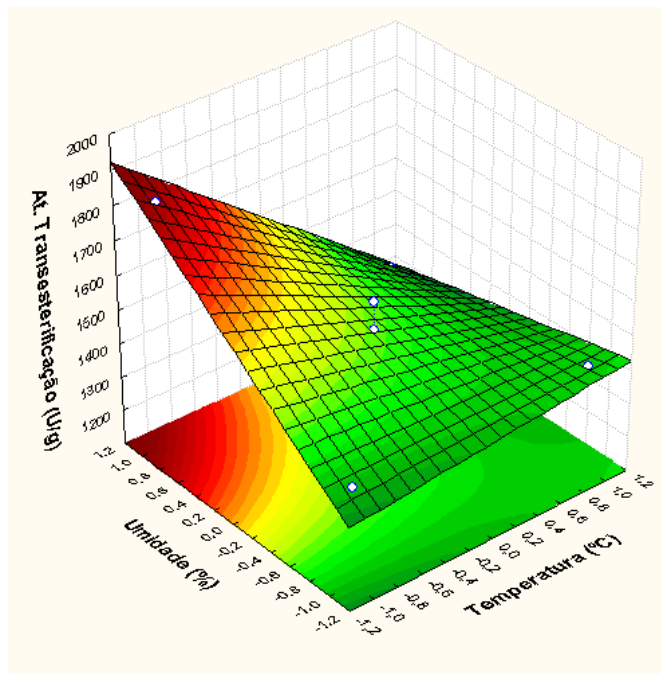
$$At. Trans. = 1491,7 - (116,5 \times U) + (88,86 \times T) - (126,58 \times U \times T) \quad (4.2)$$

O gráfico de normalidade mostrado na Figura 4.6 foi elaborado visando confirmar se as condições de normalidade exigidas pelo modelo foram satisfeitas. O modelo estatístico para a análise de variância exige que os erros de ajuste sejam independentes e normalmente distribuídos. Pela Figura 4.6 é possível perceber que um ponto está ligeiramente afastado da reta de regressão dos pontos experimentais e que coincide com a reta de normalidade. No entanto, esse único afastamento não é suficientemente preocupante e não há evidências de ausência de normalidade dos resíduos.



**Figura 4.6:** Gráfico de normalidade dos valores observados em função dos valores preditos pelo modelo de regressão para a atividade de transesterificação da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada.

A superfície de resposta é apresentada na Figura 4.7, em que evidencia e sintetiza as conclusões discutidas até o momento, segundo as quais menores temperaturas e maiores valores de umidade fornecem maiores valores de atividade de transesterificação.



**Figura 4.7:** Superfície de resposta para a atividade de transesterificação em função da temperatura e umidade, obtida com a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada, na reação entre o acetato de vinila e o álcool 2-fenetílico, conforme procedimento metodológico 3.2.2.4.

#### 4.2.2. Caracterização textural da enzima imobilizada

Nessa etapa foi determinada pelo método BET a área superficial, tamanho e volume de poros do biocatalisador contendo 30 % de umidade. O biocatalisador forneceu o valor de área superficial igual a  $502 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , volume de poros igual a  $0,643 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  e diâmetro médio de poros igual a  $5,1 \text{ nm}$ . A caracterização da porosidade dos biocatalisadores auxilia no entendimento dos resultados de atividade enzimática. Os valores obtidos mostram que o biocatalisador possui uma grande área superficial proporcionando um contato maior com o substrato, além de ser composto de mesoporos que auxilia no processo de imobilização, já que permite que a enzima não seja liberada do suporte caso apresentasse macroporos, mas também não impeça o contato com o substrato caso fosse composto de microporos. Resultados semelhantes foram obtidos para lipase imobilizada em sílica mesoporosa (obtida através de silicato de sódio e uma gelatina biodegradável), utilizada na reação de hidrólise da triacetina, no qual foram verificados valores de área superficial de  $518,8 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , tamanho de poros variando de  $3,6 \text{ nm}$  e volume de poros de  $1,34 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . A preparação mostrou boa estabilidade térmica, mantendo aproximadamente 45 % da sua atividade inicial, após ser utilizada por seis vezes consecutivas (WANG *et al.*, 2011).

Os valores obtidos na preparação dessa tese utilizando precursor TEOS foram considerados elevados, quando comparados com muitos resultados obtidos na literatura, mostrando ser uma técnica que pode ser utilizada em vários tipos de reações, fornecendo bons resultados conforme pode-se verificar pela atividade de transesterificação, relatada anteriormente.

#### 4.3. INFLUÊNCIA DO LÍQUIDO IÔNICO NA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* (COMERCIAL) E DE *Bacillus sp.* ITP 001

Nessa etapa, a lipase de *Thermomyces lanuginosus*, juntamente com a lipase de *Bacillus sp.* ITP 001, foi imobilizada pela técnica sol-gel, utilizando precursor de sílica TEOS, seguidas pela secagem xerogel e aerogel, utilizando como aditivo líquido iônico 1-butil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imide (BMIM TFSI), de acordo com o procedimento 3.2.1.1.

Os biocatalisadores foram caracterizados em diferentes temperaturas, quanto ao seu rendimento de imobilização, atividades hidrolíticas a 37 °C e atividade de transesterificação. Também foram determinados os parâmetros de área superficial, diâmetro e volume de poros e aplicadas a microscopia eletrônica de varredura e a análise termogravimétrica.

#### 4.3.1. Determinação dos rendimentos de imobilização, atividade hidrolítica e de transesterificação dos preparados enzimáticos

Para a produção dos biocatalisadores utilizados nas reações de interesse, foram utilizadas as enzimas de *Thermomyces lanuginosus* e de *Bacillus sp.* ITP 001, que possuem atividade hidrolítica a 37 °C de 503 U mg<sup>-1</sup> e 674 U mg<sup>-1</sup>, respectivamente. Após o procedimento de imobilização com precursor de sílica TEOS, os rendimentos de imobilização realizados de acordo com o procedimento 3.2.2.9 forneceram os valores de rendimento de imobilização conforme pode ser constatado na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5** Rendimentos de imobilização

Preparação	Rendimento de imobilização (%)
TL - Xerogel	83,9
TL - Aerogel	111,7
ITP - Xerogel	232,4
ITP - Aerogel	243,3

A utilização de líquidos iônicos na imobilização na maioria dos casos forneceu rendimentos superiores a 100 %, com exceção da lipase de *Thermomyces lanuginosus* seca pela técnica xerogel. A utilização do líquido iônico conforme mencionado por alguns autores pode estabilizar e proteger a enzima durante o processo de imobilização (LEE et al., 2007)

Na sequência, os biocatalisadores produzidos foram caracterizados quando a sua atividade hidrolítica de acordo com o procedimento 3.2.2.2 a 37 °C e forneceram os valores apresentados na Tabela 4.6.

**Tabela 4.6** Medidas de Atividade Hidrolítica

Preparação	Atividade Hidrolítica*
TL - Xerogel	129 U g <sup>-1</sup>
TL - Aerogel	244 U g <sup>-1</sup>
ITP - Xerogel	386 U g <sup>-1</sup>
ITP - Aerogel	430 U g <sup>-1</sup>

\*em g de preparados imobilizados

Em seguida, as enzimas imobilizadas foram utilizadas na reação de transesterificação de síntese do 2 fenetil-acetato, de acordo com o procedimento 3.2.2.3, na temperatura de 37 °C, conforme a Tabela 4.7. Os resultados obtidos para enzimas na sua forma livre, conforme etapa 4.1.1. forneceram valores de 1234 U g<sup>-1</sup> e 1183 U g<sup>-1</sup> para as lipases de *Thermomyces lanuginosus* e *Bacillus sp.* ITP-001, respectivamente.

**Tabela 4.7** Medidas de Atividade de transesterificação a 37°C

Preparação	Atividade de Transesterificação*
TL - Xerogel	9696 U g <sup>-1</sup>
TL - Aerogel	1161 U g <sup>-1</sup>
ITP - Xerogel	1429 U g <sup>-1</sup>
ITP - Aerogel	2495 U g <sup>-1</sup>

\*em gramas de enzima imobilizada

O comportamento mostrado nas medidas de atividades são semelhantes para as duas enzimas, com uma superioridade para as atividades obtidas no caso da imobilização da lipase de *Bacillus spp* ITP-001 seca pela técnica aerogel. Com os resultados obtidos para lipase de *Thermomyces lanuginosus*, nos procedimentos da Seção 4.3.1, pode-se confirmar a superioridade nos valores de atividades enzimáticas quando se utiliza o processo de secagem pela técnica supercrítica (aerogel) para todas as reações. Na reação de hidrólise a substituição de líquido iônico pelo aditivo PEG mostrou ser mais eficiente (conforme será demonstrado capítulo 4.4) fornecendo valores superiores e significativos na técnica de secagem aerogel, mas esse comportamento não foi verificado na reação de transesterificação, na qual a utilização de PEG mostrou ser extremamente superior quando utilizado esse tipo de aditivo.

Resultados semelhantes foram obtidos por Lee et al. (2007) que verificaram maiores valores de atividade hidrolítica para lipase imobilizada em TEOS na presença de líquidos iônicos. De acordo com os autores no processo de imobilização sol-gel pode ocorrer uma contração no tamanho do gel (nas etapas de condensação e secagem) que pode levar a uma desnaturação parcial da enzima. Quando são utilizados os líquidos iônicos eles podem proteger desse efeito proporcionando melhor conformação da enzima no suporte (LEE, et al, 2007).

#### 4.3.2 Determinação da área superficial, volume e diâmetro de poros (BET)

As características dos biocatalisadores, conforme procedimento experimental da seção 3.2.2.4, são apresentados na Tabela 4.8, e indicam uma influência marcante das diferentes técnicas de secagem nos parâmetros analisados, mostrando a superioridade na secagem aerogel para as enzimas utilizadas, mas com baixos valores nos parâmetros para enzima ITP xerogel.

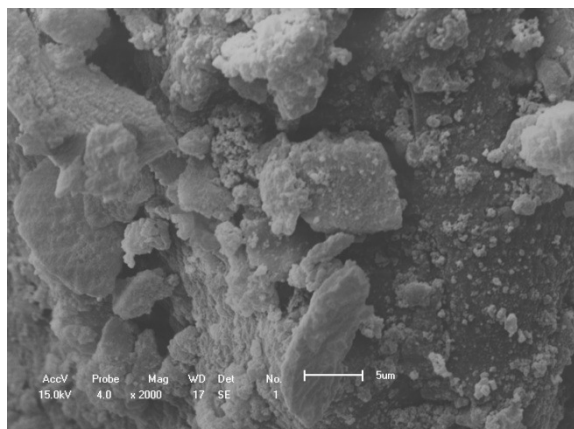
**Tabela 4.8.** Análise B.E.T. dos biocatalisadores obtidos para as diferentes enzimas com diferentes métodos de secagem

Amostra	Área Superficial (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Volume de poros (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	Tamanho de poros (Å)
TL - Xerogel	50,4	1,825 x 10 <sup>-1</sup>	145
TL - Aerogel	96,4	4,542 x 10 <sup>-1</sup>	189
ITP - Xerogel	6,1	5,472 x 10 <sup>-3</sup>	35,8
ITP - Aerogel	210	8,209 x 10 <sup>-1</sup>	156

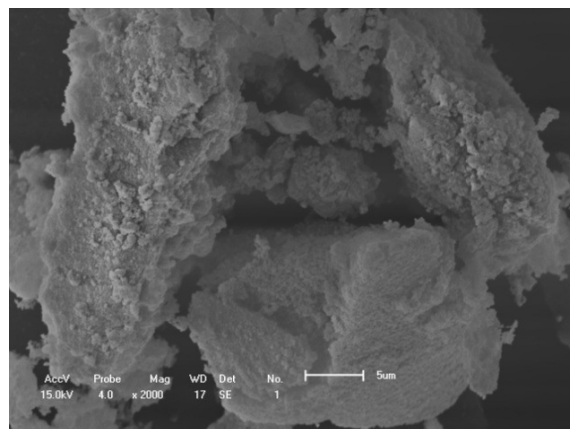
Resultados aproximados foram obtidos por Souza et al. (2012) que utilizando-se o mesmo precursor de sílica (TEOS) para a imobilização da lipase de *Bacillus* SP ITP 001 com Aliquat 336 como aditivo, em diferentes concentrações, verificaram que na presença de 1,5 % de Aliquat 336 (em relação ao volume total de imobilização) forneceu os valores de área superficial igual a 183 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, volume de poros igual a 3,6 x 10<sup>-1</sup> cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> e tamanho de poros igual a 91 Å.

### 4.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

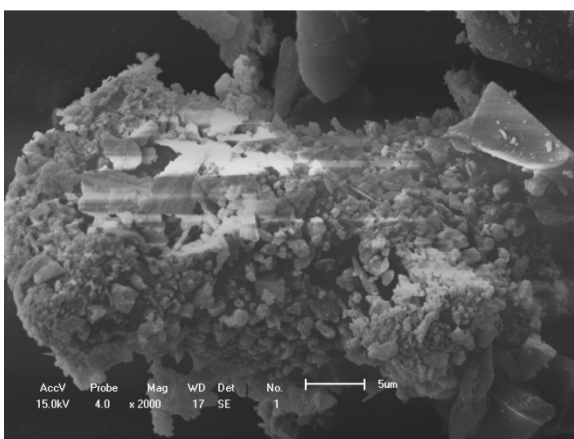
Na Figura 4.8 são apresentadas as micrografias dos biocatalisadores obtidos pelos diferentes métodos de imobilização e secagem.



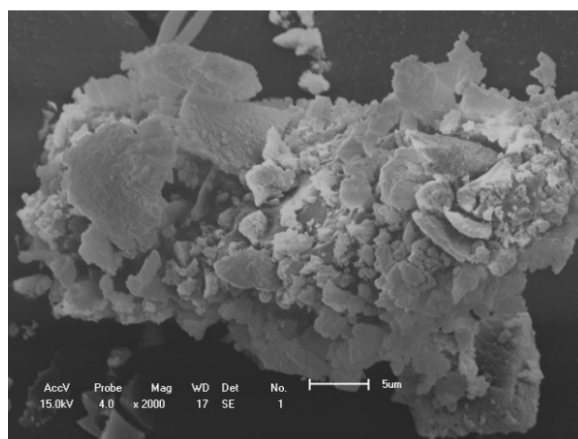
TL - xerogel



TL - aerogel



ITP - xerogel



ITP - aerogel

**Figura 4.8.** Micrografia dos suportes e das enzimas imobilizadas, obtidos com diferentes lipase pelas diferentes técnicas de secagem, de acordo com as Seção 3.2.2.6.

Pode-se verificar visualmente na Figura 4.8 que as superfícies dos biocatalisadores obtidos apresentaram uma superfície rugosa comparável a uma esponja. Observa-se ainda uma grande quantidade de material depositado na superfície dos produtos, e isto lhes confere uma maior porosidade, devido ao grande acúmulo de partículas. Resultados semelhantes foram obtidos nos trabalhos realizados por Souza et al. (2012). As micrografias concordaram com os valores obtidos nas atividades e análises de área superficial, volume e diâmetro de

poros, pois se pode constatar uma maior rugosidade e devido ao material aderido na superfície das formulações aerogéis.

#### **4.4. IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* EM MATRIZES OBTIDAS DE DIFERENTES PRECURSORES DE SÍLICA E SECOS PELAS TÉCNICAS AEROGEL E XEROGEL**

Nessa etapa, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi imobilizada pela técnica sol-gel utilizando-se os precursores de sílica TEOS e TMOS e os biocatalisadores foram secos pelas técnicas aerogel e xerogel, conforme os procedimentos da Seção 3.2.1.1. Na sequência, o biocatalisador obtido foi caracterizado quanto a sua atividade hidrolítica e transesterificação, além da caracterização de área superficial, volume e diâmetro dos poros, microscopia eletrônica de varredura, análise termogravimétrica e calorimetria exploratória diferencial, conforme procedimentos expostos nos itens 3.2.2.2 a 3.2.2.7.

##### **4.4.1 Determinação das atividades de transesterificação, hidrolítica e de esterificação dos biocatalisadores**

Os procedimentos de imobilização realizados no experimento forneceram resultados de rendimento de imobilização de 62% para o precursor TMOS e 97% para o precursor TEOS. Para verificar sua atuação em outros tipos de reação que a lipase participa, além dos testes de atividade hidrolítica, foi realizado testes de atividade de transesterificação da enzima livre e dos biocatalisadores obtidos de diferentes precursores de sílica pelos diferentes métodos de secagem a temperatura de 37 °C, que são mostrados na Tabela 4.9.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que os produtos da imobilização apresentaram bons resultados para atividade hidrolítica e atividade de transesterificação, destacando-se os biocatalisadores obtidos pela secagem em CO<sub>2</sub> supercrítico. Este fato sugere que o procedimento de secagem aerogel pode conferir ao biocatalisador características favoráveis ao aumento da atividade catalítica, pois a encapsulação de lipases utilizando a extração da água com fluido supercrítico evita as contrações capilares do reticulado de sílica (SiO<sub>2</sub>), fornecendo altas atividades quando comparada a outras técnicas de secagem (MAURI,



et al, 2004). A reação de transesterificação mostrou resultados contraditórios em relação ao precursor de sílica, já que se verificou uma maior atividade hidrolítica para o precursor TMOS, enquanto para a reação de transesterificação os maiores valores foram obtidos quando se utilizou TEOS.

**Tabela 4.9** Valores de atividades da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada

Amostra	At. Hidrolítica	At. Transesterificação
Enzima livre**	2841,7 U mg <sup>-1</sup>	56,62 U mg <sup>-1</sup>
TMOS xerogel *	942 U g <sup>-1</sup>	1218 U g <sup>-1</sup>
TEOS xerogel *	104 U g <sup>-1</sup>	1686 U g <sup>-1</sup>
TMOS aerogel*	2993 U g <sup>-1</sup>	2225 U g <sup>-1</sup>
TEOS aerogel*	119 U g <sup>-1</sup>	2770 U g <sup>-1</sup>

\* As atividades expressas em massa de biocatalisador

\*\* Atividade específica expressa em termos de atividade por massa de proteína

Os resultados obtidos estão de acordo com os obtidos por Macario (2009), na qual através da reação de transesterificação entre trioleína e metanol utilizando lipase de *R. miehei* observou-se os maiores valores na temperatura de 40°C, com uma diminuição dos valores com o aumento da temperatura.

Utilizando-se da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em monólitos de sílica Kawakami et al (2012) observou um aumento de 12 vezes nas velocidades de transesterificação do (R,S)-1-fenil etanol com acetato de vinila e aproximadamente um aumento de duas vezes na taxa de enantiosseletividade para (R)-1-fenil etanol, quando comparadas com enzima livre (KAWAKAMI et al, 2012). Em outro trabalho, foi realizada a encapsulação da lipase de *Burkholderia cepacia* obtida a partir de adição da mistura de 80 % com tetrametoxisilano e 20 % de metiltrimetoxisilano e seca pelo método com CO<sub>2</sub> supercrítico. Para determinar o comportamento catalítico, as lipases encapsuladas foram testadas pela reação de esterificação de 1-octanol com ácido láurico em água saturada de isoctano a 30 °C. As taxas iniciais de esterificação obtidas com os aerogéis de referência foram de 650 a 950 U mg<sup>-1</sup> antes da secagem supercrítica, correspondendo a uma perda de aproximadamente 20 % de proteína sobre a secagem supercrítica, que é equivalente a 800 a 1200 U mg<sup>-1</sup> de proteína purificada no gel seco (MAURI, et al, 2004). Os resultados apresentados são semelhantes ao da presente tese na qual se verifica uma alta superioridade nos valores de atividade para os preparados secos pela técnica aerogel, principalmente no

precursor TMOS. Lipases de *Pseudomonas cepacia* também foram encapsuladas em um híbrido de sílica com álcool polivinílico (MTMS e TMOS) e secos em gases supercríticos para formar aerogéis ou por evaporação para obter xerogéis. Em cada caso, a atividade catalítica das enzimas encapsuladas foi estudada para comparação com a enzima livre. O estudo demonstrou que a atividade da enzima aumentou no procedimento aerogel, pois o procedimento usado permitiu resistir aos estresses capilares durante a secagem do gel. As taxas de esterificação foram maiores quando os géis foram sintetizados com uma bases catalítica como NaF, na presença de álcool polivinílico e então seca pela técnica supercrítica (PIERRE, BUISSON, 2001).

#### 4.4.2. Determinação da área superficial, volume e diâmetro de poros (BET)

As características dos suportes e dos biocatalisadores obtidos são apresentadas na Tabela 4.10 e indicam uma influência marcante das diferentes técnicas de imobilização e secagem no volume e distribuição do tamanho de poros.

**Tabela 4.10.:** Análise B.E.T. dos biocatalisadores obtidos pelos precursores de sílica com diferentes métodos de secagem

Amostra	Área Superficial ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )	Tamanho de poros ( $\text{Å}$ )	Volume de poros ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ )
TEOS xerogel	110	71,7	0,20
TEOS aerogel	28,0	74,4	0,052
TMOS xerogel	2,00	46,2	0,0023
TMOS aerogel	3,242	49,4	0,004

Observa-se pela análise BET que o tamanho dos poros do biocatalisador seco pela técnica aerogel apresentou valores maiores que os obtidos pela técnica xerogel. Por meio desses resultados pode-se explicar porque os valores de atividades foram maiores quando utilizada essa técnica, já que o maior tamanho dos poros permite que o substrato tenha um contato facilitado com o sítio catalítico das enzimas, ocasionando um aumento de conversão do produto final. A extração da água dos biomateriais com fluido supercrítico permite à matriz hidrofóbica uniformidade na forma e no tamanho dos poros (NGUYEN, et al., 2002), esta técnica de secagem evita, possivelmente, o colapso da estrutura da enzima durante a extração.

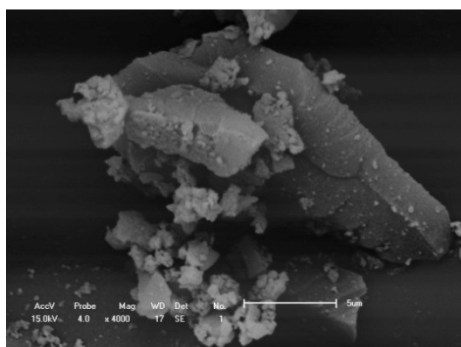
A distribuição do diâmetro dos poros dos biocatalisadores é considerada um fator relevante, podendo afetar a eficiência catalítica, pois quanto maior for o diâmetro dos poros maior será o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima encapsulada no suporte, minimizando, desta forma, os efeitos difusionais e impedimentos estéricos do biocatalisador. No entanto, deve existir um diâmetro de poro crítico (valor máximo apropriado) que impeça a saída da enzima do interior da matriz.

Altos valores na análise textural de área superficial foram obtidos quando foram utilizados os precursores MTMS/TMOS fornecendo área superficial de  $61,43 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , enquanto o maior volume de poro foi de  $0,213 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , quando não foi utilizado a técnica de bioimpressão. Mas o maior tamanho de poro foi obtido na técnica bioimpressão com precursores OTMOS/TMOS, fornecendo valores de 20,10 nm, e fazendo uma comparação de forma geral, essa foi a melhor preparação já que forneceu valores de área superficial de  $42,03 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , enquanto o maior volume de poro foi de  $0,211 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  (YANG, LYU, KAO, 2010). Os resultados encontrados pelos autores citados foram todos superiores ao obtidos no presente estudo. Diferentemente como ocorrido com Macario *et al* (2009), que utilizou secagem a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e obteve  $38 \text{ \AA}$ , como diâmetro médio de poros, valores que foram inferiores aos obtidos nesse trabalho, principalmente quando comparados à secagem em  $\text{CO}_2$  supercrítico. Valores superiores também foram obtidos por Maury *et al* (2004), que utilizando secagem xerogel obteve o volume específico de poro próximo de  $0,35 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , bem menor que o catalisador obtido pela secagem aerogel ( $\approx 1,45 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ). A secagem aerogel ficou composta principalmente por mesoporos, contribuindo em cerca de 80 % do volume específico de poros, enquanto o xerogel ficou composto de microporos, contribuindo em cerca de 90 % do volume específico de poros.

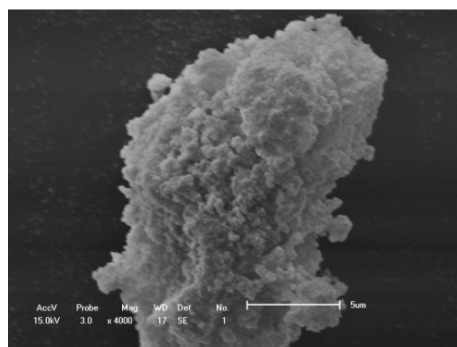
#### **4.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Na Figura 4.9 encontram-se as micrografias dos suportes e dos biocatalisadores obtidas pelos diferentes métodos de imobilização e secagem.

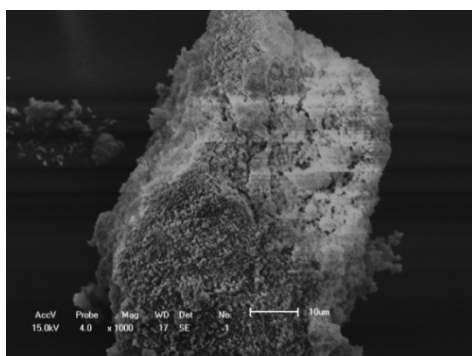
Nas micrografias obtidas do suporte, pode-se verificar que o preparado com TEOS e seco pela técnica aerogel apresentou uma superfície mais rugosa, que vem corroborar com a análise obtida de tamanho de poros, realizada anteriormente.



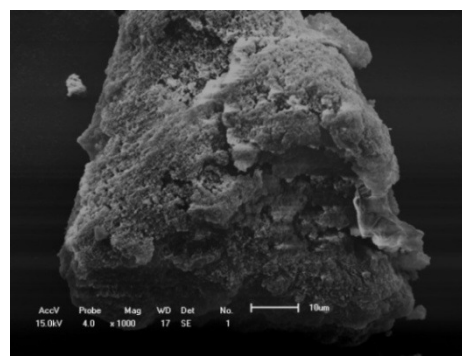
Suporte - TEOS xerogel



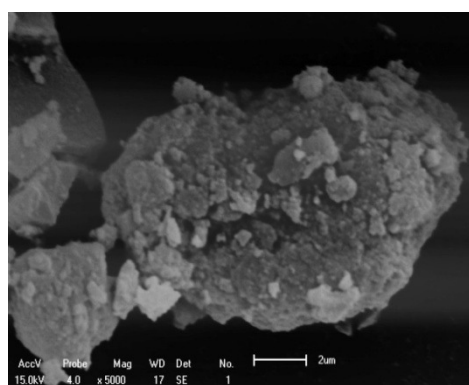
Suporte - TEOS aerogel



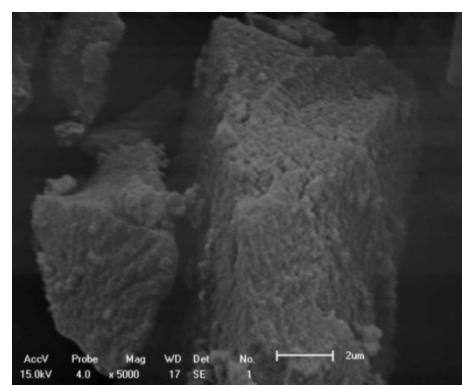
Suporte - TMOS xerogel



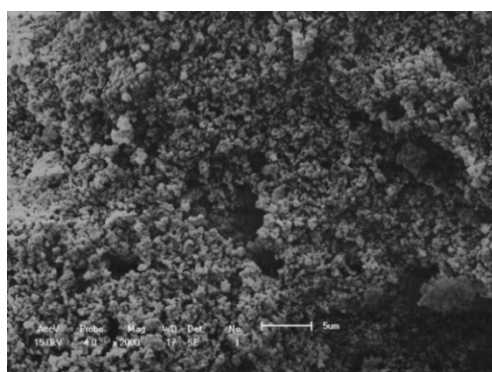
Suporte - TMOS aerogel



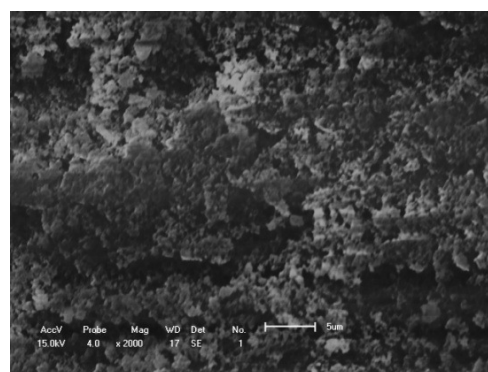
Enzima Imobilizada - TEOS xerogel



Enzima Imobilizada - TEOS aerogel



Enzima Imobilizada - TMOS xerogel



Enzima Imobilizada - TMOS aerogel

**Figura 4.9.** Micrografia dos suportes e das enzimas imobilizadas, obtidas com diferentes precursores e diferentes técnicas de secagem

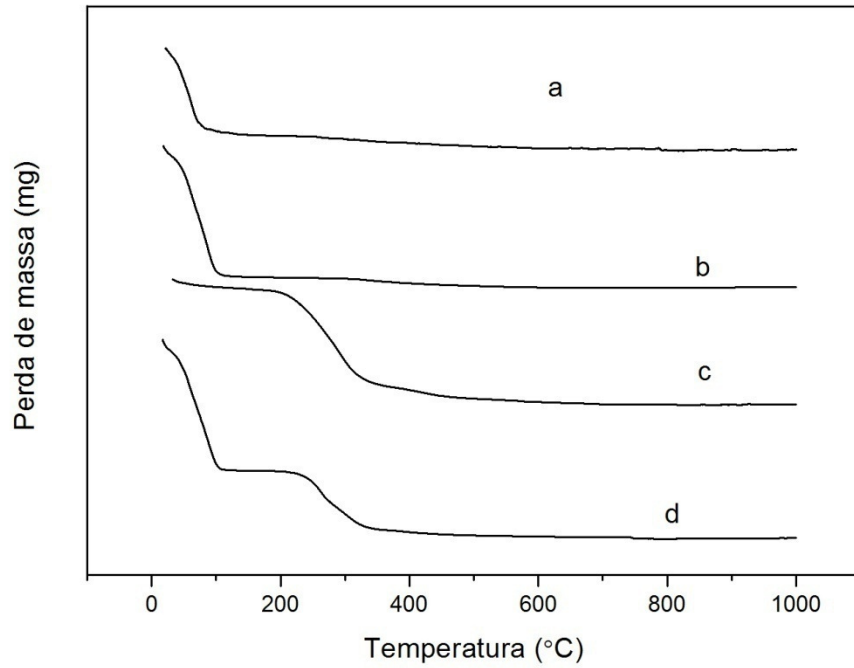
Pode-se verificar visualmente nas figuras que as superfícies dos biocatalisadores obtidos pela técnica aerogel apresentaram uma superfície mais rugosa comparada a uma esponja, vindo também corroborar os resultados obtidos pelas medidas de atividades e também os resultados da técnica de BET. Observa-se ainda uma grande quantidade de material depositado na superfície dos materiais, conferindo uma maior porosidade ao material, devido ao grande acúmulo de partículas.

#### 4.4.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

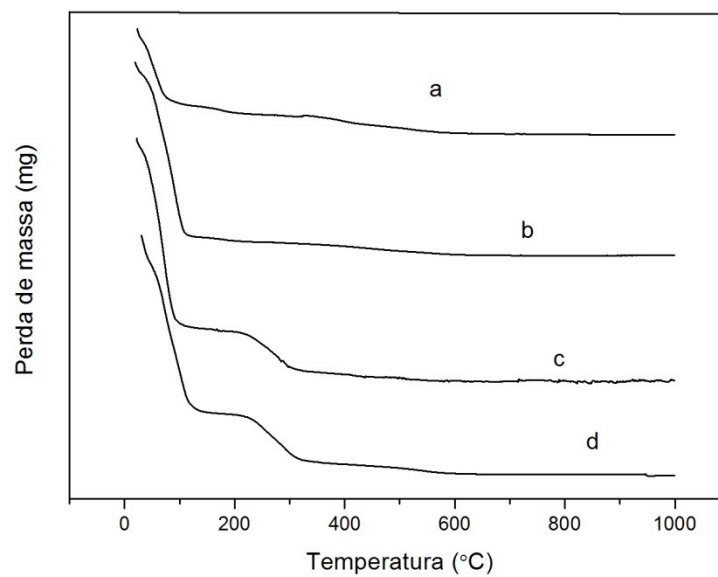
As Figuras 4.10 e 4.11 mostram as curvas termogravimétricas dos suportes e dos biocatalisadores obtidos, para a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada com matizes obtidas com TEOS e TMOS e diferentes técnicas de secagem.

Na análise dos suportes puros preparados com TEOS, em ambas as secagens, verificou-se somente a perda de água próxima a temperatura de 100 °C. Já nos suportes TMOS com secagem aerogel verificaram-se os dois estágios de perda de massa (relacionados à água e possivelmente ao surfatante presente nesse tipo de preparação).

Na análise da lipase imobilizada, para o precursor TEOS verificou-se dois estágios de perda de massa. O primeiro estágio apresentou uma elevada perda da massa (mais acentuada na secagem aerogel). É provável que esta redução da massa esteja relacionada ao teor de água e aos resíduos nas amostras analisadas após o tratamento térmico até 110 °C. No segundo estágio a perda da massa foi menor e pode estar relacionada à decomposição de compostos orgânicos, inclusive a lipase. O relaxamento estrutural do reticulado nesta região pode ser causado por reações de dehidroxilação, processos difusionais e a remoção do volume livre das matrizes sol-gel utilizadas nestes ensaios. Nas maiores temperaturas (<600 °C), tem-se a região correspondente à temperatura vítrea das amostras e tal estudo para enzimas imobilizadas não é interessante devido à alta temperatura. Porém, acredita-se que nesta região ocorra a carbonização definitiva dos compostos orgânicos, incluindo a lipase (SOARES, 2004). Para os biocatalisadores obtidos com TMOS, verificaram-se três estágios de decomposição, sendo um diferenciado na faixa de 215 – 300 °C (com perda de massa de aproximadamente 15 % em ambos os casos), que possivelmente está relacionada ao surfatante utilizado no procedimento de preparação do suporte, pois este possui ponto de fusão em torno de 240 °C.



**Figura 4.10.** Curvas de análise termogravimétrica dos suportes obtidos pelo precursor: (a) TEOS xerogel; (b) TEOS aerogel; (c) TMOS xerogel e (d) TMOS aerogel.



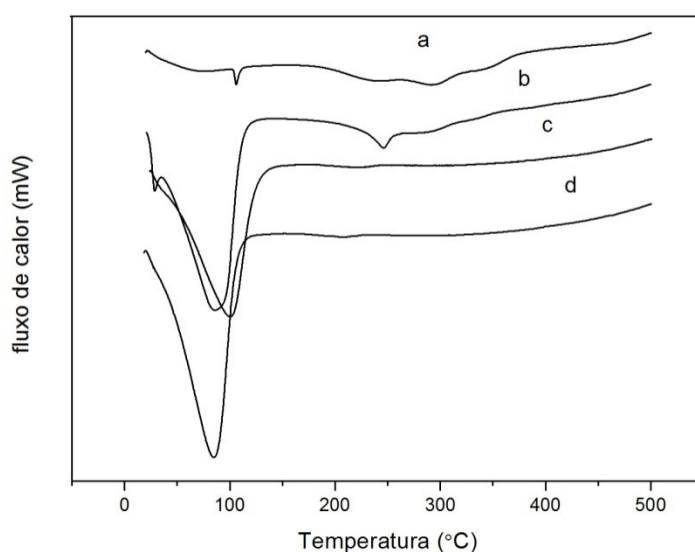
**Figura 4.11.** Curvas de análise termogravimétrica das enzimas immobilizadas pelo precursor: (a) TEOS xerogel; (b) TEOS aerogel; (c) TMOS xerogel e (d) TMOS aerogel.

#### 4.4.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

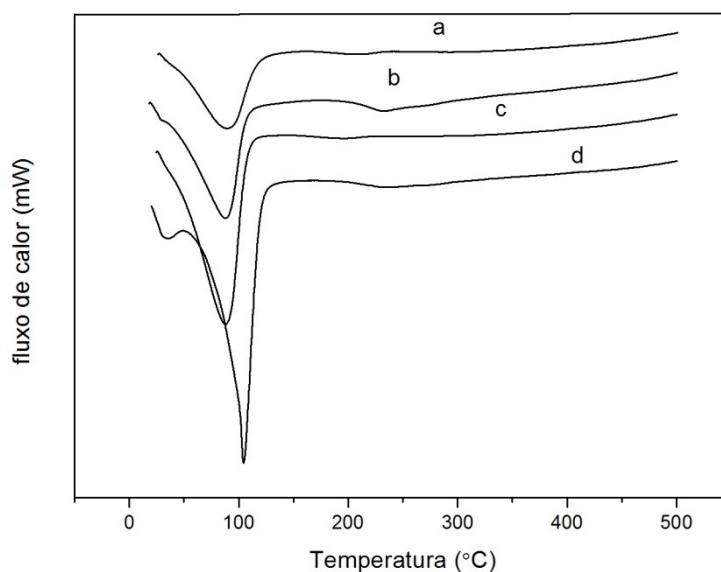
As Figuras 4.12 e 4.13, mostram as curvas de DSC dos suportes e dos biocatalisadores obtidos, para a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada com TEOS e TMOS e diferentes técnicas de secagem.

O comportamento dos picos verificados na análise DSC confirmam os resultados obtidos na análise TGA. Na análise dos suportes verifica-se acentuada perda de água até 100 °C, com perda de calor próximo de 700 J·g<sup>-1</sup>, com exceção na preparação TMOS xerogel que teve um pico endotérmico de 83 J·g<sup>-1</sup>. Na preparação com TMOS aerogel, observa-se um pequeno pico próximo a 50 °C, que pode ser devido à decomposição de algum composto orgânico presente na amostra.

Para o biocatalisador obtido com a lipase de *Thermomyces lanuginosus* verifica-se um pico acentuado a 90 °C para o precursor TEOS nos dois tipos de secagens, mostrando uma perda de calor de 468,6 J·g<sup>-1</sup> e 915,4 J·g<sup>-1</sup>, respectivamente na secagem xerogel e aerogel, devido à quantidade de água ainda presente nos suportes. Nos suportes com TMOS nota-se a presença dos picos característicos de evaporação de água a 105 °C e 88,2 °C para as secagens xerogel e aerogel com perda de calor de 814,9 J·g<sup>-1</sup> e 652,3 J·g<sup>-1</sup>, respectivamente. Nestes casos, conforme os testes de TGA anteriormente apresentados verifica-se também próximo de 240 °C uma perda de calor de 83,2 J·g<sup>-1</sup> e 39,8 J·g<sup>-1</sup>, indicando a presença do surfatante na amostra.



**Figura 4.12.** Curvas de DSC dos suportes obtidos pelo precursor: (a) TMOS xerogel; (b) TMOS aerogel; (c) TEOS xerogel e (d) TEOS aerogel

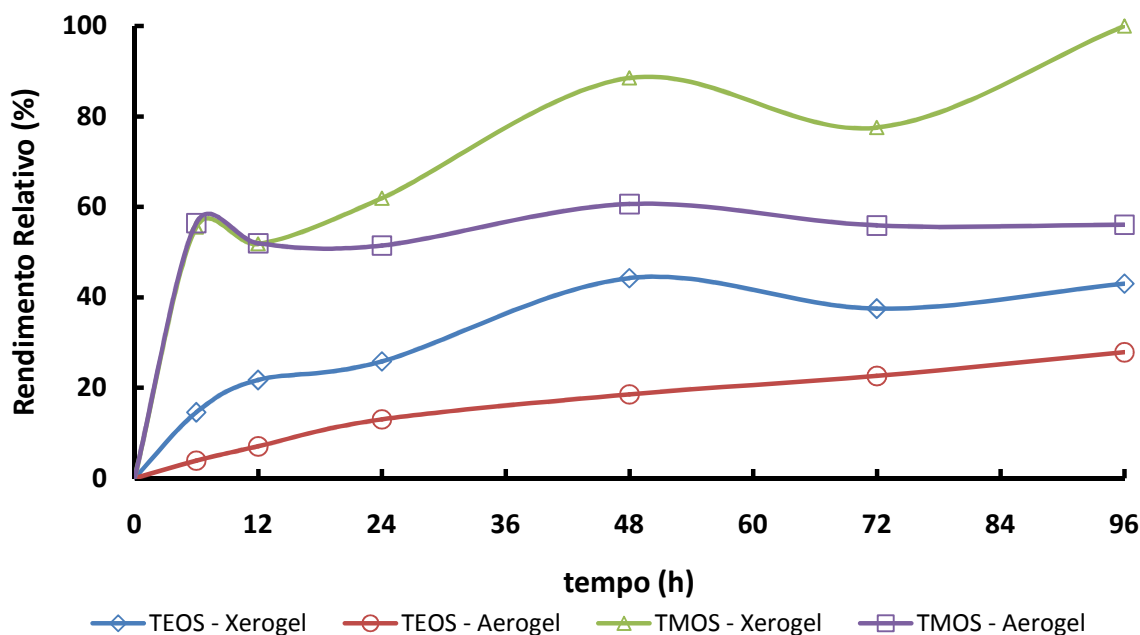


**Figura 4.13.** Curvas de DSC das enzimas imobilizadas obtidas pelo precursor: (a) TEOS xerogel; (b) TMOS aerogel; (c) TEOS aerogel e (d) TMOS xerogel.

#### 4.4.6. Produção de ésteres etílicos

Nessa etapa realizou-se os testes de síntese de ésteres etílicos (conforme procedimento descrito na Seção 3.2.4), fixando-se a quantidade de massa de enzima em 7,5 % (em relação à massa de óleo), temperatura de 37 °C e razão óleo:álcool de 1:9, para todas as preparações. Nessas condições, verificou-se um rendimento muito superior da preparação utilizando TMOS, principalmente na secagem xerogel, quando comparados com o precursor TEOS em ambas as secagens. Os maiores rendimentos (Figura 4.14) relativos (em comparação com precursor TMOS e secagem xerogel) observados foram obtidos nos tempos de 48 horas para precursor TEOS com secagem xerogel (cerca de 44%), e TMOS aerogel (cerca de 60%), enquanto para o precursor TEOS com secagem aerogel observou-se o maior rendimento em 96 horas (cerca de 27%).





**Figura 4.14.** Rendimento relativo de éster obtido do óleo de soja em função do tempo de reação, utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada como biocatalisador.

Os resultados obtidos na produção de ésteres etílicos mostraram-se contraditórios quando comparados com a atividade de transesterificação obtidas nos procedimentos discutidos na Seção 4.4.1, na qual obteve-se maiores valores de atividade para o precursor TEOS e secagens aerogel, para os dois procedimentos de imobilização. Na análise de área superficial, volume e diâmetro de poros (Seção 4.4.2), também mostraram-se contraditórios os resultados nos quais os maiores valores analisados foram obtidos com o precursor TEOS.

Na sequência dos trabalhos foi realizado um ciclo de reutilização com ambos os biocatalisadores obtidos pela secagem aerogel, no tempo de 48 horas, utilizando as mesmas condições definidas inicialmente e verificou-se que após um ciclo, o precursor TMOS permaneceu com cerca de 91,4 % da sua atividade inicial, enquanto o precursor TEOS com apenas 2,8 %, confirmando os dados de eficiência do precursor TMOS na produção de ésteres etílicos. Em seu trabalho, Macario (2009) utilizou TMOS como precursor de sílica na imobilização da lipase de *R. miehei* com surfatantes para utilização da reação de transesterificação entre trioleína e metanol (1:3), obtendo um rendimento de 77% em ésteres metílicos em 96 horas de reação a 40 °C, com baixa quantidade de enzima. Nesse caso (semelhante ao estudo), acredita-se que a lenta gelação da sílica na presença do surfatante permitiu preservar a mobilidade da enzima em um estado ativo e protegido. O fato de a enzima poder se mover quase livremente pelos canais mesoporosos, com o centro catalítico

ativado por grupos hidrofóbicos do surfatante, permitiu a enzima imobilizada possuir mais estabilidade quando comparada com a enzima livre. A matriz de sílica não aumentou a estabilidade térmica e a resistência ao álcool da enzima, mas permitiu aumentar a taxa de transesterificação devido à habilidade de adsorver triacilgliceróis, fato esse que pode ter contribuído para os altos rendimentos obtidos nesse trabalho com o precursor TMOS em relação ao TEOS.

A lipase de *Candida antarctica* imobilizada em matrizes anfífilas com 80 % de etiltrimetoxissilano em TMOS, pré-tratada com óleo, demonstrou alta atividade específica para a conversão do óleo a biodiesel, sendo de aproximadamente 90 % em 24 h, no caso de razão molar óleo:álcool de (1:3), mas com adições sucessivas do álcool (LEE et al. 2010). Para lipase de *Thermomyces lanuginosus* citada nesse trabalho usando a mesma fonte de sílica os resultados obtidos demonstraram maiores rendimentos em menores tempos

O efeito da combinação das lipases imobilizadas de *Thermomyces lanuginosus* (TL) e *Rhizomucor miehei* (RM) na reação de transesterificação e hidrólises do óleo de soja foi investigada. A partir de um planejamento experimental obteve-se como condições ótimas na reação de transesterificação 7,5:1 (razão molar etanol:óleo), 25 % de massa de enzima (em relação à massa de óleo) com 80 % da enzima TL na mistura de biocatalisador, que forneceu rendimentos de conversão de 90 %. Na reação de hidrólise as condições foram de 3:1 (água:óleo) 25 % de enzima (em relação ao peso de óleo) com 65% da enzima TL na mistura de biocatalisador, obtendo-se a conversão de 95%. De acordo com os tempos de reação observou-se que o rendimento na mistura enzimática foi maior quando comparada com as enzimas puras. As atividades das enzimas também permaneceram inalteradas em ambas as reações, até 5 ciclos de utilização, quando elas foram lavadas com n-hexano (RODRIGUES, AYUB, 2011).

Nos resultados da literatura são estudadas as mais variadas fontes de lipases na produção de ésteres etílicos, com os mais diversos tipos de óleos (não somente vegetais, mas animais e até mesmo de algas) e tipos de imobilizações. Além desses fatos, as variáveis de influência no processo como quantidade de enzima, temperatura, pH do meio, tempo de reação, quantidade de água no meio reacional, relação óleo:álcool são focos de estudos variando suas quantidades e tipos sempre na busca de uma condição ótima onde seja possível obter um máximo rendimento de biodiesel, no menor tempo e custo possível e que seja aplicável em nível industrial.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSÕES

Através dos resultados experimentais obtidos no trabalho permite enunciar algumas conclusões sobre os processos de utilização da enzima lipase livre e imobilizada e dos seus fatores de influência:

- A lipase livre de *Thermomyces lanuginosus* pode ser utilizada em reações de hidrólise e transesterificação e mesmo tratando-se de uma enzima proveniente de um micro-organismo termorresistente, sua atividade em reações de transesterificação é maior em baixas temperaturas. Isso pôde ser confirmado quando a enzima livre foi utilizada na reação de síntese de ésteres etílicos (biodiesel) e através de um planejamento experimental verificou-se que o efeito temperatura exerce influência significativa a 90% no rendimento de ésteres,

- Quando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi imobilizada em matriz de sílica produzida com o precursor TEOS e seca em dessecadores (xerogel), observou-se através dos resultados experimentais do planejamento fatorial realizado, que a temperatura, a umidade e o produto de sua interação exercem influência significativa a 95% na atividade de transesterificação. Pelo resultado obtido verificou-se que maiores valores de umidade e menores temperaturas (dentre os valores testados) fornecem maiores atividades de transesterificação. A estrutura obtida do biocatalisador, verificado pela técnica BET, pode também ter contribuído para esses resultados, já que foi obtida uma estrutura mesoporosa com grande área superficial;

- No estudo para se verificar a influência do líquido iônico no processo de imobilização e secagem da enzima lipase comercial de *Thermomyces lanuginosus* e da lipase de *Bacillus sp.* ITP-001 utilizando-se TEOS foram observados altos rendimentos de imobilização (provavelmente causado por algum processo de ativação enzimática), e uma superioridade nos valores de atividade hidrolítica e de transesterificação para a enzima ITP-001, e quando comparadas segundo os tipos de secagens, o procedimento aerogel também demonstrou superioridade. Pela análise de BET e MEV verificou-se maiores valores dos parâmetros analisados nos biocatalisadores obtidos pela técnica aerogel, contribuindo nos resultados obtidos de altos valores de atividades;

- Ao final do trabalho foi verificada a influência do tipo de precursor de sílica e da secagem na imobilização da enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus*. Os resultados obtidos pelas diferentes atividades demonstraram uma superioridade na secagem aerogel (que pode ser devida ao maior tamanho de poros, observado pela técnica de BET) nos três tipos de medidas de atividades analisados (esterificação, hidrólise e transesterificação);

- Quanto ao tipo de precursor, os maiores valores de atividade hidrolítica e de esterificação foram obtidos com o precursor TMOS, enquanto para a atividade de transesterificação, maior atividade foi obtida utilizando-se TEOS;

- Nas micrografias obtidas por MEV, não se observou diferenças visuais significativas nas estruturas, tanto do suporte, quanto dos biocatalisadores, mas em todos os casos pode-se observar uma estrutura rugosa, predominantemente composta de mesoporos, conforme constatado pela técnica de BET;

- Nos resultados de TGA e DSC, observou-se, quanto a perda de massa com aumento do calor, um comportamento com fases bem definidas de perda de água e de funcionalidade do biocatalisadores, até a completa carbonização da sílica;

- Na produção de ésteres etílicos observou-se um comportamento contraditório em relação à atividade de transesterificação, já que os altos valores de rendimento em ésteres foram obtidos com o precursor TMOS em ambas secagens, mas com ênfase no procedimento xerogel (que manteve cerca de 90 % do seu potencial catalítico, após um ciclo de utilização). Em relação ao precursor TEOS (que manteve somente em torno de 2,8 % do seu potencial catalítico, após um ciclo de utilização), o maior valor obtido também foi verificado na secagem xerogel, mas ainda inferior ao biocatalisador produzido com o outro precursor utilizado;

- Um ponto ainda a ser melhorado na produção de ésteres etílicos via biocatálise é o tempo da reação que é relativamente longo, em comparação com os processos de produção de biodiesel que utilizam catalisadores químicos convencionais.

- Foi demonstrado experimentalmente que é possível reutilizar o biocatalisador enzimático em bateladas sucessivas e isto reduz os custos relacionados a sua utilização, o que favorece cada vez mais a utilização das lipases imobilizadas, nos processos de produção de biodiesel em desenvolvimento.

## CAPÍTULO VI

### RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Esse trabalho teve como intuito servir de base para as próximas pesquisas que serão realizadas pelo grupo relacionadas à produção de biodiesel via lipase imobilizada.

Pelos resultados obtidos pode-se constatar que muitas variáveis podem influenciar na produção de biodiesel e seu estudo é de fundamental importância para se alcançar um processo adequado. Dessa maneira, como recomendações para trabalhos futuros pode-se citar:

- A utilização de novos precursores de sílica e um estudo mais aprofundado em relação à utilização de tetrametoxissilano (TMOS) e os aditivos (inclusive diferentes líquidos iônicos) que podem ser utilizados nos processos de imobilização;
- Estudo das condições de operação nas reações de transesterificação, com um controle maior das variáveis de influência do processo, utilizando-se de análises estatísticas;
- Aplicação da enzima imobilizada em reatores de leito fixo e processos pilotos de produção de biodiesel por batelada, além da combinação de diferentes enzimas lipases para aplicações em diversos tipos de reações.
- Desenvolvimento de novas tecnologias e procedimentos que possam auxiliar no processo como, por exemplo, a técnica de hidroesterificação.

O caminho é longo já que a síntese química para produção de biodiesel ainda é tradicionalmente usada predominantemente no mundo todo. Devido a esse fato as pesquisas para produção de biodiesel por via biotecnológica devem ser aperfeiçoadas de modo a oferecer vantagens, quando comparadas com o processo convencional que, utiliza catalisadores químicos, principalmente, em relação aos custos do processo e tempo de reação.

## CAPÍTULO VII

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, K. W. et al. Yield and component distribution of biodiesel by methanolysis of soybean oil with lipase-immobilized mesoporous sílica. **Microporous and Mesoporous Materials** 142 (2011) 37–44

AMANO Method. *Assay method of transesterification activity*, 2004, Amano Enzyme INC.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.

AVNIR, D., BRAUN, LEV, O., OTTOLENGHI, M. (1994). Enzymes and other proteins entrapped in sol–gel materials **Chemistry of Materials**, 20, 1605-1614.

BALCÃO V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with lipases: State of the art. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v. 18, p. 392-416, 1996.

BARBOSA, J. M. P. ; SOUZA, R. L. ; FRICKS, A. T. ; ZANIN, G. M. ; SOARES, C. M. F. ; LIMA, A. S. . Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus* in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography. B (Print)**, v. 879, p. 3853-3858, 2011

**Biodiesel no mundo.** Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/mundo/biodiesel-no-mundo.htm>. Acesso em 26 mai 2010

BOLETIM NOVOZYME A/S, Lipolase 100 TL, B 434 d-GB 500, Bagsvaerd-Denmark, 2001.

BOUAID, A.; APARICIO, J.; MARTINEZ, M.; ARACIL, JOSE. Synthesis of a green biosolvent: Isopropyl esters. A statistical approach. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 41, n. 4, p. 533-538, 2007

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 5, 1976.

CAIRES, S. Biodiesel. Disponível em: <http://www.grupoescolar.com/pesquisa/biodiesel.html>. Acesso em 23 nov 2011.

CARVALHO, Patrícia de Oliveira et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Quím. Nova**. 2003, vol.26, n.1, pp. 75-80

DI NICOLA, G., PACETTI, M., POLONARA, F., SANTORI, G., STRYJEK, R. 2008. Development and optimization of a method for analyzing biodiesel mixtures with non-aqueous reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1190(1-2), 120-126.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2ª Edição, São Paulo, 2003, págs: 255, 257 e 258.

FERNANDES, M.L.M., KRIEGER, N., BARON, A.M., ZAMORA, P.P., RAMOS, L.P., MITCHELL, D.A. 2004. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 30(1), 43-49.

FOGLER, H. S. Elements of Chemical Reaction Engineering. 4. LTC, 2009

GERIS, R. et al. Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Quím. Nova**. 2007, vol.30, n.5.

GUANA, F., PENG, P., WANG, G., YIN, T., PENG, Q., HUANG, J., GUANA, G., LI, Y. Combination of two lipases more efficiently catalyzes methanolysis of soybean oil for biodiesel production in aqueous medium. **Process Biochemistry**, 2010, v. 45, p.1677-1682

HENCH, L. L.; WILSON, M. J. R.; BALABAN, C.; NOGUÈS, J. L. (1992). **Sol-gel processing of large silica optics, Ultrastructure Processing of Advanced Ceramics**. Edited by Uhlmann, D. R., D. R., cap.15, p.159-177, John Wiley & Sons, Inc. New York.

HOLCAPEK, M., JANDERA, P., FISCHER, J., PROKEŠ, B. 1999. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. **Journal of Chromatography A**, 858(1), 13-31.

INPI Patent submission No. **PI0306829-3**, September 11, 2003.

KAWAKAMI, K., UENO, M., TAKEI, T., ODA, Y., TAKAHASHI, R. Application of a *Burkholderia cepacia* lipase-immobilized silica monolith micro-bioreactor to continuous-flow kinetic resolution for transesterification of (R, S)-1-phenylethanol. **Process Biochemistry** 47 (2012) 147–150

KHARRAT, N., ALI, Y. B., MARZOUK, S., GARGOURI, Y., CHÂABOUNI, M. K. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry** 46 (2011) 1083–1089

KIM, H.J.; YOUN, S.H.; SHIN, C.S. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol–fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. **J. Biotechnol.**, v. 123, n. 2, p. 174-184, 2006.

KLEIN, M. P.; SCHEEREN, C. W.; LORENZONI, A. G.; DUPONT, J.; FRAZZON, J.; HERTZ, P. F. Ionic liquid-cellulose film for enzyme immobilization. **Process Biochemistry** 46, (2011) 1375–1379.

KNOTHE, G., VAN GERPEN, J., KRAHL, J. 2006. *Manual do biodiesel*. Edgard Blucher, São Paulo.

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

KUNCOVA, G.; GUGLIELMI, M.; DUBINA, P.; SAFAR, B., 1995. Lipase immobilized by sol-gel technique in layer. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, n.60, pp. 1573–1577.

LEE, J. H., KWON, C. H., KANG, J. W., BUMSEOK, C. P., KIM, S. W. Biodiesel Production from Various Oils Under Supercritical Fluid Conditions by *Candida antarctica* Lipase B Using a Stepwise Reaction Method. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. Vol. 156, n° 1-3 (2009), 24-34.

LEE, et al. Biodiesel production by a mixture of *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases using a supercritical carbon dioxide process. **Bioresource Technology** **102** (2011) 2105–2108.

LEE, K. W. MIN, K., PARK, K, YOO, Y. J. Development of an Amphiphilic Matrix for Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B for Biodiesel Production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** **15**: 603-607 (2010).

LEE, S. H. NGOC, T. T. HA, S. H. KOO, Y. Using ionic liquids to stabilize lipase within sol-gel derived silica. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** **45** (2007) 57–61.

LIMA, H. O. S., 1996, **Produção de  $\beta$ -ciclodextrina por fermentação e ciclização simultâneas**. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

LYU, Y, CHEN, D., YAN, Y., PENG, L. X., Biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Burkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents. **Bioresource Technology** **102** (2011) 10414–10418.

MACARIO, A. et al. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic–inorganic system. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 118 (2009) p.334–340

MACEDO et al. **Estudo da síntese de alumina pelo processo sol-gel utilizando um planejamento experimental fatorial 2<sup>n</sup>**. 17° CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

MANSUR, H.S.; ORÉFICE, R.L.; VASCONCELOS, W.L.; SILVA, R.F; LOBATO, Z.P.; *Revista de Biotecnologia Society*. **1999**, 9, 16-18.

MARLIÈRE, C.; WOIGNIER, T.; DIEUDONNÉ, P; PRIMERA J., LAMY, M., PHALIPPOU, J. 2001, Two fractal structures in aerogel. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 285, pp. 175-180.



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

NGUYEN, D.T.; SMIT, M.; DUNN, B., ZINK, I., 2002. Stabilization of creatine kinase encapsulated in silicate sol-gel and unusual temperature effects on its activity. **Chemica Materials**, v. 14, pp. 4300-4306.

NOUREDDINI, H.; ZHU, D. Kinetics of transesterification of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.74, n.11, p.1457-1463, 1997.

PASTORE, G. M. **Aplicação de Enzimas na Indústria de Alimentos**. Disponível em < [www.anbio.org.br/palestras/palestra\\_glaucia.ppt](http://www.anbio.org.br/palestras/palestra_glaucia.ppt) > . Acesso em 28 nov. 2007.

PETROBIO. **Biodiesel: Aspectos Atuais e Viabilidade de Aplicação** Disponível em: [http://www.petrobio.com.br/downloads/Biodiesel\\_Aspectos\\_Gerais.pdf](http://www.petrobio.com.br/downloads/Biodiesel_Aspectos_Gerais.pdf). Acesso em 25 jul 2010.

PIERRE, A. *et al.* Transesterification of a vegetal oil with methanol catalyzed by a silica fibre reinforced aerogel encapsulated lipase. **Applied Catalysis A: General** 344 (2008) 70–77.

PIERRE, A., BUISSON, P., 2001, 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, pp. 639-647.

PIRAJÁN, J. C.; GIRALDO L.; Study of immobilized candida rugosa lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. **Arabian Journal of Chemistry** (2011) 4, 55–62

RASSY, H. EL, MAURY, S., BUISSON P., PIERRE A.C. Hydrophobic silica aerogel–lipase biocatalysts: Possible interactions between the enzyme and the gel. **Journal of Non-Crystalline Solids**, 2004, 350, 23–30

RODRIGUES, R., AYUB, M. A., Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry** 46 (2011) 682–688

RODRIGUES, R. C., VOLPATO, G., AYUB, M. A. Z. AND WADA, K. (2008), Lipase-catalyzed ethanolysis of soybean oil in a solvent-free system using central composite design and response surface methodology. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 83, p. 849–854.

RODRIGUES, R. C., VOLPATO, G., AYUB, M. A. Z. AND WADA, K. (2009), Improved Enzyme Stability in Lipase-Catalyzed Synthesis of Fatty Acid Ethyl Ester from Soybean Oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, n°3, p. 394-404.

ROSSET, I. G., TAVARES, M. C., ASSAF, E. M. , PORTO, A. L., Catalytic ethanolsis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and <sup>1</sup>H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General** 392 (2011) 136–142

SALUM, T.F.C., VILLENEUVE, P., BAREA, B., YAMAMOTO, C.I., CÔCCO, L.C., MITCHELL, D.A., KRIEGER, N. 2010. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, 45(8), 1348-1354.

SANTOS, O. A. A. (1999). **Hidrogenação seletiva do ácido oléico em catalisadores de rutênio**, *Tese de Doutorado*. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, SP, pp. 181.

SCHERER, G. W. Recent progress in drying of gels. **J. Non-Cryst. Solids**, 100, 77 (1988).

SILVA, R. F.; VASCONCELOS, W. L. (1999). **Materials Research**, 2, 197.

SOARES, C. M. F.; de CASTRO, H. F.; de MORAES, F. F.; ZANIN, G. M.; Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v.77, p745, 1999.

SOARES, C.M.F. (2004). **Encapsulação da Enzima Lipase em Matrizes Sol-Gel e sua Aplicação em Reações de Hidrólise e Esterificação**. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Maringá, pp.244.

SOARES, C.M.F., SANTOS O.A.S., CASTRO, H.F., MORAES F.F., ZANIN G.M.; Studies on lipase immobilization in hydrophobic sol-gel matrix. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 2004, 113, 307-319.

SOUZA, R. L., *et al.* 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** (2012). Volume 84, Pages 152–159.

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** 102 (2011) 4313–4318

VERDUGO, C., Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. **Catalysis Today** 167 (2011) 107–112.

WANG, X., ZHOU, G, ZHANG, H., DU, X; XU, Y., WANG, C.; Immobilization and catalytic activity of lipase on mesoporous silica prepared from biocompatible gelatin organic template. **Journal of Non-Crystalline Solids** 357 (2011) 3027–3032

YANG, J., LIU, L., CAO, X., Combination of bioimprinting and silane precursor alkyls improved the activity of sol-gel-encapsulated lipase. **Enzyme and Microbial Technology** 46 (2010) 257–261

YILMAZ, E.,SEZGIN, M.,YILMAZ, M.; Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic sol-gel composite supports for enzymatic resolution of (R,S)-Naproxen methyl ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 69 (2011) 35–41

YÜCEL Y., CEVDET D., NADIR D., BU LENT K. Lipase immobilization and production of fatty acid methyl esters from canola oil using immobilized lipase Yasin. **Biomass and Bioenergy**, 2011, v. 35, p. 1496-1501

ZANIN, G. M., 1989, **Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglicosidase Imobilizada**, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 499 p.

ZANIN, G.M., MORAES, F.F., 2004, “**Enzimas imobilizadas**”. In: SURAIA, S. e PIETRO, R.C.L. (eds). **Enzimas como agentes biotecnológicos**, Ribeirão Preto, Legis Summa, cap.4, pp.413.

ZHU, X.; ZHOU, T.; WU, X.; CAI, Y.; YAO, D., XIE, C. LIU, D. Covalent immobilization of enzymes within micro-aqueous organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 72 (2011) 145– 149.