

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

**LUCAS SERRA MARTIN**

**Triagem de compostos orgânicos para incorporar matrizes híbridas  
baseadas em sílica pela técnica sol-gel**

**Lorena**

**2015**

**LUCAS SERRA MARTIN**

**Triagem de compostos orgânicos para incorporar matrizes híbridas  
baseadas em sílica pela técnica sol-gel**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre  
em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Química na área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos

Orientadora: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

**Versão Corrigida**

Lorena

2015

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado  
da Escola de Engenharia de Lorena,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Martin, Lucas Serra

Triagem de compostos orgânicos para incorporar matrizes híbridas baseadas em sílica pela técnica sol gel / Lucas Serra Martin; orientadora Heizir Ferreira de Castro - Versão Original. - Lorena, 2015. 116 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química na Área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015  
Orientadora: Heizir Ferreira de Castro

1. Imobilização. 2. Sol-gel. 3. Suporte híbrido. 4. Lipase. 5. Biodiesel. I. Título. II. de Castro, Heizir Ferreira, orient.

*Dedico este trabalho aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos e aos amigos que me acompanham de perto e sempre me apoiam*

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Myrian e ao meu pai Vitoriano, por todo o carinho e apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos Vitoriano Jr e Júlia, com os quais eu aprendo e convivo e me inspiram na realização deste trabalho.

À minha namorada Milena, com a qual eu divido todos os momentos de alegria e tristeza.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Heizir Ferreira de Castro, pela excelente orientação e pela oportunidade concedida de desenvolver este trabalho. Agradeço pela dedicação, atenção, paciência e ensinamentos que foram fundamentais para meu aprimoramento como pessoa e profissional.

A todos os professores e funcionários da Escola de Engenharia de Lorena, que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

Aos amigos de laboratório que me acompanharam e me ajudaram nessa fase: Lucas, Emanuelle, Eduardo, Juan, Rafael, Heitor, Sara, Ana Karine, Annie, Renata, Braz, Flávia, Daniela, Weriton.

Aos professores Patrícia, Pedro e Larissa por me auxiliarem em todos os momentos do trabalho em que precisei.

Em especial agradeço a ajuda do companheiro de laboratório e aluno de iniciação científica Pedro, que me ajudou muito durante grande parte experimental do trabalho.

Agradeço o apoio financeiro concedido pelo CNPQ.



## RESUMO

MARTIN, L. S. **Triagem de compostos orgânicos para incorporar matrizes híbridas baseadas em sílica pela técnica sol-gel.** 2015. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2015.

O presente projeto teve como objetivo selecionar componentes orgânicos para obtenção de compósitos híbridos pela técnica sol-gel utilizando como precursor tetraetilortossilicato (TEOS) visando avaliar o efeito do agente orgânico na evolução do sol para gel e nas propriedades finais dos suportes para imobilizar a lipase microbiana de *Burkholderia cepacia*. Foram testados três compostos orgânicos  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC) e os resultados obtidos foram comparados com o comportamento já estabelecido para o poli (Álcoolvinílico) (PVA), tanto em termos morfológicos como atividade catalítica em meio aquoso (hidrólise de triacilgliceróis) e meio orgânico (síntese de éster de cadeia curta e longa). A motivação do estudo está diretamente relacionada com a elevada afinidade do suporte híbrido  $\text{SiO}_2$ -PVA pelo glicerol, sendo uma das limitações do uso deste suporte para imobilizar lipases com finalidade de aplicação em reações de transesterificação conduzidas em fluxo contínuo. As características morfológicas e estruturais dos suportes resultantes foram determinadas empregando técnicas convencionais, indicando similaridade das propriedades estruturais, fornecendo suportes com áreas superficiais entre 361,6 a 529,7  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$  e estrutura amorfa. A diferença marcante entre os suportes foi verificada quanto a capacidade de adsorção do subproduto da reação de transesterificação, sendo verificado que a substituição do poli (Álcoolvinílico) por  $\beta$ -ciclodextrina reduziu em até 50% a habilidade do suporte híbrido em absorver glicerol. Os componentes derivados de celulose apresentaram resultados similares aos obtidos com o poli (Álcoolvinílico). Em termos de afinidade pelo glicerol os resultados obtidos permitiram a classificação dos suportes híbridos na seguinte ordem crescente:  $\text{SiO}_2$ -CMC >  $\text{SiO}_2$ -PVA >  $\text{SiO}_2$ -HEC >  $\text{SiO}_2$ - $\beta$ CD. Quanto a afinidade dos suportes para imobilização da lipase de *B. cepacia*, os valores de atividade hidrolítica dos derivados imobilizados, nas condições adotadas, revelaram que todos os suportes tiveram o mesmo tipo de interação com a enzima resultando em valores de recuperação de atividade na faixa de 56 - 63%, valores próximos aos normalmente obtidos pela matriz de  $\text{SiO}_2$ -PVA (68%). Os parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) determinados indicaram que a lipase imobilizada nos diferentes tipos de suporte, apresentou afinidade semelhante pelo substrato azeite de oliva. Os valores determinados de  $K_m$  e  $V_{max}$  da lipase de *B. cepacia* na forma livre ( $K_m = 410 \text{ mM}$  e  $V_{max} = 12391 \text{ U g}^{-1}$ ) mostraram que independente do suporte, a imobilização reduziu aproximadamente 60% da afinidade da enzima pelo substrato. Em meio orgânico, tanto as reações de esterificação como de transesterificação mediadas pelos derivados imobilizados apresentaram desempenho similar com atividade de esterificação da ordem de  $118 \mu\text{M g}^{-1} \text{ min}^{-1}$  e rendimentos de formação de ésteres etílicos da ordem de 98,30%. De forma geral, os resultados obtidos foram promissores e permitiram selecionar o composto orgânico  $\beta$ CD para substituir com vantagens o poli (Álcoolvinílico) no preparo de matrizes híbridas para imobilização da enzima lipase. O menor poder hidrofílico desta matriz em relação às outras matrizes testadas pode ser creditado a estrutura cíclica da  $\beta$ CD que reduziu a capacidade do suporte  $\text{SiO}_2$ - $\beta$ CD em adsorver glicerol, principal subproduto da reação de transesterificação. Testes em processos conduzidos em fluxo contínuo são sugeridos para comprovação da eficiência dessa matriz.

**PALAVRAS-CHAVE:** Imobilização. Sol-gel. Suporte híbrido. Lipase. Biodiesel.

## ABSTRACT

MARTIN, L. S. **Screening of organic components to incorporate silica-based hybrid matrices by sol-gel technique.** 2015. 116p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2015.

The objective of this work was to select organic compounds for preparing hybrid composites by the sol-gel technique using tetraethylorthosilicate (TEOS) as precursor aiming at evaluating the effect of the organic agent in the transformation of the sol into gel and in the final properties of the matrices for immobilizing lipase from *Burkholderia cepacia*. Three organic components  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD), carboxymethylcellulose (CMC) and hydroxyethylcellulose (HEC) were tested. The organic component polyvinyl alcohol (PVA) was used as control taking into consideration its morphological properties and the catalytic activity of the immobilized derivative in aqueous medium (triacylglycerols hydrolysis) and organic medium (synthesis of short and long chain esters). The motivation of this work was directly related with the high affinity of the matrix polysiloxane-polyvinyl alcohol ( $\text{SiO}_2$ -PVA) by the glycerol, limiting the use of the immobilized derivative in the transesterification reactions running on a continuous flow. The morphological and structure properties of the resulting matrices was determined using conventional techniques, showing similar structure properties, with surface area values between 361.6 and 529.7  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$  and amorphous structure. The main difference among the matrices were observed regarding their ability to adsorb glycerol, the main byproduct of the transesterification reaction. It was verify that the replacement of the polyvinyl alcohol by  $\beta$ -cyclodextrin reduced in about 50% the hybrid composite capacity to adsorb glycerol. On the other hand, the cellulose components showed similar results as the polyvinyl alcohol. Considering as an evaluated parameter the glycerol affinity, the achieved results allowed classifying the hybrid composites as follows:  $\text{SiO}_2$ -CMC >  $\text{SiO}_2$ -PVA >  $\text{SiO}_2$ -HEC >  $\text{SiO}_2$ - $\beta$ CD. The performance of the hybrid composites for immobilizing lipase from *B. cepacia*, through the hydrolytic activity reveal that all the matrices show the same interaction with the lipase, resulting in activity recovered values between 56-63%, which is close to the value attained by  $\text{SiO}_2$ -PVA matrix (68%). The kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) values determined for free lipase ( $K_m = 410$  and  $V_{max} = 12391 \text{ U g}^{-1}$ ), showed that independely of the immobilization support the affinity of the enzyme for the substrate was reduced by 60%. In organic medium, all the immobilized derivatives showed similar behavior on both esterification and transesterification reactions attaining esterification activity of 118  $\mu\text{M g}^{-1} \text{min}^{-1}$  and ethyl ester yields of 98.30%. Overall, the results were promising and allowed selecting the organic component  $\beta$ CD to replace, with advantages, the use of PVA for preparing hybrid composites. The lower hydrophilic capacity of this matrix compared with the others matrices can be explained by the cyclic structure of the  $\beta$ CD that reduced the capacity of the  $\text{SiO}_2$ - $\beta$ CD matrix in the glycerol adsorption, the main byproduct of the transesterification reaction. Assays carried out in packed bed reactor running on a continuous basis are propose to confirm the efficiency of this matrix.

**KEYWORDS:** Immobilization. Sol-gel. Lipase. Hybrid materials. Biodiesel.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> – Reações catalisadas por lipases .....	23
<b>Figura 3.2.</b> – Representação da estrutura tridimensional da conformação aberta da lipase de <i>B. cepacia</i> . .....	27
<b>Figura 3.3.</b> – Técnica de adsorção física (a) e ligação covalente (b) para a imobilização de enzimas. ....	29
<b>Figura 3.4.</b> – Técnica de encapsulação para a imobilização de enzima .....	30
<b>Figura 3.5.</b> – Processo e produtos obtidos pela técnica sol-gel .....	31
<b>Figura 3.6.</b> – Processo de formação do PVA .....	34
<b>Figura 3.7.</b> – Esquema de reações envolvidas na preparação da matriz híbrida de SiO <sub>2</sub> -PVA. ....	35
<b>Figura 3.8.</b> – Representação esquemática da β -ciclodextrina.....	36
<b>Figura 3.9.</b> – Representação esquemática das ciclodextrinas .....	37
<b>Figura 3.10.</b> – Esquema das reações envolvidas na preparação da matriz híbrida de SiO <sub>2</sub> -βCD.....	37
<b>Figura 3.11.</b> – Mecanismo de formação da carboximetilcelulose .....	38
<b>Figura 3.12.</b> – Esquema de reações envolvidas na preparação da matriz híbrida de SiO <sub>2</sub> -CMC.....	39
<b>Figura 3.13.</b> – Mecanismo de formação do hidroxietilcelulose.....	40
<b>Figura 3.14.</b> – Esquema de reações envolvidas na preparação da matriz híbrida de SiO <sub>2</sub> -HEC. ....	41
<b>Figura 3.15.</b> – Evolução da produção de biodiesel no mundo entre 2000 a 2012. ....	46
<b>Figura 3.16.</b> – Mecanismo da reação de transesterificação, em que R1, R2 e R3 são as cadeias do ácido graxo, e R4 é o grupo alquil do álcool .....	52
<b>Figura 3.17.</b> – Fluxograma de produção enzimática do biodiesel .....	55
<b>Figura 4.1.</b> – Esquema de síntese, ativação dos suportes híbridos e imobilização da lipase <i>B. cepacia</i> .....	62
<b>Figura 4.2.</b> – Ilustração do aparato experimental utilizado nas reações de etanolise do óleo de palmiste .....	63
<b>Figura 4.3.</b> – Curva padrão do glicerol .....	66
<b>Figura 5.1.</b> – Espectros na região do infravermelho das matrizes híbridas .....	76
<b>Figura 5.2.</b> – Difratometria de Raios X das matrizes híbridas.....	77
<b>Figura 5.3.</b> – Espectros na região do infravermelho da lipase de <i>B.cepacia</i> na forma livre e imobilizada nos suportes híbridos.....	81
<b>Figura 5.4.</b> – Difratometria de Raios X da lipase de <i>B.cepacia</i> imobilizada nos suportes híbridos .....	82
<b>Figura 5.5.</b> – Perfis das curvas de velocidade de reação da lipase <i>B. cepacia</i> livre (a) e dos derivados imobilizados em (b) SiO <sub>2</sub> -βCD, (c) SiO <sub>2</sub> -CMC, (d) SiO <sub>2</sub> -HEC e (e) SiO <sub>2</sub> -PVA. ....	83
<b>Figura 5.6.</b> – Estabilidade térmica da lipase <i>B. cepacia</i> livre e dos derivados imobilizados nos suportes híbridos SiO <sub>2</sub> - βCD, SiO <sub>2</sub> -CMC, SiO <sub>2</sub> -HEC e SiO <sub>2</sub> -PVA.....	85
<b>Figura 5.7.</b> – Perfil do consumo do butanol (●) e ácido butírico (▽) e formação do butirato de butila (○) na reação de esterificação mediada pela lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada nos suportes híbridos: (a) SiO <sub>2</sub> -βCD, (b) SiO <sub>2</sub> -CMC, (c) SiO <sub>2</sub> - HEC, (d) SiO <sub>2</sub> -PVA (40 °C, 180 rpm). ....	87
<b>Figura 5.8.</b> – Perfil de formação dos ésteres de etila a partir da reação de transesterificação do óleo de palmiste com etanol, catalisada pela lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em diferentes suportes híbridos: (a) SiO <sub>2</sub> - βCD, (b) SiO <sub>2</sub> -CMC, (c) SiO <sub>2</sub> -HEC, (d) SiO <sub>2</sub> -PVA.....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1.</b> – Aplicações industriais das lipases .....	25
<b>Tabela 3.2.</b> – Classificação de algumas lipases de acordo com sua especificidade.....	26
<b>Tabela 3.3.</b> – Os dez países com maior potencial mundial de produção de biodiesel. ....	45
<b>Tabela 3.4.</b> – Especificações do biodiesel estabelecidas pela Resolução 14/2012 (ANP). ....	47
<b>Tabela 3.5.</b> – Características das principais culturas oleaginosas no Brasil. ....	48
<b>Tabela 3.6.</b> – Principais países produtores do óleo de palmiste, em 2014.....	49
<b>Tabela 3.7.</b> – Área plantada com palma no Brasil .....	49
<b>Tabela 3.8.</b> – Composição em ácidos graxos do óleo de palmiste.....	50
<b>Tabela 3.9.</b> – Comparação do processo de produção de biodiesel pela rota enzimática e química.....	56
<b>Tabela 3.10.</b> – Trabalhos publicados para a produção enzimática de biodiesel utilizando óleo de palmiste como matéria-prima.....	57
<b>Tabela 4.1.</b> – Principais equipamentos utilizados durante a realização do trabalho.....	60
<b>Tabela 4.2.</b> – Concentrações dos reagentes utilizados na etapa de dosagem do glicerol....	66
<b>Tabela 4.3.</b> – Condições operacionais para quantificação da concentração de butanol e butirato de butila por cromatografia de fase gasosa. ....	69
<b>Tabela 4.4.</b> – Condições de operação para a determinação dos ésteres de etila .....	70
<b>Tabela 5.1.</b> – Rendimentos de sólidos obtidos em todas as etapas envolvidas no preparo dos suportes híbridos .....	74
<b>Tabela 5.2.</b> – Área superficial específica, volume de poros e diâmetro médio de poro para os suportes de SiO <sub>2</sub> -βCD, SiO <sub>2</sub> -CMC, SiO <sub>2</sub> -HEC e SiO <sub>2</sub> -PVA.....	75
<b>Tabela 5.3.</b> – Adsorção de glicerol e porcentagens de recuperação mássica de solução empregando diferentes matrizes híbridas .....	78
<b>Tabela 5.4.</b> – Parâmetros obtidos da imobilização da lipase <i>B. cepacia</i> em diferentes suportes híbridos.....	79
<b>Tabela 5.5.</b> – Área superficial específica, volume de poros e diâmetro médio de poro para a lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada nos suportes híbridos SiO <sub>2</sub> -βCD, SiO <sub>2</sub> -CMC, SiO <sub>2</sub> -HEC e SiO <sub>2</sub> -PVA.....	80
<b>Tabela 5.6.</b> – Parâmetros cinéticos da lipase <i>B. cepacia</i> livre e imobilizada nos diferentes suportes híbridos .....	84
<b>Tabela 5.7.</b> – Estabilidade térmica dos derivados de <i>B. cepacia</i> imobilizados em diferentes tipos de suporte .....	86
<b>Tabela 5.8.</b> – Atividade de esterificação, conversão molar de butanol e produtividade na síntese do butirato de butila mediada por diferentes derivados imobilizados. ....	88
<b>Tabela 5.9.</b> – Perfil dos ésteres de etila nas amostras de biodiesel obtidas por catálise .....	90
<b>Tabela 5.10.</b> – Propriedades das amostras de biodiesel purificadas .....	91

## LISTA DE ABREVIACES

ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
MAG	Monoacilgliceróis
DAG	Diacilgliceróis
TAG	Triacilgliceróis
AGL	cidos graxos livres
PNPB	Programa nacional de produção e uso do biodiesel
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
PVA	Poli (lcoolvinlico)
$\beta$ CD	$\beta$ -ciclodextrina
CMC	Carboximetilcelulose
HEC	Hidroxietilcelulose

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. OBJETIVOS .....	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
3.1. Lipases .....	23
3.1.1. Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> .....	26
3.2. Imobilização de lipases .....	28
3.3. Suportes híbridos utilizados na imobilização de enzimas .....	30
3.3.1. Processo sol-gel .....	31
3.3.2. Suporte híbrido polissiloxano-poli (Álcoolvinílico) (SiO <sub>2</sub> -PVA) .....	33
3.3.3. Suporte híbrido SiO <sub>2</sub> -β-Ciclodextrina (SiO <sub>2</sub> -βCD) .....	36
3.3.4. Suporte híbrido SiO <sub>2</sub> -Carboximetilcelulose (SiO <sub>2</sub> -CMC).....	38
3.3.5. Suporte híbrido SiO <sub>2</sub> -Hidroxietilcelulose (SiO <sub>2</sub> -HEC) .....	40
3.3.6. Utilização de matrizes híbridas como suporte de imobilização da enzima lipase .....	42
3.4. Biodiesel .....	44
3.5. Matérias-primas para a produção de biodiesel .....	48
3.6. Tecnologias de produção de biodiesel .....	51
3.6.1 Transesterificação .....	51
3.6.2. Catálise homogênea e heterogênea .....	53
3.7. Síntese de biodiesel por catálise enzimática .....	54
3.8. Produção de biodiesel a partir do óleo de palmiste .....	56
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	59
4.1. Materiais .....	59
4.1.1. Enzima .....	59
4.1.2. Suportes de imobilização .....	59
4.1.3. Materiais de partida .....	59
4.1.4. Outros reagentes .....	59
4.2. Equipamentos.....	60
4.3. Metodologia Experimental .....	60
4.3.1. Síntese dos suportes híbridos .....	60
4.3.2. Ativação dos suportes híbridos .....	61
4.3.3. Imobilização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> em diferentes tipos de suporte .....	61
4.3.4. Síntese dos ésteres de alquila.....	62
4.3.5. Separação do biocatalisador e purificação do biodiesel .....	63

4.4. Métodos de análise.....	63
4.4.1. Caracterização dos suportes híbridos.....	63
4.4.1.1. Área superficial.....	63
4.4.1.2 Difração de Raios-X (DRX) .....	64
4.4.1.3. Espectroscopia na região do Infravermelho (IV).....	64
4.4.1.4. Testes de adsorção do glicerol dos suportes híbridos .....	65
4.4.1.5. Quantificação de glicerina em meio sintético.....	65
4.4.2. Propriedades dos derivados imobilizados.....	67
4.4.2.1 Dosagem de atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada .....	67
4.4.2.2. Dosagem da umidade dos derivados imobilizados .....	68
4.4.2.3 Estabilidade térmica da lipase livre e dos derivados imobilizados.....	68
4.4.2.4. Determinação dos parâmetros cinéticos da lipase livre e imobilizada .....	68
4.4.2.5. Determinação da atividade de esterificação dos derivados imobilizados.....	68
4.4.3. Caracterização do biodiesel .....	69
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
5.1. Preparo dos suportes híbridos .....	73
5.2. Caracterização dos suportes híbridos preparados .....	74
5.2.1. Análise morfológica dos suportes.....	74
5.2.2. Análise na região do infravermelho dos suportes.....	75
5.2.3. Difração de raios-X dos suportes.....	76
5.2.4. Testes de afinidade do suporte pelo glicerol.....	77
5.3. Caracterização dos derivados imobilizados preparados .....	78
5.3.1. Imobilização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> em diferentes suportes híbridos....	78
5.3.2. Análise morfológica dos derivados imobilizados .....	79
5.3.3. Análise de infravermelho dos derivados imobilizados .....	80
5.3.4. Difração de raios-X dos derivados imobilizados .....	81
5.3.5. Parâmetros cinéticos dos derivados imobilizados .....	82
5.3.6. Estabilidade térmica da lipase de <i>B. cepacia</i> livre e imobilizada nos diferentes tipos de suporte.....	85
5.4. Aplicação das preparações de lipases imobilizadas em meio orgânico.....	86
5.5. Síntese de ésteres de etila por transesterificação .....	88
6. CONCLUSÕES .....	93
REFERÊNCIAS.....	95
APÊNDICES .....	107

## 1. INTRODUÇÃO

O termo biocatálise se refere ao uso da enzima, como biocatalisador, em transformações químicas. Essa utilização de enzimas como biocatalisadores é muito dinâmica e evoluiu expressivamente nos últimos anos. Enzimas apresentam como principais vantagens: alta estabilidade, alta eficiência catalítica, elevada especificidade além de permitir a obtenção de produto com melhor qualidade quando comparado aos obtidos pelos métodos catalíticos. Essas características contribuem para a utilização destes biocatalisadores em diversos segmentos industriais (POLSHETTIWART et al., 2011; TORRELO; HANEFELD; HOLLMANN, 2015).

Dentre os processos químicos industriais, os de maior interesse são aqueles catalisados pelas lipases, que representam 35% das biotransformações realizadas. Esse potencial é destacado por sua versatilidade tanto em processos hidrolíticos quanto em processos de síntese (DE CASTRO et al., 2010; PAQUES; MACEDO, 2006). As lipases apresentam diversas aplicações, podendo, portanto serem utilizadas na indústria de alimentos (modificação de óleos e gorduras) e na síntese de compostos orgânicos (RIBEIRO et al., 2011; ADLERCREUTZ, 2013).

Idealmente os sistemas catalisados por lipases devem ser tratados especificamente de acordo com as condições do meio e generalizações devem ser praticadas com cautela. Os principais obstáculos na aplicação deste processo comparado ao processo tradicional da síntese química são: o alto custo do biocatalisador e baixa estabilidade térmica. Uma maneira de superar essas limitações é protegendo a configuração nativa da enzima por meio de imobilização em suportes sólidos, resultando em efeitos benéficos na sua estabilidade, por meio de interações físico-químicas entre o suporte e as moléculas da enzima (ZANIN; MORAES, 2004; VUJCIC et al., 2011). Essa técnica auxilia também na dispersão homogênea da enzima no meio reacional, sendo essencial para a condução de reações enzimáticas (DE CASTRO et al., 2008).

O termo imobilização se refere à localização ou confinamento da enzima. Essa tecnologia envolve basicamente a escolha de um suporte e de um método de imobilização que resulte num derivado imobilizado ativo e estável. Determinados parâmetros devem ser levados em consideração para a seleção do método de imobilização como a atividade global do derivado imobilizado, características como regeneração do suporte e inativação, os custos do procedimento de imobilização, a toxicidade dos reagentes de imobilização e

as propriedades finais desejadas para o derivado imobilizado (MALCATA et al, 1990; ZANIN; MORAES, 2004; MOHAMAD et al., 2015).

Existe um grande número de suportes disponíveis para aplicações industriais. Esses suportes são escolhidos especificamente para cada processo, tendo como parâmetros de escolha o custo do processo, a especificidade, a biocompatibilidade e a disponibilidade do produto (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015). Os resultados mais eficientes, entretanto, são obtidos por meio da utilização de suportes industrializados, de alto custo e de reagentes para a ativação dos suportes, também de custo elevado. Desta forma, o estudo da imobilização de enzimas em matrizes alternativas aumentou nos últimos anos. Entre os suportes testados merecem destaque a quitina e quitosana (GOMES; PEREIRA; DE CASTRO, 2004; PEREIRA et al., 2001); resíduos agroindustriais como celulignina (PEREZ et al., 2007) e matrizes híbridas de materiais orgânicos e inorgânicos, tais como sílica-poli (Álcoolvinílico) (PAULA et al., 2008; SANTOS et al., 2008b), sílica-quitosana (SIMÕES et al., 2011), sílica-celulose (XIE; YU; SHI, 2009), sílica-carboximetilcelulose (SALAMA et al., 2015), sílica-hidroxietilcelulose (KAPSABELIS; PRESTIDGE, 2000) e sílica- $\beta$ -ciclodextrina (FARAJI; HUSAIN; HELALIZADEH, 2011).

Em função das vantagens oferecidas pelos suportes híbridos que combinam os atributos físico-químicos dos materiais inorgânicos e orgânicos, permitindo a manipulação da hidrofiliabilidade e hidrofobicidade, carga iônica, porosidade e propriedades mecânicas em geral, a matriz sílica-poli (Álcoolvinílico) tem sido utilizada com sucesso em reações de biotransformação com lipases, em regime descontínuo, obtendo produtos de interesse industrial como ésteres aromatizantes (BRUNO et al., 2005), monoacilgliceróis (FREITAS et al., 2009), ésteres de açúcares (PAULA et al., 2008) e biodiesel (CARVALHO et al., 2013).

Apesar deste bom desempenho, limitações foram constatadas nas reações de transesterificação de óleo vegetal com etanol conduzidas em reator de coluna operando em fluxo contínuo (SIMÕES et al., 2015; FIDALGO, 2014), em função da retenção do glicerol formado como subproduto no leito catalítico, o qual é adsorvido sobre o suporte enzimático, ocasionando redução da atividade enzimática. O fenômeno envolvido nesta perda de atividade é atribuído à formação de uma barreira hidrofílica em torno da enzima, resultando em limitações de difusão do substrato hidrofóbico da fase orgânica para a enzima. Desta forma, a redução da hidrofiliabilidade do suporte de imobilização poderá

reduzir a retenção do glicerol no leito catalítico e aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, permitindo a manutenção de uma operação estável do reator por períodos mais longos.

O presente trabalho teve, portanto, como objetivo selecionar componentes orgânicos que pudessem substituir o poli (Álcoolvinílico) na obtenção de compósitos híbridos menos hidrofílicos pela técnica sol-gel, com características semelhantes às da matriz SiO<sub>2</sub>-PVA na imobilização da enzima lipase. O trabalho experimental foi direcionado visando a obtenção de biocatalisadores imobilizados ativos para condução de reações de biotransformações reversíveis, como a produção de ésteres de cadeia curta (butirato de butila) e longa (biodiesel).

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo obter amostras ativas e estáveis de lipase imobilizada em suportes híbridos, tornando possível sua aplicação em biotransformações de compostos de interesse do setor óleo-químico. Levando em consideração estes aspectos, o objetivo global do projeto foi alcançado por meio da execução das seguintes etapas:

- ✓ Preparo de diferentes tipos de suportes híbridos e a caracterização das propriedades texturais e morfológicas e capacidade de adsorção de glicerol
- ✓ Imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* nos suportes preparados e a caracterização dos derivados imobilizados quanto aos parâmetros cinéticos e estabilidade térmica
- ✓ Utilização da lipase de *B. cepacia* imobilizada nos diferentes tipos de suporte para mediar reações em meio orgânico como síntese de ésteres por esterificação e transesterificação.

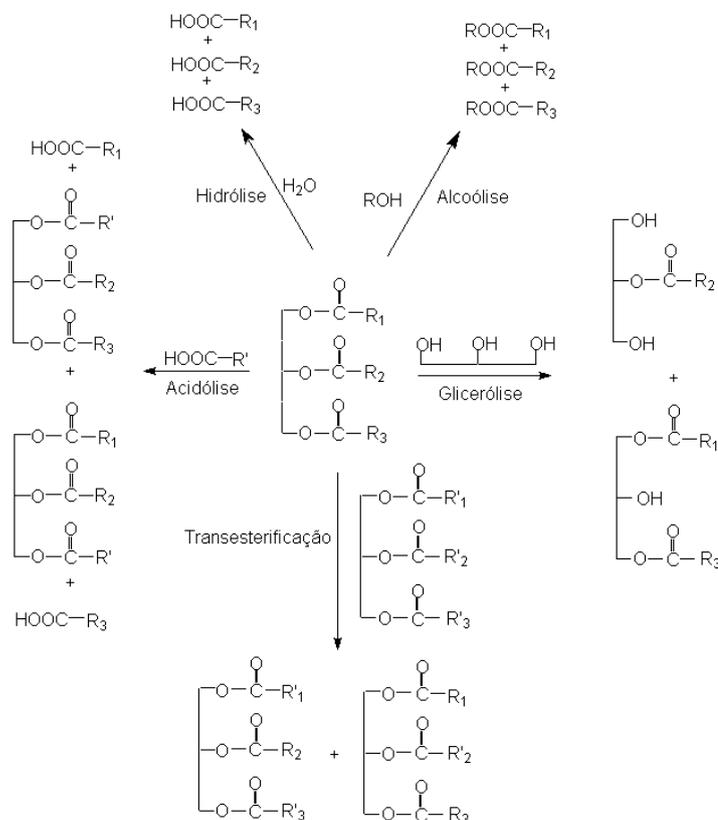
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na revisão bibliográfica são abordados os principais temas relacionados ao trabalho, iniciando com informações sobre lipase, imobilização de enzimas e a utilização dos suportes híbridos na etapa de imobilização, seguindo com a síntese de biodiesel e as matérias-primas envolvidas no processo.

#### 3.1. Lipases

Lipases (glicerol éster hidrolases – E.C. 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações éster, com maior especificidade para triacilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa. Muito embora esta classe de enzima seja conceitualmente hidrolítica, em meio orgânico as lipases catalisam a reação reversa (esterificação). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados, como ilustra a Figura 3.1 (DE CASTRO et al., 2004).

**Figura 3.1.** – Reações catalisadas por lipases



Fonte: DE CASTRO et al., 2004.

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes de tecidos animais, vegetais ou células microbianas. Entretanto, as lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente, por apresentarem procedimentos mais simples de obtenção, serem mais estáveis e terem propriedades bem mais diversificadas que as de outras fontes. Estas enzimas não requerem cofatores, são regioespecíficas, atuam em larga faixa de pH e apresentam a capacidade única de atuar apenas na interface óleo/água (DE CASTRO et al., 2010).

Diferentes fontes de lipase tem a capacidade de catalisar a mesma reação, porém o desempenho pode ser diferente sob as mesmas condições reacionais (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998).

A gama de reações passíveis de serem catalisadas por esta classe de enzimas, aliada à sua boa estabilidade em solventes orgânicos, tornam os lipases excelentes biocatalisadores em estágios intermediários de processos químicos convencionais e na catálise de reações químicas que envolvam substratos insolúveis em meio aquoso. Além disso, as suas características de químio, régio e/ou de estereosseletividade tornam estes biocatalisadores os mais utilizados na síntese orgânica.

A versatilidade das lipases como catalisador é também evidente pelo número de processos em fase de desenvolvimento ou em fase de implantação industrial, entre os quais podem ser destacados: os processos de modificação da estrutura de óleos e gorduras visando à obtenção de produtos enriquecidos com ácidos graxos essenciais, ésteres, emulsificantes, biodiesel e lipídeos estruturados, entre outras aplicações, como listado na Tabela 3.1. Atualmente, o emprego de lipases para mediar a reação de síntese de biodiesel representa um campo de vasta aplicação para estas enzimas (RIBEIRO et al., 2011), sendo essa a aplicação objeto do presente projeto.

**Tabela 3.1.** – Aplicações industriais das lipases

<b>Indústria</b>	<b>Ação</b>	<b>Produto ou aplicação</b>
Detergentes	Hidrólise de gorduras	Remoção de óleos
Derivados de laticínios	Hidrólise da gordura do leite, maturação de queijos, modificações de manteigas	Desenvolvimento de agentes flavorizantes em leite, queijos e manteiga
Panificação	Melhorador de aromas	Prolongar a vida de prateleira
Bebidas	Aromas	Bebidas
Carnes e peixes	Desenvolvimento de sabores	Remoção de gordura, produtos de carnes e peixes
“Health foods”	Transesterificação	Produção de alimentos com apelo nutricional
Gorduras e óleos	Transesterificação/ hidrólise	Manteiga de cacau, ácidos graxos, Monoacilgliceróis, biodiesel
Química	Enantiosseletividade, síntese	Construção de blocos quirais
Farmacêutica	Transesterificação, hidrólise	Lipídeos específicos, digestivos
Cosméticos	Síntese	Emulsificantes, umidificantes
Limpeza	Hidrólise	Remoção de gorduras
Couro	Hidrólise	Produtos de couro

Fonte: Adaptado de SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001.

Com relação à especificidade, a literatura relata que é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, pela estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (DE CASTRO et al, 2010). As lipases podem ser classificadas de acordo com sua especificidade posicional (não específicas ou 1,3-específicas) ou quanto à especificidade por ácidos graxos (Tabela 3.2). Além disso, as lipases podem apresentar ainda especificidade estereoquímica, atuando particularmente sobre um dos isômeros ópticos.

A especificidade pelo substrato consiste na capacidade de distinguir as características estruturais das cadeias dos ácidos graxos, tais como: o comprimento, número, posição ou configuração das duplas ligações, presença de ramificações, bem como

a natureza da cadeia de ácido graxo (ácido graxo, alquil éster ou glicerol éster). Em reações envolvendo triacilgliceróis e álcoois, as lipases distinguem também o tamanho e tipo de álcool empregado na reação (GHAMGUI; KARRA-CHAÂBOUNI; GARGOURI, 2004).

**Tabela 3.2.** – Classificação de algumas lipases de acordo com sua especificidade

Lipase	Atuação	Exemplos
Não específicas	Catalisam a hidrólise do TAG gerando ácidos graxos livres e glicerol, de modo aleatório.	<i>Candida rugosa</i> <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Corynebacterium acnes</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Burkholderia cepacia</i>
1,3-específicas	Catalisam a hidrólise do TAG gerando ácidos graxos livres provenientes especificamente das posições <i>sn</i> -1 e <i>sn</i> -3.	<i>Mucor miehei</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus delemar</i> Lipase pancreática <i>Penicillium roqueforti</i>
Ácido graxo específicas	Catalisam a hidrólise de tipos específicos de ácidos graxos nas moléculas do TAG.	<i>Geotrichum candidum</i>

Fonte: DE CASTRO et al., 2010.

### 3.1.1. Lipase de *Burkholderia cepacia*

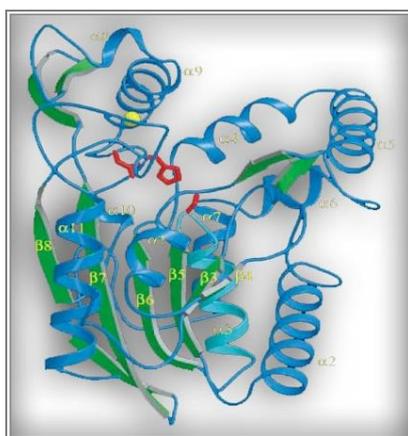
A espécie *Burkholderia cepacia* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica, que apresenta uma temperatura ótima de crescimento entre 30 e 35°C e utiliza mais de 200 compostos como fonte de carbono e energia (PADILHA, 2010). Essas bactérias são produtoras de lipases extracelulares que apresentam como características elevada atividade e estabilidade. Apresentam massa molecular de 33 kDa, estabilidade em solventes orgânicos, estabilidade térmica e em diferentes valores de pH, possuindo um pH ótimo entre 7 e 8. Lipases de *B. cepacia* possuem elevado grau de enantiosseletividade, sendo também utilizada na resolução quiral de racematos, produzindo enantiômeros puros.

Em escala industrial a lipase de *B. cepacia* é manufaturada pela Amano Pharmaceuticals (Japão) em formulações enzimáticas disponíveis tanto na forma solúvel como imobilizada. É obtida por fermentação submersa de uma linhagem selecionada de *B.*

*cepacia*, e posteriormente purificada por precipitação com etanol. Apresenta cerca de 25% de proteína e alguns aditivos ou estabilizantes como dextrinas e  $\text{CaCl}_2$  (AMANO, 2015).

As lipases obtidas dessa fonte microbiana possuem em seu sítio ativo a presença da tríade catalítica formada por resíduos de aminoácidos de serina, histidina e aspartato (JAEGER; REETZ, 1998; AMANO, 2015). As estruturas tridimensionais determinadas por SCHRAG et al. (1997) da conformação aberta da lipase *B. cepacia* são favorecidas pela presença de solventes ou de interface óleo-água. Ao contrário, em condições aquosas a estrutura fechada é favorecida. Estas estruturas indicam que a ativação interfacial resulta de uma mudança conformacional na enzima, pela reorganização da estrutura terciária e de um amplo movimento da tampa hidrofóbica para expor o sítio ativo. A tampa hidrofóbica, por sua vez, tem seu maior contato com o resto da proteína na conformação fechada por interações, quase sempre de van der Waals, da hélice  $\alpha 4$  com a hélice  $\alpha 9$  e as duas fitas  $\beta$  antiparalelas (Figura 3.2), englobando os resíduos 214-228 da molécula (SCHRAG et al., 1997; KIM et al., 1997). As fitas  $\beta$  estão representadas como setas em verde e as hélices em azul. A posição do íon  $\text{Ca}^{2+}$  está indicada em amarelo e os resíduos da tríade catalítica estão mostrados em vermelho.

**Figura 3.2.** – Representação da estrutura tridimensional da conformação aberta da lipase de *B. cepacia*.



Fonte: Adaptado (SCHRAG et al., 1997).

### 3.2. Imobilização de lipases

O mecanismo de atuação das lipases é bastante complexo e dependente de certas estruturas típicas das lipases. Além disso, o teor de água tem um efeito primordial em seu comportamento, afetando diretamente a hidratação da enzima ou indiretamente alterando a natureza do meio de reação (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998). Quando a água é substituída por um solvente orgânico, alterações na conformação nativa da enzima podem ocorrer tanto na estrutura terciária como nas mais proeminentes estruturas secundárias ( $\alpha$ -hélice e a conformação  $\beta$ ) acarretando, desta maneira, a sua desestabilização. Com o objetivo de assegurar uma conformação enzimática cataliticamente ativa em meio orgânico, a molécula de enzima deve ter uma camada de hidratação definida, separando o solvente do contato com a superfície da proteína e contribuindo para o aumento da sua flexibilidade interna (DE CASTRO et al., 2008). Outra maneira de proteger a configuração nativa da enzima é por meio de sua imobilização em suportes sólidos (ZANIN; MORAES, 2004). A imobilização também auxilia na dispersão homogênea da enzima no meio, o que é essencial, para a condução de reações enzimáticas (DE CASTRO et al., 2008). Além disso, a imobilização da enzima tem um efeito benéfico na sua estabilidade térmica, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima, permitindo ainda a recuperação da enzima do meio reacional, para uma posterior reutilização (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998; GUIJÁN, 2006).

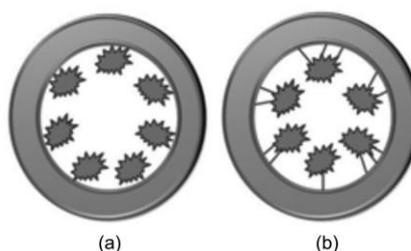
Existe uma grande diversidade de métodos aplicados na técnica de imobilização de enzimas, porém, não há nenhum método que seja aplicável para todas as enzimas. Sendo assim, em cada aplicação de enzima imobilizada é necessário escolher o método mais simples e de menor custo resultando em uma enzima imobilizada contendo elevada estabilidade operacional e uma alta retenção de atividade (ZANIN; MORAES, 2004). A enzima pode ser confinada fisicamente no interior de uma matriz ou ligada ao suporte sólido. O método de imobilização pode ser classificado quanto ao tipo de interação que é responsável pela ligação entre a enzima e o suporte, como meios químicos ou físicos. Os métodos para a imobilização de enzimas podem ser divididos em três categorias: adsorção física num suporte, ligação covalente em um suporte e encapsulamento (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015), como ilustrado nas Figuras 3.3 e 3.4.

A adsorção física é um dos métodos mais simples e mais utilizados para imobilizar enzimas, não alterando facilmente o seu sítio ativo. A enzima é imobilizada em um suporte

sólido por ligações de baixa energia, tais como ligações de hidrogênio, hidrofóbicas e ligação de van der Waals. Vários materiais podem ser usados nesta técnica e a escolha de cada um deles irá depender das suas propriedades, como por exemplo, a força mecânica, a estabilidade física e química, o caráter hidrofóbico/hidrofílico, a capacidade de adsorção de enzima e o custo (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

A ligação covalente é um método que envolve a modificação química de um resíduo de aminoácido na superfície do suporte por meio da utilização de agentes bifuncionais para imobilização eficiente e irreversível da enzima. Isso ocorre por meio da formação de uma ligação covalente da enzima com um material insolúvel em água, pela fixação da enzima em uma matriz por ligação covalente ou pela formação de ligações cruzadas numa matriz (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

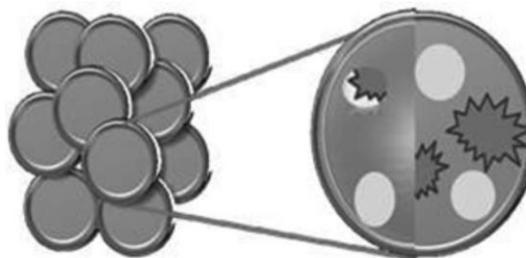
**Figura 3.3.** –Técnica de adsorção física (a) e ligação covalente (b) para a imobilização de enzimas.



Fonte: Adaptado (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

A imobilização via encapsulação baseia-se no “confinamento” da enzima em meio semipermeável reticulado ou microcápsula. Os meios poliméricos reticulados devem ter poros pequenos o suficiente para não permitir a passagem das enzimas, mas oferecer passagem livre aos substratos e produtos. Isso permite que as enzimas permaneçam na solução, mas que fiquem protegidas de efeitos externos. Apesar da vantagem de não ocorrência de alteração estrutural da enzima, esse método pode não ser aplicável em alguns casos, por exemplo, se o substrato da enzima for grande e não passar pelos poros do suporte (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

**Figura 3.4.** –Técnica de encapsulação para a imobilização de enzima



Fonte: Adaptado (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

### 3.3. Suportes híbridos utilizados na imobilização de enzimas

O suporte a ser escolhido para a etapa de imobilização de enzimas é responsável por uma boa contribuição no desempenho desta enzima. Um suporte escolhido minuciosamente pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, enquanto que uma escolha equivocada pode afetar o desempenho global do processo (ZANIN, MORAES, 2004).

Para selecionar um suporte deve-se ter conhecimento de suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de reutilização do material. As características mais importantes a serem observadas na seleção de um suporte são: permeabilidade, insolubilidade, área superficial, capacidade de regeneração, natureza hidrofóbica ou hidrofílica, morfologia e composição, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo. Estes suportes podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, e também de acordo com a sua morfologia, podendo ser materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel (ZANIN; MORAES, 2004).

Vários trabalhos são encontrados na literatura que tratam das diferentes técnicas de imobilização de lipases, caracterização dos complexos ativados e aplicações em reações que se processam em meio aquoso ou não aquoso (SCHMID et al., 2002; SALIS; MONDUZZI; SOLINAS, 2007). Entretanto, as mais recentes tecnologias de imobilização de enzimas requerem materiais com propriedades multifuncionais que não são encontradas nos materiais convencionais. Materiais híbridos orgânico-inorgânico constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações. Esses materiais apresentam como vantagens o fato de serem acessíveis e reutilizáveis. A síntese desses materiais híbridos pode ser alcançada por modificação da estrutura inorgânica com os componentes orgânicos, obtendo um sistema que consegue

combinar a durabilidade e a estabilidade inorgânica com a plasticidade e as propriedades específicas normalmente associadas aos materiais orgânicos.

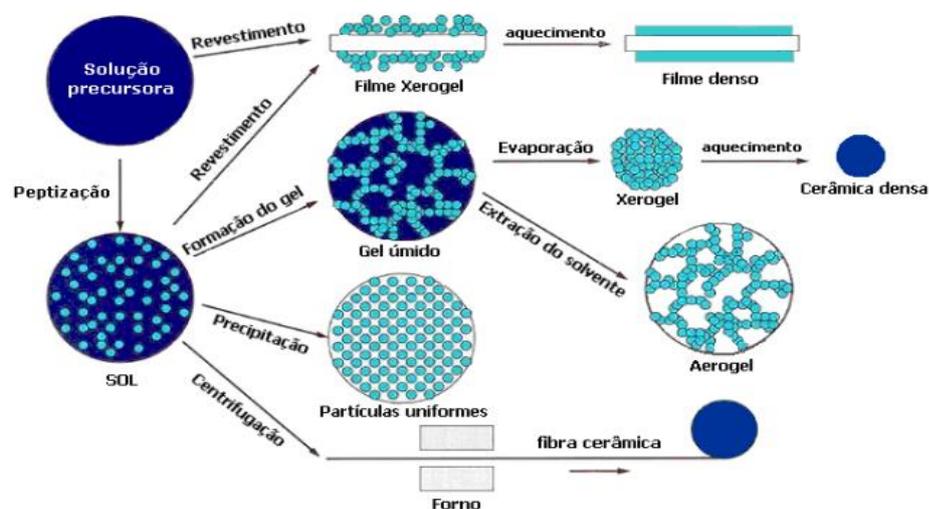
Dentre os materiais híbridos orgânico-inorgânicos podem ser citados os biocompósitos que são produzidos por meio da biomineralização natural. Nestes materiais, os minerais inorgânicos são depositados e crescem *in situ* na matriz polimérica orgânica em condições moderadas, que controlam o processo de biomineralização envolvendo as etapas de nucleação, seleção polimorfa, direção do crescimento cristalino e orientação cristalográfica dos minerais.

Um sistema usado para estudar a deposição dos minerais inorgânicos *in situ* em uma matriz polimérica orgânica é o processo sol-gel, sendo este, o mais empregado. Os materiais de partida utilizados no processo sol-gel incluem alcóxidos metálicos,  $\text{Me}(\text{OR})_n$ , e uma pequena porção de ácidos ou bases como catalisador (JOSÉ; PRADO, 2005; TODOROVA; CHERNEV; DJAMBAZOV, 2014; YANO; IWATA; KURITA, 1998).

### 3.3.1. Processo sol-gel

A técnica sol-gel pode ser definida como uma rota de preparação de um material inorgânico, a partir de reações de precursores moleculares em solução resultando materiais com novas características, apresentando como vantagens baixo custo, fácil preparação e equipamentos acessíveis (TODOROVA; CHERNEV; DJAMBAZOV, 2014). A Figura 3.5 mostra um esquema de obtenção destes materiais pela técnica sol-gel.

**Figura 3.5.** – Processo e produtos obtidos pela técnica sol-gel



Fonte: Adaptado (MAURITZ, 1998).

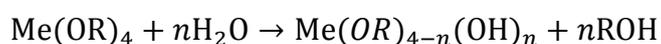
O processo sol-gel envolve o controle de muitas variáveis, tais como o tempo, a temperatura da reação, a concentração dos reagentes, a natureza do catalisador, o iniciador da reação de polimerização (HCl, HBr, HF, NH<sub>4</sub>OH). Essas variáveis determinam as características finais do material, incluindo a densidade de reticulação, homogeneidade do produto, porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos. Além disso, podem-se utilizar aditivos químicos (polietilenoglicol (PEG), poli (Ácoolvinílico) (PVA), líquidos iônicos e albumina) com a finalidade de melhorar o rendimento do processo e obter materiais com melhores propriedades estruturais refletindo em melhor estabilidade térmica e química da enzima, possibilitando assim, modificações no controle de porosidade, nas propriedades mecânicas e um ajuste no balanço hidrofílico/hidrofóbico (PAULA et al., 2007; FICANHA et al., 2015). Como o processo sol-gel ocorre em condições amenas de temperatura e pressão atmosférica, polímeros orgânicos instáveis termicamente podem ser incorporados com materiais inorgânicos para a obtenção de híbridos orgânico-inorgânicos (YANO; IWATA; KURITA, 1998).

Vários compostos orgânicos podem ser empregados na síntese destas matrizes, porém os biopolímeros são considerados como os mais promissores por possuírem baixo custo, biocompatibilidade, baixa toxicidade e propriedades multifuncionais (SMITHA et al., 2008). Os precursores mais comumente utilizados são os silicatos, entre os quais, o mais estudado é o tetraetilortossilicato (TEOS) (JOSÉ; PRADO, 2005).

Os silicatos são componentes inorgânicos que podem ser facilmente transformados, por meio de um precursor, em monólitos, matrizes porosas, filmes ou película para revestimentos. Esses materiais apresentam uma alta elasticidade térmica e podem suportar elevadas pressões assim como a habilidade de suportar meios e materiais externos agressivos (TODOROVA; CHERNEV; DJAMBAZOV, 2014).

A química da técnica sol-gel tem como base reações de polimerização inorgânica, sendo um processo relativamente simples envolvendo uma reação composta por três etapas (INGERSOLL; BRIGHT, 1997; YANO; IWATA; KURITA, 1998).

Na primeira etapa, tem-se a hidrólise de um alcóxido, podendo este ser um metal ou um semi-metal levando assim a formação do produto hidroxilado e do álcool correspondente, conforme mostrado na reação 3.1:



**3.1**

Em que:

Me = Na, Ba, Cu, Al, Si, Ti, Ge, V, W, Y;

R = CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>C<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>,..., C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>.

Na segunda etapa, ocorre uma condensação entre um grupo não hidrolisado pertencente ao alcóxido e um grupo hidroxila, ou entre dois grupos de hidroxila, gerando uma formação de uma mistura coloidal, conhecida como sol, conforme mostrado nas reações 3.2 e 3.3:



Na terceira etapa, ocorre a policondensação dos colóides, acompanhados por uma reticulação, formando assim uma rede tridimensional vítrea e porosa (AVNIR et al., 2006; NOUREDDINI; GAO, 2007).

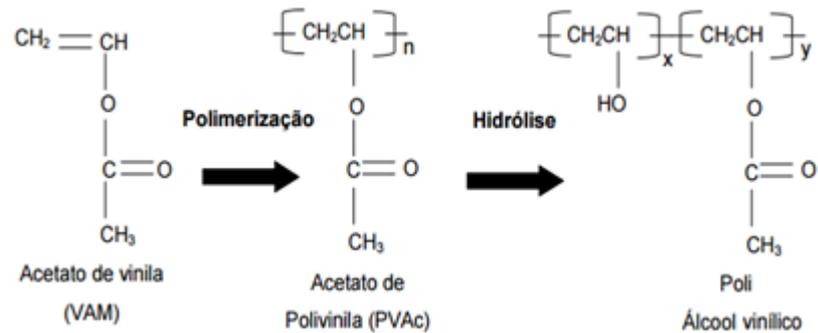
A biocompatibilidade de precursores silanos como o TEOS, com diferentes biopolímeros tais como quitosana (SIMÕES et al., 2011; SILVA et al., 2011b), celulose (XIE; YU; SHI, 2009), poli (Álcoolvinílico) (PAULA et al., 2008; SANTOS et al., 2008b) e carragenana (SHCHIPUNOV, 2003) é amplamente reportada na literatura.

Para o desenvolvimento deste trabalho foram selecionados três compostos orgânicos: β-ciclodextrina (βCD); carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC) para formação do suporte híbrido. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles reportados utilizando poli (Álcoolvinílico) como componente orgânico.

### 3.3.2. Suporte híbrido polissiloxano-poli (Álcoolvinílico) (SiO<sub>2</sub>-PVA)

O poli (Álcoolvinílico) (PVA) possui uma estrutura química relativamente simples com grupos de hidroxilas nas laterais. O monômero, álcool vinílico, não existe em uma forma estável sendo rearranjado para o seu tautômero, acetaldeído. Sendo assim, o PVA é produzido por polimerização do acetato vinílico para acetato polivinílico (PVAc), seguido da hidrólise do PVAc em PVA, conforme esquematizado na Figura 3.6 (HASSAN; PEPPAS, 2000).

**Figura 3.6.** – Processo de formação do PVA



Fonte: Adaptado de HASSAN; PEPPAS, 2000.

O PVA é um dos polímeros mais utilizados devido as suas excelentes propriedades mecânicas. Sua solubilidade em água irá depender do grau de hidrólise e de polimerização. Usualmente o PVA com um grau de hidrólise igual ou maior a 98,5% pode ser dissolvido em água a 70°C, sendo esta, a prática mais comum no preparo desta solução (WANG; TURHAN; GUNASEKARAN, 2004).

O suporte de polissiloxano-poli (Álcoolvinílico) ( $\text{SiO}_2$ -PVA) é uma matriz híbrida obtida pela técnica sol-gel, a partir do componente de tetraetilortossilicato (TEOS) e poli (Álcoolvinílico) (PVA). A reação de polimerização sol-gel para a formação da matriz de  $\text{SiO}_2$ -PVA pode ser dividida em três etapas como mostra a Figura 3.7 (SANTOS et al., 2008a).



*Burkholderia cepacia* (FREITAS et al., 2009), *Rhizopus oryzae* (PAULA et al., 2010) e *Penicillium camembertii* (FREITAS et al., 2010; MENDES et al., 2011).

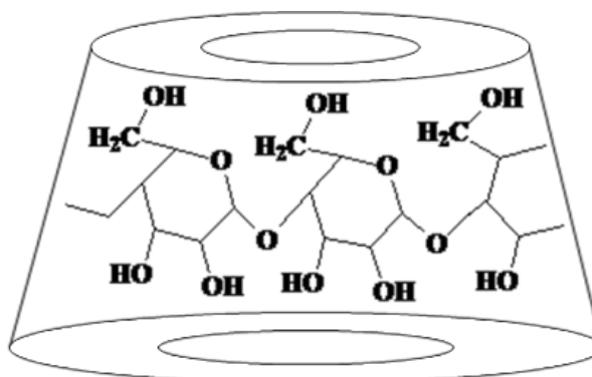
### 3.3.3. Suporte híbrido SiO<sub>2</sub>-β-Ciclodextrina (SiO<sub>2</sub>-βCD)

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, podendo ser constituídos por um número variável de unidades de glicose, que são obtidos pela ação da enzima ciclodextrina-α-glicosiltransferase (CGTase), sobre o amido (SZEJTLI, 1994). As ciclodextrinas mais comuns apresentam entre seis e oito unidades de D (+)-glicopiranosose unidas por ligações α (1,4) e são denominadas de α-(6 unidades), β-(7 unidades) e γ-(8 unidades) ciclodextrinas (OZMEN; SEZGIN; YILMAZ, 2009).

Para a obtenção das ciclodextrinas naturais, é necessário adotar uma série de etapas, iniciando pelo cultivo do microrganismo que irá produzir a CGTase, seguida da separação e purificação da enzima obtida. A enzima CGTase obtida promove a degradação enzimática do amido fornecendo uma mistura de dextrinas e por fim a separação, purificação e cristalização das ciclodextrinas (SALTÃO; VEIGA, 2001). As Figuras 3.8 e 3.9 mostram a estrutura tronco-cônica e molecular das ciclodextrinas.

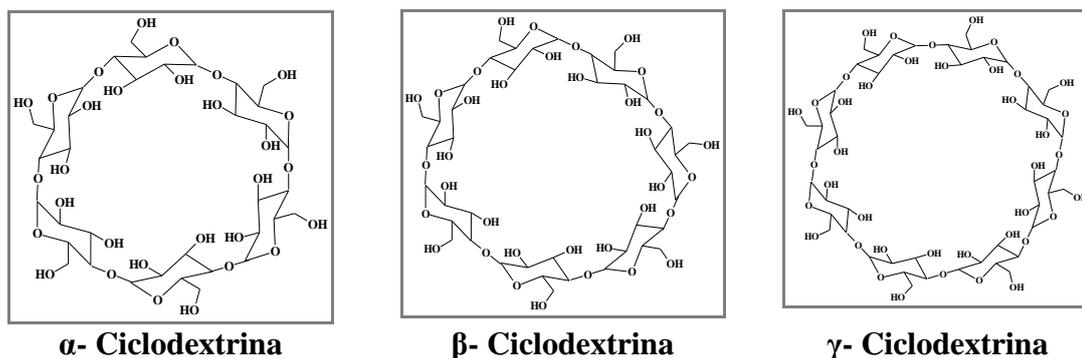
Dentre as características mais importantes das ciclodextrinas, podem ser citadas a presença de uma cavidade que irá permitir a formação de complexos de inclusão. Com isto, pode-se alterar a solubilidade de fármacos, aumentar a estabilidade, modelar a velocidade de dissolução e proteger as mucosas da irritação causada por determinados fármacos (SALTÃO; VEIGA, 2001).

**Figura 3.8.** – Representação esquemática da β -ciclodextrina



Fonte: Adaptado (SZEJTLI, 1990).

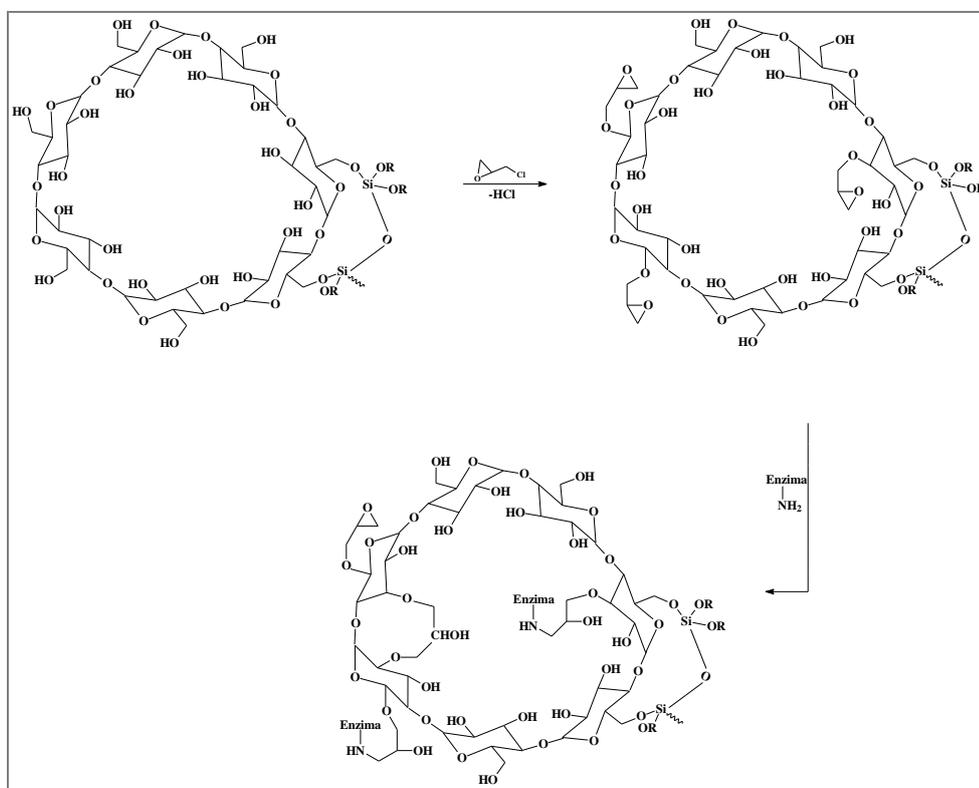
**Figura 3.9.** – Representação esquemática das ciclodextrinas



Fonte: Adaptado (OZMEN; SEZGIN; YILMAZ, 2009).

O suporte de  $\text{SiO}_2$ - $\beta$ CD é uma matriz híbrida, obtida pela técnica sol-gel, a partir do componente de tetraetilortossilicato (TEOS) e  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD). A reação de polimerização sol-gel para a formação da matriz de  $\text{SiO}_2$ - $\beta$ CD é esquematizada na Figura 3.10, tomando por base o mecanismo sugerido por TEIXEIRA, 2011.

**Figura 3.10.** – Esquema das reações envolvidas na preparação da matriz híbrida de  $\text{SiO}_2$ - $\beta$ CD.



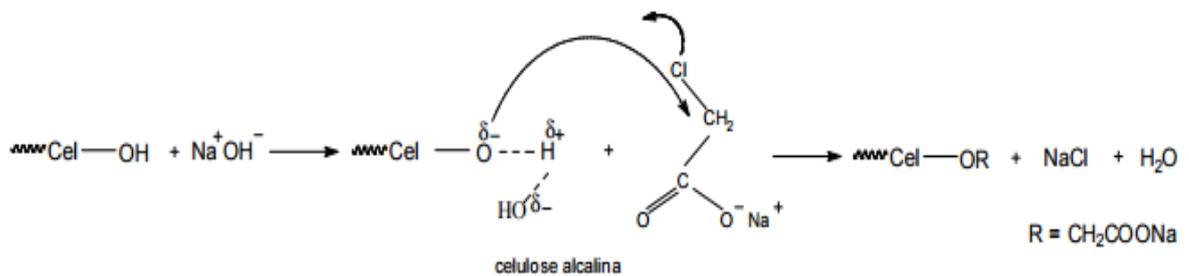
Fonte: Adaptado (TEIXEIRA, 2011).

### 3.3.4. Suporte híbrido SiO<sub>2</sub>-Carboximetilcelulose (SiO<sub>2</sub>-CMC)

A celulose é usualmente convertida em derivados por esterificação. Entre esses derivados, a carboximetilcelulose (CMC), um biopolímero aniônico, é normalmente comercializado como sal de sódio. É incolor, inodoro, atóxico e em função de seu baixo custo é considerado o mais importante derivado da celulose solúvel em água (BONO et al., 2009; SILVA et al., 2011a).

Existem duas principais reações para converter a celulose em carboximetilcelulose: o primeiro procedimento é a reação de alcalinização entre a celulose e a soda cáustica formando o álcali de celulose e a segunda reação é seguida por carboximetilação, que é a reação entre o álcali com o ácido monocloraacético (SAPUTRA; QADHAYNA; PITALOKA, 2014). A Figura 3.11 ilustra o esquema de formação da carboximetilcelulose.

**Figura 3.11.** – Mecanismo de formação da carboximetilcelulose



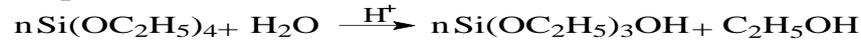
Fonte: Adaptado (CERRUTTI; FROLLINI, 2009).

A CMC pode ser encontrada de várias maneiras, dependendo do grau de substituição, do tamanho das partículas, viscosidade e características de hidratação, apresentando estabilidade em pH ácido. Esse composto apresenta diversas aplicações, como por exemplo, na indústria alimentícia, de cosméticos, farmacêutica e na fabricação de detergentes (BONO et al., 2009; SILVA et al., 2011a).

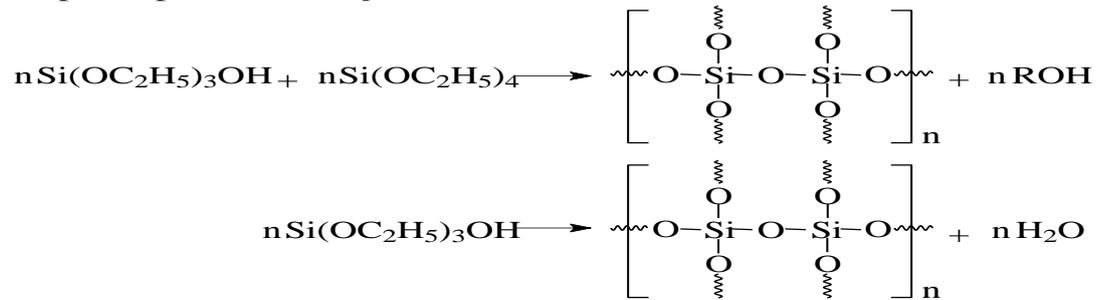
O suporte de SiO<sub>2</sub>-CMC é uma matriz híbrida, obtida pela técnica sol-gel, a partir do componente de tetraetilortossilicato (TEOS) e carboximetilcelulose (CMC). O mecanismo da reação de polimerização sol-gel para a formação da matriz de SiO<sub>2</sub>-CMC é proposto conforme esquematizado na Figura 3.12, tomando por base o mecanismo adotado para formação do híbrido TEOS/ quitosana (SILVA et al., 2011b).

**Figura 3.12.** – Esquema de reações envolvidas na preparação da matriz híbrida de SiO<sub>2</sub>-CMC.

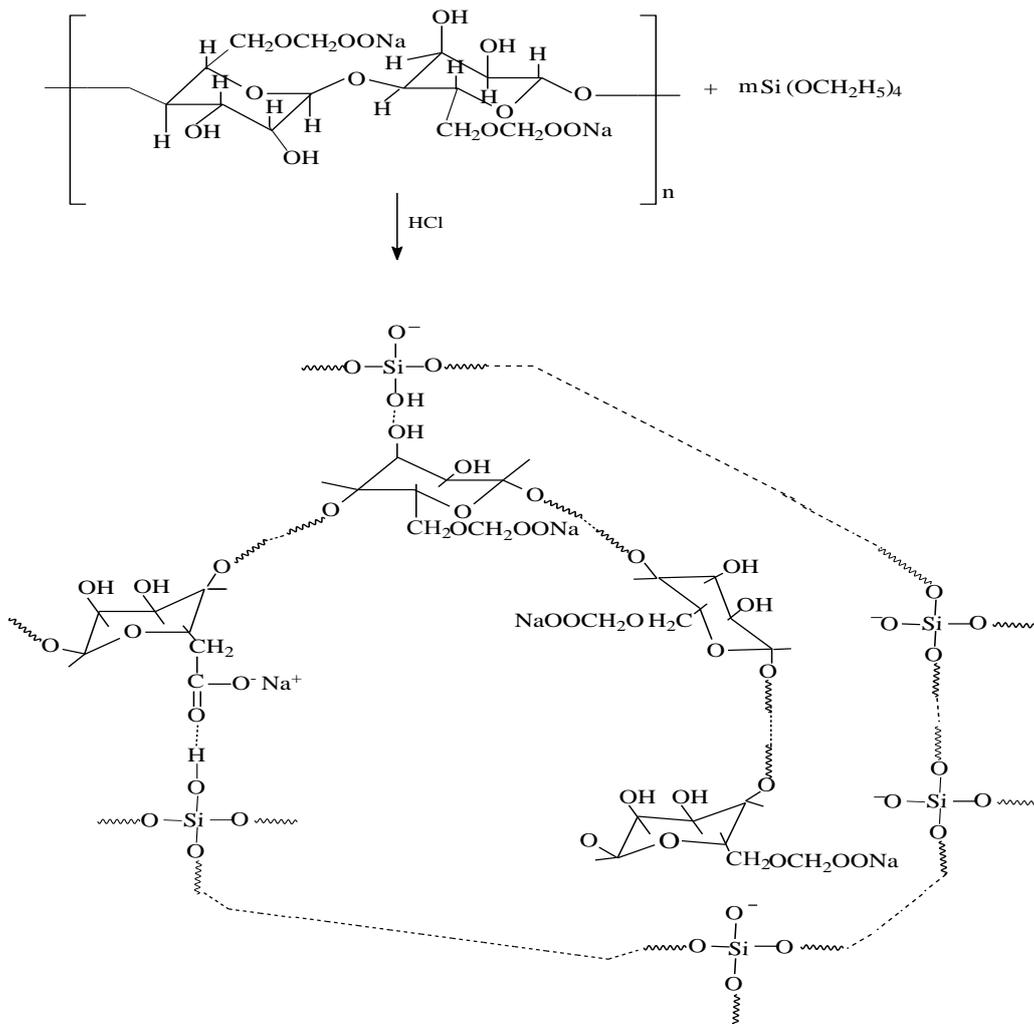
Etapa 1 - hidrólise



Etapa 2 - policondensação



Etapa 3 – Formação da matriz híbrida de SiO<sub>2</sub>-CMC



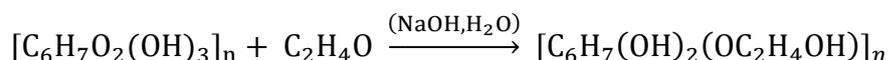
Fonte: Adaptado (SILVA et al., 2011b).

### 3.3.5. Suporte híbrido SiO<sub>2</sub>-Hidroxiethylcelulose (SiO<sub>2</sub>-HEC)

A hidroxietilcelulose (HEC) assim como a carboximetilcelulose (CMC), é um dos muitos derivados da celulose. A HEC é um polímero solúvel em água e não iônico. Apresenta como características a capacidade de suspender, espessar, emulsificar, aglutinar, estabilizar, formar películas, de dispersar e de reter a água (MACHADO et al., 2009).

Existem duas reações para a conversão da celulose em hidroxietilcelulose (HEC). Primeiro ocorre à alcalinização da celulose, sendo esta intumescida com hidróxido de sódio e gerando a álcali celulose, esta então reage com o óxido de etileno gerando assim o éster de HEC. Neste processo os átomos de hidrogênio pertencentes aos grupos hidroxilas da molécula da celulose são substituídos por grupos hidroxietil, conferindo a nova molécula, a solubilidade em água (MACHADO et al., 2009). A Figura 3.13 mostra a formação do composto de hidroxietilcelulose.

**Figura 3.13.** – Mecanismo de formação do hidroxietilcelulose



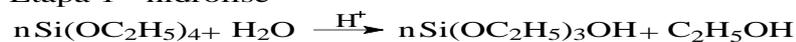
Fonte: Adaptado (GLOOR; MAHLMAN; ULLRICH, 1950).

A HEC apresenta várias aplicações industriais, sendo utilizada principalmente na indústria farmacêutica, podendo ser utilizado também como agente espessante na área da oftalmologia, sendo usado em preparações de lente de contato. Também pode ser usada como agente revestimento de película na confecção dos tablets (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

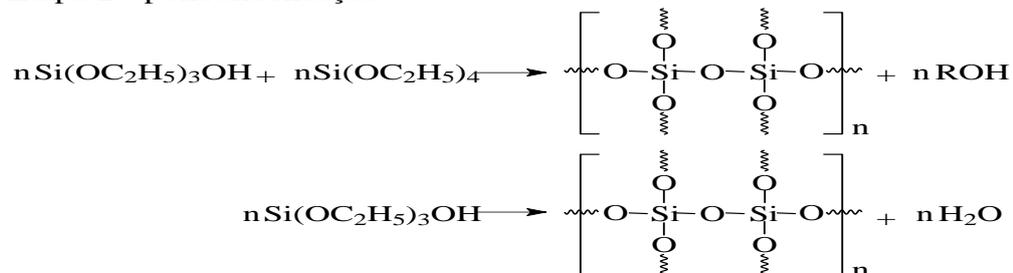
O suporte de SiO<sub>2</sub>-HEC é uma matriz híbrida, obtida pela técnica sol-gel, a partir do componente de tetraetilortossilicato (TEOS) e hidroxietilcelulose (HEC). A reação de polimerização sol-gel para a formação da matriz de SiO<sub>2</sub>-HEC é esquematizada na Figura 3.14, tomando por base o mecanismo proposto para formação do híbrido TEOS/ quitosana (SILVA et al., 2011b).

**Figura 3.14.** – Esquema de reações envolvidas na preparação da matriz híbrida de SiO<sub>2</sub>-HEC.

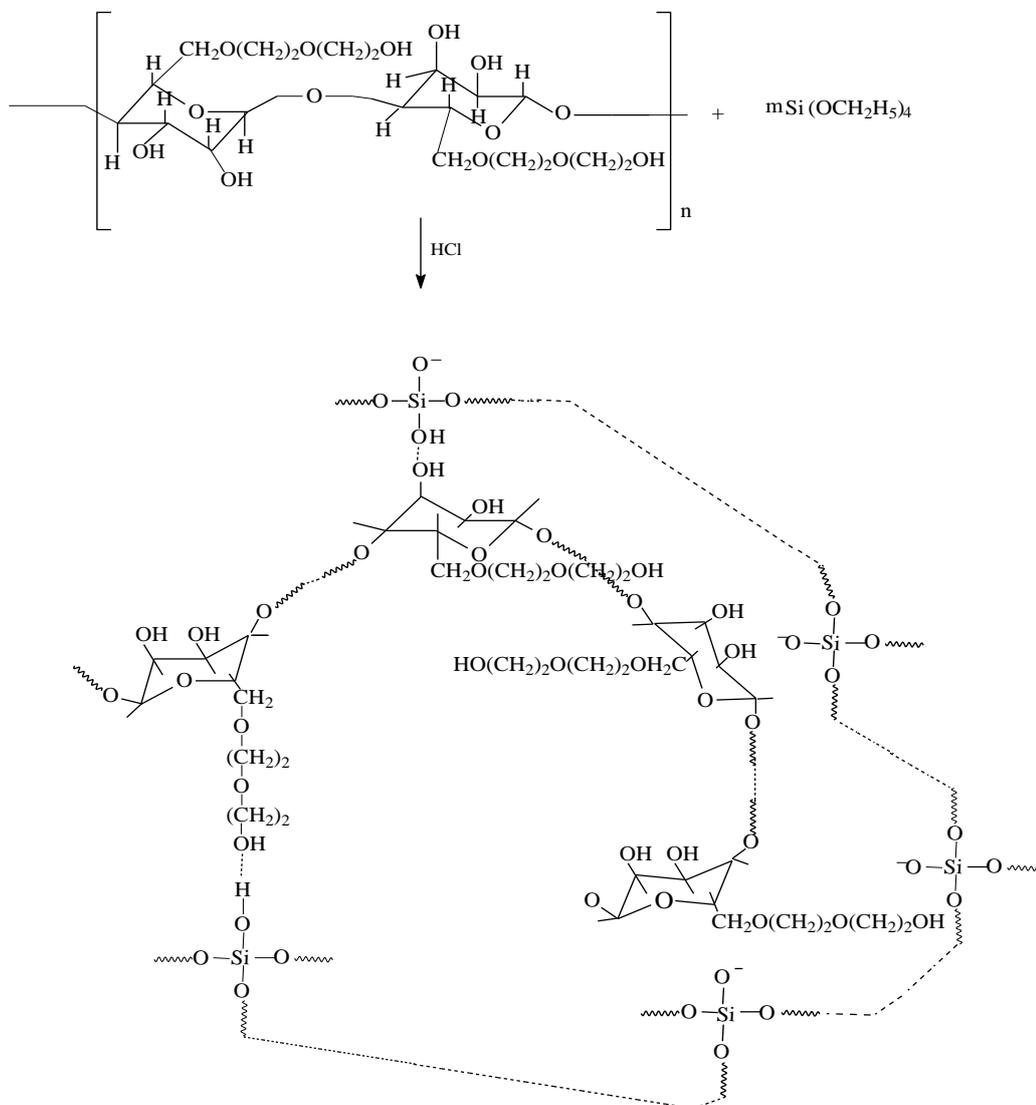
Etapa 1 - hidrólise



Etapa 2 - policondensação



Etapa 3 – Formação da matriz híbrida de SiO<sub>2</sub>-HEC



Fonte: Adaptado (SILVA et al., 2011b).

### 3.3.6. Utilização de matrizes híbridas como suporte de imobilização da enzima lipase

A matriz de polissiloxano-poli (Álcoolvinílico) ( $\text{SiO}_2$ -PVA) tem sido amplamente investigada como suporte de imobilização de diferentes enzimas, em particular da enzima lipase. Os trabalhos desenvolvidos abrangem testes de modificação da estrutura da matriz com diversos agentes de ativação como glutaraldeído (PAULA et al, 2008), epícloridrina (SANTOS et al, 2008a) e metaperiodato (PAULA et al, 2010). As propriedades estruturais e morfológicas dessa matriz também já foram comprovadas nos testes referentes a eficiência de imobilização de diferentes fontes de lipase, tais como *Candida rugosa* (PAULA et al, 2007), lipase de pâncreas de porco (PAULA et al, 2007), lipases bacterianas como *Pseudomonas fluorescens* (MOREIRA, 2007) e *Burkholderia cepacia* (FREITAS et al, 2009; DA RÓS et al, 2010), lipases fúngicas como *Penicillium camberteti* (FREITAS et al, 2010) e *Rhizopus orizae* (PAULA et al, 2010), resultando em derivados imobilizados com elevada atividade catalítica para mediar reações típicas da lipase em regime descontínuo, incluindo etanólise e glicerólise de óleos vegetais (FREITAS et al, 2009), esterificação de carboidratos (RUFINO et al, 2010) e interesterificação da gordura do leite com óleos vegetais (PAULA et al, 2010).

Apesar deste bom desempenho, limitações foram constatadas quando os derivados imobilizados em suporte  $\text{SiO}_2$ -PVA foram usados para mediar reações de transesterificação de óleo vegetal com etanol em reator de leito operando em fluxo contínuo. Nesse tipo de processo, principalmente quando o reator esteve operando em baixa vazão de substrato, foi verificado que o glicerol formado como subproduto foi incorporado ao biocatalisador imobilizado, diminuindo o coeficiente de partição entre o substrato e a superfície da lipase, ocasionando redução da atividade enzimática. O fenômeno envolvido nesta perda de atividade é atribuído à formação de uma barreira hidrofílica em torno da lipase, resultando em limitações de difusão do substrato hidrofóbico da fase orgânica para a enzima. Para contornar essas limitações diferentes estratégias já foram pesquisadas (DORS et al, 2012; COSTA-SILVA, 2013).

Dors et al (2012) avaliaram a produção de biodiesel por meio da reação de transesterificação do óleo de palma com etanol utilizando como biocatalisador lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em  $\text{SiO}_2$ -PVA. Para reduzir a afinidade do suporte pelo glicerol, o reator foi alimentado com substrato (óleo de palma e etanol, razão molar 1:9) na presença de solvente (terc-butanol) ou emulsificante (Triton 100X). A utilização de

terc-butanol como solvente (30% em relação ao meio reacional) mostrou ser a estratégia mais adequada para aumentar a formação dos ésteres de etila. Este melhor desempenho foi atribuído não apenas a miscibilidade dos materiais de partida (óleo e etanol), mas também às propriedades específicas do terc-butanol, que por ser um solvente polar moderado foi capaz de dissolver os produtos formados (ésteres de etila) e subproduto liberado (glicerol). Isso permitiu manter estável a operação do reator em relação à concentração do éster sob condição de estado estacionário por até 10 dias, minimizando a diminuição da concentração do produto, como resultado da perda de atividade da enzima.

Apesar da eficiência dessa técnica, o uso de solventes reduz a produtividade global do sistema e aumentou o custo do processo, pois requer temperaturas mais elevadas para recuperação do terc-butanol.

Costa-Silva, 2013 investigou uma estratégia diferente para reduzir a adsorção do glicerol no sistema imobilizado (*B. cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA) em processos de transesterificação em reator de leito fixo operando fluxo contínuo. Para tanto, adotou a incorporação de uma coluna extratora de glicerol em reator de leito fixo em dois estágios operando com substrato de óleo de coco e etanol (razão molar 1:12) na ausência de solvente. A coluna extratora de glicerol foi recheada com a resina catiônica Lewatit GF 202, especialmente desenvolvida para a purificação do biodiesel removendo glicerol, monoglicerídeos, sais e sabão. O sistema forneceu concentração em ésteres de etila na faixa de  $58,10 \pm 2,08$  (g g<sup>-1</sup>), correspondendo a rendimentos médios de transesterificação de  $98 \pm 3,45$  e produtividade na faixa de  $41,54 \pm 1,51$  mg<sub>éster</sub> g<sup>-1</sup><sub>meio</sub> h<sup>-1</sup>. As amostras de biodiesel de óleo de coco purificadas apresentaram viscosidade cinemática média a 40°C de  $5,32 \pm 0,74$  mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, valor que atende a norma americana ASTM (D6751) e a brasileira pela resolução ANP n°42/04. A lipase apresentou tempos de meia-vida superior a 500 h, demonstrando satisfatória estabilidade operacional. O emprego de uma configuração de reatores de leito fixo em série pode elevar os níveis de rendimento de transesterificação, aumentar a produtividade de biodiesel, por consequência reduzir o custo global do processo. Os resultados obtidos demonstram a viabilidade técnica da síntese enzimática de biodiesel em reatores de leito fixo conectados em série, incorporando uma coluna extratora de glicerol.

Desta forma, verifica-se que a elevada afinidade do glicerol pelo suporte de imobilização SiO<sub>2</sub>-PVA é uma limitação para se obter uma operação estável em reatores de leito operando em fluxo contínuo. A substituição do PVA por molécula orgânica com

menor poder hidrofílico poderá amenizar as limitações difusionais e a inativação da lipase imobilizada no leito catalítico e permitir o alcance de elevadas taxas de conversão por um maior período de tempo.

Entre os compostos orgânicos propostos para desenvolvimento neste trabalho, apenas a  $\beta$ -Ciclodextrina já foi explorada para obtenção do híbrido  $\text{SiO}_2$ - $\beta$ -Ciclodextrina ( $\text{SiO}_2$ - $\beta$ CD) e utilizada como suporte para imobilizar a lipase *B. cepacia* (TEIXEIRA, 2011). A eficiência do biocatalisador foi testada com sucesso na síntese de biodiesel a partir do óleo de babaçu em processo descontínuo.

### 3.4. Biodiesel

Problemas ambientais e aumento de custos associados aos combustíveis fósseis vêm estimulando a investigação de fontes alternativas de energia, como aquelas de origem renovável. Os biocombustíveis, que utilizam biomassa para a sua produção, como óleos vegetais, são um exemplo da categoria. Porém, óleos vegetais não podem ser diretamente queimados em motores diesel modernos, devido à elevada viscosidade, densidade, massa molecular e gravidade específica. Assim, são necessárias modificações químicas para uso desses materiais, com a conversão de triglicerídeos em ésteres alquílicos de ácidos graxos, componentes do biodiesel (DUPONT et al., 2009; SHAHID; JAMAL, 2011).

A produção de biodiesel conta com uma ampla variedade de óleos vegetais, comestíveis ou não comestíveis, com diferentes composições em ácidos graxos. Óleos comestíveis, como os de canola, de soja, de girassol e de milho têm sido utilizados para a síntese de biodiesel, alcançando perfis favoráveis para substituição parcial ou total do diesel mineral. Óleos extraídos de fontes vegetais não comestíveis, a exemplo do pinhão-mansão, vêm sendo considerados igualmente adequados (KOH; MOHD-GHAZI, 2011).

O biodiesel é interessante por várias razões, como toxicidade mínima e alta biodegradabilidade, podendo substituir o petrodiesel em diversas aplicações, tais como motores de combustão interna e caldeiras, sem grandes modificações. Contém vantagens como a diminuição da produção de material particulado e de emissões de monóxido de carbono, dado que sua combustão é menos incompleta. Seu teor de enxofre é mínimo se comparado ao diesel mineral e uma propriedade lubrificante mais acentuada que o combustível de origem fóssil é também notada. A Tabela 3.3 lista os países com maior potencial de produção de biodiesel (ATABANI et al., 2012).

**Tabela 3.3.** – Os dez países com maior potencial mundial de produção de biodiesel.

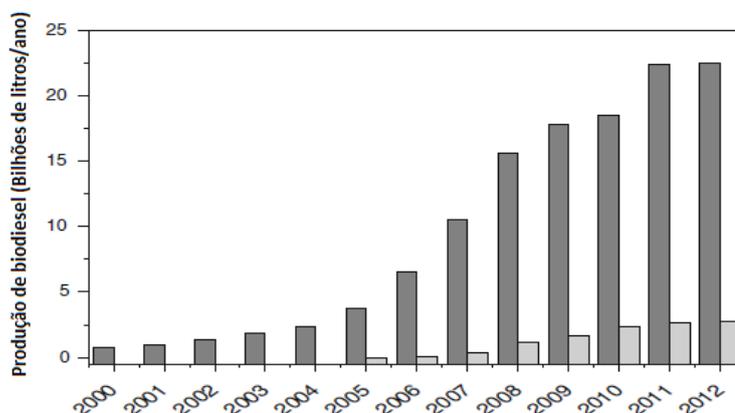
Colocação	País	Potencial para produção de biodiesel (L.10 <sup>6</sup> )
1	Malásia	14540
2	Indonésia	7595
3	Argentina	5255
4	EUA	3212
5	Brasil	2567
6	Países Baixos	2496
7	Alemanha	2024
8	Filipinas	1234
9	Bélgica	1213
10	Espanha	1073

Fonte: Adaptado (ATABANI et al., 2012).

Entretanto, deve ser observado que o biodiesel na forma pura possui algumas desvantagens com relação ao diesel mineral, como menor poder calorífico, maior densidade em baixas temperaturas, aumento de emissões de óxidos de nitrogênio, além de requerer melhorias com relação à estabilidade oxidativa, impedindo a deterioração do produto com o tempo (SHARMA; SINGH, 2009).

Desde janeiro de 2005, pela lei 11.097/05, distribuidoras e refinarias brasileiras foram autorizadas a adicionar 2% de biodiesel ao diesel (B2). Este percentual passou a ser obrigatório em 2008 e, devido ao crescimento da oferta, o governo tornou a mistura de 7% de biodiesel ao diesel (B7) obrigatória em 2014. Entre 2005 e 2012, após a criação do PNPB (Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel), houve um aumento expressivo no volume de biodiesel produzido no país conforme ilustrado na Figura 3.15 (ANP, 2014; PADULA et al., 2012; SOUZA; SEABRA, 2013).

**Figura 3.15.** – Evolução da produção de biodiesel no mundo entre 2000 a 2012.



Legenda: Barra cinza escuro: Produção global; Barra cinza claro: Produção brasileira.  
 Fonte: ANP (2014)

Especificações físico-químicas para o biodiesel (a exemplo de ponto de ebulição, número de cetano, viscosidade cinemática e índice de acidez) são agrupadas em normas. Em território nacional, esta regulamentação é realizada pela Resolução 14/2012 da ANP. No continente europeu, a norma que determina a qualidade do biodiesel é denominada EN 14214, enquanto que nos Estados Unidos, a norma que contém esta função tem a designação de ASTM 6751 D (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009). A fim de maximizar o aproveitamento de fontes vegetais nacionais, a especificação brasileira é flexível em alguns itens, nos quais são necessárias apenas anotações para referência, como listado na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. – Especificações do biodiesel estabelecidas pela Resolução 14/2012 (ANP).

Característica	Unidade	Limite	Método		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISSO
<b>Aspecto</b>	-	LII	-	-	-
<b>Massa específica a 20° C</b>	kg/m <sup>3</sup>	850-900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 EN ISO 12185
<b>Viscosidade cinemática a 40°C</b>	mm <sup>2</sup> /s	3,0-6,0	10441	445	EN ISO 3104
<b>Teor de água, máx.</b>	mg/kg	350	-	6304	EN ISO 12937
<b>Contaminação total, máx.</b>	mg/kg	24	-	-	EN ISO 12662
<b>Ponto de fulgor, mín.</b>	°C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
<b>Teor de éster, mín.</b>	% massa	96,5	15342	-	EN 14103
<b>Resíduo de carbono</b>	% massa	0,050	-	4530	-
<b>Cinzas sulfatadas, máx.</b>	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
<b>Enxofre total, máx.</b>	mg/kg	10	-	5453	EN ISO 20846 EN ISO 20884
<b>Sódio + potássio, máx.</b>	mg/kg	5	15554 15555 15553 15556	-	EN 14108 EN 14109 EN 14538
<b>Cálcio + magnésio, máx.</b>	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538
<b>Fósforo, máx.</b>	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107
<b>Corrosividade ao cobre, 3h a 50°C, máx.</b>	-	1	14359	130	EN ISO 2160
<b>Número de cetano</b>	-	Anotar	-	613 6890	EN ISO 5165
<b>Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.</b>	°C	5-19	14747	6371	EN 116
<b>Índice de acidez, máx.</b>	mg KOH/g	0,50	14448	664	EN 14104
<b>Glicerol livre, máx.</b>	% massa	0,02	15341	6584	EN 14105 EN 14106
<b>Glicerol total, máx.</b>	% massa	0,25	15344	6584	EN 14105
<b>Monoacilglicerol, máx.</b>	% massa	0,80	15342 15344 15908	6584	EN 14105
<b>Diacilglicerol, máx.</b>	% massa	0,20	15342 15344 15908	6584	EN 14105
<b>Triacilglicerol, máx.</b>	% massa	0,20	15342 15344 15908	6584	EN 14105
<b>Metanol e/ou etanol, máx.</b>	% massa	0,20	15343	-	EN 14110
<b>Índice de iodo</b>	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111
<b>Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.</b>	h	6	-	-	EN 14112 EN 15751

Fonte: ANP (2015).

### 3.5. Matérias-primas para a produção de biodiesel

No Brasil, 85,81% do biodiesel produzido em escala industrial é derivado do óleo de soja. Entretanto, o óleo de soja está inserido na cadeia alimentícia, o que leva a busca de matérias-primas alternativas para a produção de biodiesel, como os óleos vegetais de andiroba, babaçu, coco, macaúba, palma, pinhão-manso e gorduras residuais como sebo bovino. A potencialidade nacional quanto à produção de óleos vegetais é garantida pela diversidade de culturas que podem ser produzidas no país (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

As práticas agrícolas adotadas no cultivo das espécies produtoras de biodiesel são aspectos determinantes da eficiência econômica e energética do processo de obtenção de biodiesel. Devido à diversidade climática e a grande extensão territorial, diversas culturas são indicadas para a síntese de biodiesel no país, conforme mostrado na Tabela 3.5 que lista algumas dessas espécies, bem como o potencial produtivo de cada uma.

**Tabela 3.5.** – Características das principais culturas oleaginosas no Brasil.

<b>Espécie</b>	<b>Origem do óleo</b>	<b>Teor de óleo (%)</b>	<b>Meses de colheita por ano</b>	<b>Rendimento (t de óleo/ ha)</b>
<b>Dendê</b>	Polpa do fruto	22	12	3-6
<b>Coco</b>	Fruto	55-60	12	1,3-1,9
<b>Babaçu</b>	Amêndoa	66	12	0,1-0,3
<b>Girassol</b>	Grão	38-48	3	0,5-0,9
<b>Canola</b>	Grão	40-48	3	0,5-0,9
<b>Amendoim</b>	Grão	40-43	3	0,6-0,8
<b>Palmiste</b>	Amêndoa	40	12	0,39
<b>Soja</b>	Grão	18	3	0,2-0,4
<b>Algodão</b>	Grão	15	3	0,1-0,2

Fonte: Adaptado (SILVA; FREITAS, 2008; AGROPALMA, 2012).

O óleo de palmiste apresenta como vantagem o fato de que seu fruto, a palma, apresenta uma cultura perene e com colheita contínua durante todo o ano. Isso diminui os dispêndios energético e financeiro para a produção dessa espécie e evita a sazonalidade do fornecimento de matéria-prima, um bônus imenso em relação aos cultivos anuais (SILVA; FREITAS, 2008).

A maior parte da área plantada da palmeira situa-se na Ásia (Indonésia, Malásia) e, o restante, distribuída entre África, América Latina e Caribe. A Indonésia é destacada como o maior produtor mundial do óleo de palmiste, seguida pela Malásia e Nigéria. A Tabela 3.6 lista os principais países produtores do óleo de palmiste.

**Tabela 3.6.** – Principais países produtores do óleo de palmiste, em 2014.

<b>País</b>	<b>Produção (toneladas)</b>
Indonésia	3.800,00
Malásia	2.350,00
Nigéria	330,00
Tailândia	180,00
Colômbia	108,00
Papua e Nova Guiné	60,00
Equador	55,00
Camarões	50,00
Honduras	50,00
Gana	44,00
Brasil	42,00

Fonte: USDA, 2014.

O cultivo da palma é muito dependente de características climáticas, principalmente da temperatura (deve apresentar um valor entre 25-28°C) e da umidade relativa do ar (umidade em torno de 75-90%) (BASTOS et al., 2001). Sendo assim, as principais plantações e produções se concentram na região Norte do Brasil, principalmente nos estados do Pará e do Amazonas, assim como na faixa litorânea do estado da Bahia. Favorecida pelas condições de tropicalidade climática, ambas as regiões detêm praticamente toda a produção da palma brasileira (Tabela 3.7) (SOUZA, 2012).

**Tabela 3.7.** – Área plantada com palma no Brasil

<b>Estado do Brasil</b>	<b>Área plantada (ha)</b>
Pará <sup>a</sup>	180.000,00
Bahia <sup>b</sup>	5.800,00
Amazonas <sup>b</sup>	2.400,00

<sup>a</sup>Dados referentes ao ano de 2013. <sup>b</sup>Dados referentes ao ano de 2008

Fonte: ABIOVE, 2013; SOUZA, 2012.

A palmeira é uma planta monóica que produz (para cada árvore) cachos pesando entre 10 e 25 kg contendo entre 1000 até 3000 frutos por cacho. Os frutos apresentam conformação esférica e coloração roxa (quase preta) e sua cor se torna laranja-avermelhada quando está madura. Cada fruto consiste em uma semente envolvida em uma casca cercada por um mesocarpo.

A palmeira começa a dar frutos com 30 meses depois de plantada e irá continuar produzindo frutos pelos próximos 20-30 anos, garantindo assim o fornecimento de óleo. A palmeira apresenta o cultivo mais eficiente do mundo, no que diz respeito a produção de óleo vegetal, necessita apenas de 0,26 hectares de área plantada para produzir 1 tonelada de óleo vegetal, enquanto que a soja, o girassol e a colza requerem 2,22; 2 e 1,52 hectares respectivamente, para produzir a mesma quantidade. O fruto da palma produz dois tipos de óleos: do mesocarpo é extraído o óleo de palma e da amêndoa é extraído o óleo de palmiste (MPOC, 2015).

Quanto ao processo de extração do óleo de palmiste, inicialmente tem-se a quebra do fruto da palma por meio de um quebra-nozes obtendo assim uma mistura de mesocarpo e a amêndoa do fruto. Após esta etapa, a separação da mistura mesocarpo e amêndoa do fruto é realizada por meio de um banho de argila. A densidade da mistura tem que ser suficiente para que a casca (mesocarpo) afunde e a amêndoa flutue no topo da mistura. As amêndoas são então colocadas em cestas e lavadas com água limpa, sendo na sequência levadas para a etapa de secagem. Em seguida, as amêndoas são esmagadas e a pasta resultante é misturada com uma pequena proporção de água e submetida a aquecimento liberando assim o óleo de palmiste (FAO, 2002).

Em função da possibilidade de cultivo de diferentes oleaginosas no Brasil e, sabendo, *a priori*, que a qualidade do biodiesel depende da matéria-prima precursora, selecionou-se para a execução do presente trabalho, o óleo de palmiste como matéria-prima lipídica que apresenta composição rica em ácidos graxos saturados, conforme indicado na Tabela 3.8.

**Tabela 3.8.** – Composição em ácidos graxos do óleo de palmiste.

<b>Ácido graxo</b>	<b>Composição (% em peso)</b>
Ácido caprílico	4,4
Ácido cáprico	3,7
Ácido láurico	48,3
Ácido mirístico	15,6
Ácido palmítico	7,8
Ácido esteárico	2,0
Ácido oleico	15,1
Ácido linoleico	2,7

Fonte: Adaptado (MPOC, 2015).

### 3.6. Tecnologias de produção de biodiesel

#### 3.6.1 Transesterificação

A produção de biodiesel mais amplamente empregada na indústria se baseia na reação de alcoólise, também denominada transesterificação, de óleos vegetais com um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) na presença de catalisadores.

A transesterificação é considerada a melhor rota para a utilização dos óleos vegetais como alternativa ao diesel fóssil, pois confere ao produto (biodiesel) características como viscosidade e índice de cetano muito próximas às apresentadas no diesel. Os óleos e gorduras quando submetidos ao processo de transesterificação sofrem quedas bruscas nos valores do ponto de névoa e viscosidade, podendo assim o combustível obtido ser queimado diretamente em motores diesel sem a necessidade de adaptação (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

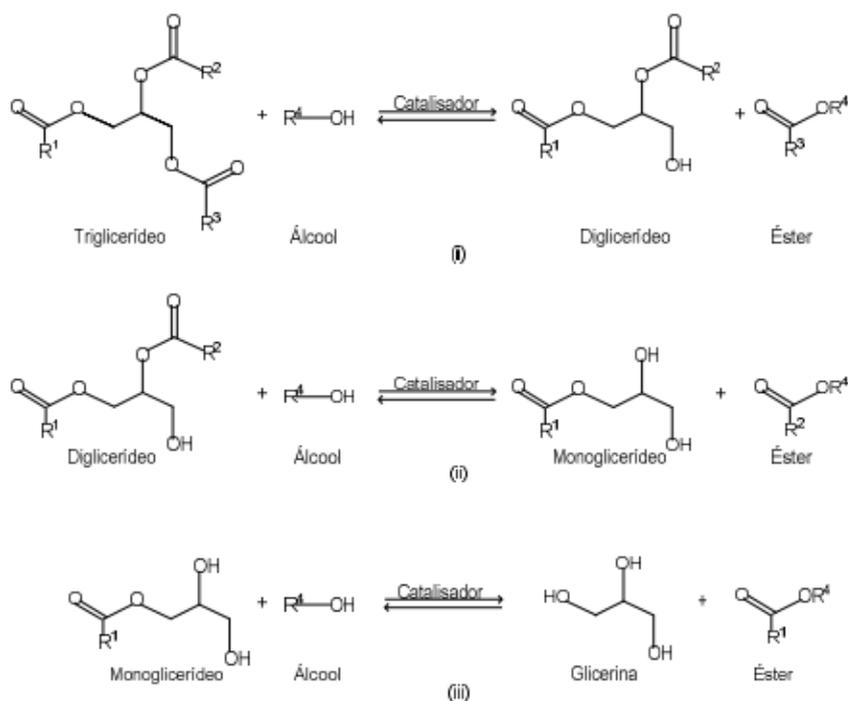
Para a obtenção de um biocombustível de alta qualidade, algumas características técnicas são imprescindíveis, tais como: a reação de transesterificação deve ser completa, refletindo a ausência total de ácidos graxos remanescentes, e o biodiesel produzido deve ser de alta pureza, não contendo traços de glicerina residual ou álcool excedente de reação (KNOTHE et al., 2006).

A reação ocorre numa sequência consecutiva e reversível de três etapas reacionais. A primeira etapa envolve a formação de diacilgliceróis a partir dos triacilgliceróis. Na segunda, os diacilgliceróis são convertidos em monoacilgliceróis e na última, esses são convertidos em glicerina. Em todas essas etapas são produzidos ésteres de cadeia carbônica longa, como esquematizado na Figura 3.16.

Embora a relação estequiométrica da reação seja de 1:3 (óleo e álcool), normalmente é empregado um excesso de álcool para favorecer a formação do produto final (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009; BRUNSCHWIG; MOUSSAVOU; BLIN, 2012).

O excesso de álcool na reação não exerce efeitos sobre as características físico-químicas do biodiesel. Entretanto, razões molares muito elevadas entre o álcool e o óleo podem interferir na etapa de separação da glicerina, pois ocorre um aumento na solubilidade do meio reacional. Quando a glicerina permanece na solução, ela pode alterar o equilíbrio da reação para a esquerda, diminuindo assim o teor de éster (MEHER; VIDYA-SAGAR; NAIK, 2006).

**Figura 3.16.** – Mecanismo da reação de transesterificação, em que R1, R2 e R3 são as cadeias do ácido graxo, e R4 é o grupo alquil do álcool



Fonte: Adaptado (ALVES, 2012).

A utilização de metanol na transesterificação normalmente é preferida por razões econômicas (menor custo que o etanol) e também relacionada ao processo de produção (maior polaridade e isento de água). Contudo, a transesterificação utilizando etanol em vez de metanol tem sido sugerida como uma alternativa mais limpa e mais sustentável para a produção de biodiesel (STAMENKOVIC; VELICKOVIC; VELJKOVIC, 2011). Além disso, o etanol possui dois átomos de carbono na sua cadeia e, portanto, apresenta maior massa molar que o metanol, o que significa um ganho de produtividade de massa na síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos, resultando em uma maior quantidade de biodiesel por unidade de óleo (BRUNSCHWING; MOUSSAVOU; BLIN, 2012).

A opção de utilização de etanol no Brasil é bastante atrativa devido à grande vocação agrícola e a já consolidada indústria do etanol no país, e é natural a ideia de substituição do álcool metílico pelo etílico na produção de biodiesel. Mesmo considerando algumas desvantagens técnicas existentes na produção do biodiesel pela rota etílica (mais lenta, consome mais álcool, maior dificuldade de separação), o biodiesel etílico possui viscosidade maior que o biodiesel metílico, promovendo maior lubrificidade. Destaca-se

ainda que biodiesel etílico gera significativamente menos opacidade na fumaça que o biodiesel metílico, sua temperatura de combustão é menor, significando, entre outras coisas, uma redução nas emissões de NO<sub>x</sub> (STAMENKOVIC; VELICKOVIC; VELJKOVIC, 2011; BRUNSCHWING; MOUSSAVOU; BLIN, 2012).

### **3.6.2. Catálise homogênea e heterogênea**

Na alcóolise, a catálise pode ser homogênea ou heterogênea. Os catalisadores heterogêneos atuam em forma sólida, sem se misturar com o meio reacional, ao passo que os homogêneos se solubilizam durante a reação, a exemplo dos álcalis hidróxido de sódio e de potássio. Tais bases são utilizadas frequentemente em processos industriais de biodiesel e possuem como vantagens a rápida produção de ésteres, rendimentos muito elevados e condições brandas de pressão, temperatura e razão molar álcool/óleo. Entretanto, a purificação do biodiesel produzido é dispendiosa, requerendo diversas séries de lavagem, o que consome muita água e gera efluentes corrosivos (BORGES; DÍAZ, 2012).

O emprego de catalisadores homogêneos inclui também os de caráter ácido, em que ácidos inorgânicos como o ácido sulfúrico são misturados diretamente com o meio reacional, ocorrendo simultaneamente reações de esterificação de ácidos graxos livres (AGL) e de transesterificação de triglicerídeos para a formação de ésteres. Este tipo de catálise é mais indicado para óleos com teores de AGL elevados, entretanto, a utilização de ácidos causa corrosão em equipamentos industriais, além de apresentar cinética lenta, aumentando o tempo de reação (TALEBIAN-KIAKALAIEH; AMIN; MAZAHERI, 2013).

Os catalisadores heterogêneos são tão diversos quanto os básicos (a exemplo de óxidos de metais alcalino-terrosos), os ácidos (como fosfato de vanádio e zircônia sulfatada) e lipases imobilizadas. Esses catalisadores podem ser reutilizados, diminuindo custos globais do processo. Desvantagens ocorrem com a limitação de difusão no meio, tornando a reação mais lenta. Além disso, há o emprego de condições de reação menos brandas no caso da catálise química, incluindo temperaturas, pressões e razões molares entre álcool/óleo mais altas (LEUNG; WU; LEUNG, 2010; SEMWAL et al., 2011).

O desenvolvimento de catalisadores heterogêneos mais eficientes, portanto, tem sido o objetivo para tornar a produção de biodiesel ambientalmente favorável e reduzir custos de manutenção. Assim, atualmente, tem havido grande interesse no desenvolvimento do processo enzimático de produção de biodiesel, devido às desvantagens

dos processos químicos. Na literatura existe uma série de trabalhos científicos publicados indicando que as enzimas são promissoras nesta área como catalisadores (MOREIRA et al., 2007, AL-ZUHAIR, 2007, FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009; ROBLES-MEDINA et al., 2009, VASUDEVAN; BRIGGS, 2008). As enzimas que catalisam a reação entre o triacilglicerol e o álcool para a produção de ésteres são as lipases.

### **3.7. Síntese de biodiesel por catálise enzimática**

A produção enzimática de biodiesel utilizando a lipase oferece uma rota para a produção de biodiesel com maior número de vantagens econômicas e ambientais quando comparada a rota química (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014):

1. Altas conversões em reações utilizando temperaturas mais amenas;
2. Alta seletividade e especificidade da trans/esterificação em relação aos substratos;
3. Utilização de menores razões molares álcool/óleo;
4. Evita a formação de reações paralelas;
5. Fácil separação;
6. Fácil recuperação do glicerol;
7. Eliminação dos custos de tratamento associados com a recuperação dos catalisadores químicos;
8. Oportunidade de reutilizar a enzima e aumentar a sua estabilidade através da imobilização de enzimas.

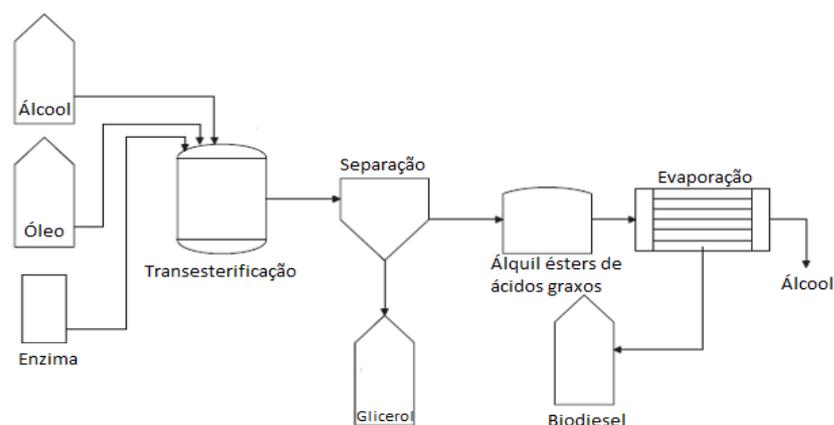
Embora a catálise enzimática tenha algumas limitações, principalmente associadas às velocidades reduzidas de reação, custos mais elevados e perda de atividade ou inibição enzimática, a rota enzimática para a produção de biodiesel é atualmente considerada como uma alternativa sustentável e em crescente ascensão com enzimas mais eficientes e de menor custo de produção (BRUN et al., 2011). Especificamente, as velocidades das reações enzimáticas geralmente são baixas. Embora a lipase tenha um potencial de reutilização, ela tende a perder atividade ao final do processo e pode ser desativada por álcoois de cadeia curta e glicerol. O alto custo das enzimas também é uma limitação para a sua aplicação industrial no processo de produção de biodiesel. O tempo de meia-vida da enzima e a imobilização da enzima são fatores importantes para a redução do custo do processo. Logo, aumentar o desempenho e a estabilidade da lipase assim como reduzir os

custos ligados a equipamentos industriais é um ponto crucial para o aumento da comercialização da lipase para a produção de biodiesel.

Diferentes propriedades físico-químicas das matérias-primas incluindo a composição de ácidos graxos, o conteúdo de ácidos graxos livres, a umidade, e outras impurezas podem afetar o processo de produção enzimática de biodiesel, assim como as propriedades finais do produto. Embora meio reacional contendo co-solvente (hexano, terc-butanol, entre outros) aparentemente aumente o tempo de meia-vida da enzima, o custo de manutenção desse sistema é muito caro devido ao elevado custo para a recuperação do solvente. Nesse sentido, um sistema livre de solventes é uma escolha viável para a produção enzimática de biodiesel (HAMA; KONDO, 2013).

Um fluxograma do processo de produção enzimática de biodiesel é demonstrado na Figura 3.17 (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014). A Tabela 3.9 apresenta uma comparação do processo de produção pelas vias enzimática e pela catálise homogênea (ROBLES-MEDINA et al., 2009).

**Figura 3.17.** – Fluxograma de produção enzimática do biodiesel



Fonte: Adaptado (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

**Tabela 3.9.** – Comparação do processo de produção de biodiesel pela rota enzimática e química

Parâmetro	Processo enzimático	Catálise homogênea	
		Rota alcalina	Rota ácida
Conteúdo de ácidos graxos livres na matéria-prima	Os AGL são convertidos em biodiesel	Formação de sabão	Os AGL são convertidos em biodiesel
Conteúdo de água no material	Não interfere na atuação da lipase, entretanto, aumenta a taxa de hidrólise	Formação de sabão A hidrólise do óleo gera a formação de mais sabão	Causa a desativação do catalisador
Percentual de biodiesel (conversão)	Elevado, próximo de 90%	Alta, normalmente maior do que 96%	Alta, normalmente maior do que 90%
Velocidade de reação	Baixa	Alta	Alta
Recuperação de glicerol	Fácil, glicerol de boa qualidade	Complexa, glicerol de baixa qualidade	Complexa, glicerol de baixa qualidade
Reuso e recuperação do catalisador	Fácil	Difícil	Difícil
Custo energético	Baixo (T 20-50°C)	Médio (T 60-80°C)	Alto (T > 100°C)
Custo do catalisador	Alto	Baixo	Baixo
Impacto Ambiental	Baixo Tratamento da água de lavagem não é necessária	Alto Tratamento da água de lavagem é necessário	Alto Tratamento da água de lavagem é necessário

Fonte: Adaptado de ROBLES-MEDINA et al., 2009.

### 3.8. Produção de biodiesel a partir do óleo de palmiste

Dentre as possibilidades de se produzir biodiesel utilizando óleos vegetais, a utilização do óleo de palmiste como matéria-prima ainda é pouco reportada na literatura, porém os trabalhos científicos publicados nesta área mostram que a reação de transesterificação enzimática de biodiesel utilizando óleo de palmiste apresenta resultados semelhantes aos demais óleos vegetais (SOUMANOU; BORNSCHEUER, 2003; ABIGOR et al., 2000; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2000; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2001). A Tabela 3.10 apresenta exemplos de trabalhos publicados utilizando o óleo de palmiste como matéria-prima para produção enzimática de biodiesel.

**Tabela 3.10.** – Trabalhos publicados para a produção enzimática de biodiesel utilizando óleo de palmiste como matéria-prima

<b>Biocatalisador</b>	<b>Razão molar óleo/álcool</b>	<b>Condições operacionais</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Referência</b>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (AK) imobilizada em polipropileno EP 100	1:1 no início 1:3 no final	Reator de tanque agitado, 24 h a 40°C	74	SOUMANOU BORNSCHEUER (2003)
Lipase PS 30	1:4	Reator de tanque agitado, 8 h a 40°C	72	ABIGOR et al (2000)
Novozym 435	1:10	Reator de tanque agitado, 4 h a 40°C	63,2	OLIVEIRA OLIVEIRA (2000)
Lipozyme IM	1:3	Reator de tanque agitado, 6 h a 40 °C	77,5	OLIVEIRA OLIVEIRA (2001)

Fonte: próprio autor

Soumanou e Bornscheuer (2003) estudaram a produção de biodiesel por transesterificação enzimática do óleo de palmiste com metanol utilizando a lipase *Pseudomonas fluorescens* (AK), imobilizada em polipropileno EP 100, como catalisador. As condições da reação foram: temperatura de 40 °C; 200 rpm de agitação; razão molar óleo/álcool 1:1 no início, após 4 horas de reação a razão molar se tornou 1:2, e após 8 horas tornou-se 1:3; tempo de reação = 24 horas. Foi utilizado um reator de tanque agitado (2 mL) e ao final do processo foi alcançada uma conversão em ésteres de 74%.

Abigor et al (2000) avaliaram a produção de biodiesel por transesterificação enzimática do óleo de palmiste com etanol utilizando a lipase PS 30 como catalisador. As condições da reação foram: temperatura de 40°C; 250 rpm de agitação; razão molar óleo/álcool 1:4; tempo de reação = 8 horas. Ao final do processo foi alcançada uma conversão em ésteres de 72 %.

Oliveira e Oliveira (2000) estudaram a produção de biodiesel por transesterificação enzimática do óleo de palmiste com etanol utilizando a lipase Novozym 435 como catalisador. As condições da reação foram: temperatura de 40°C; 1000 rpm de agitação; razão molar óleo/álcool 1:10; tempo de reação = 4 horas. Foi utilizado um reator de tanque agitado de 300 mL e obtido um rendimento de 63 % em conversão de ésteres.

Oliveira e Oliveira (2001) estudaram a produção de biodiesel por transesterificação enzimática do óleo de palmiste com etanol utilizando a lipase Lipozyme IM como

catalisador. As condições da reação foram: temperatura de 40 °C; 200 rpm de agitação; razão molar óleo/álcool 1:3; tempo de reação = 6 horas. Foi utilizado um reator de tanque agitado de 125 mL e obtido um rendimento de 77,5 % em conversão de ésteres.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

#### 4.1.1. Enzima

Neste trabalho todos os experimentos foram realizados utilizando a lipase microbiana comercial de *Burkholderia cepacia* (Lipase PS) manufaturada pela Amano Enzyme Inc (Nagoya, Japão) e adquirida da Sigma-Aldrich.

#### 4.1.2. Suportes de imobilização

Na síntese dos suportes híbridos foram utilizados como compostos orgânicos: poli (Álcoolvinílico) (PVA, MM 78.000 e 88 mol % hidrolisado, Polysciences adquirido da Sinapse Biotecnologia Ltda. São Paulo),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD, 97%) e carboximetilcelulose (CMC) ambos adquiridos da Sigma-Aldrich, hidroxietilcelulose (HEC) (Fluka, Alemanha), empregando como precursor tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Aldrich (98%, Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, EUA). Álcool etílico (95%, Cromoline) e ácido clorídrico (mín. 36%, Isofar).

#### 4.1.3. Materiais de partida

Butanol (mín 99,5%, Merck) e ácido butírico (mín 99,0%, Vetec) foram utilizados nas reações de esterificação. Como materiais de partida da reação de transesterificação foram utilizados: etanol anidro (99%, Cromoline) e óleo de palmiste adquirido da Agropalma (Belém-PA), tendo uma composição aproximada em ácidos graxos de: 4,3% Caprílico, 3,8% Cáprico, 48,0% Láurico, 16,0% Mirístico, 8,25% Palmítico, 2,15% Esteárico, 15,50% Oleico e 2,0% Linoleico e viscosidade (32,27 mm<sup>2</sup>/s). Propriedades adicionais do óleo de palmiste são fornecidas no Apêndice A.

#### 4.1.4. Outros reagentes

Os outros reagentes utilizados foram: hexano (Cromoline), heptano (Cromoline) polietilenoglicol (MM 1500, Synth), goma arábica em pó pura (Synth), epiclorigrina (99%, Sigma-Aldrich), fosfato de sódio bibásico (mín. 99%, Montedison Farm), fosfato de sódio monobásico anidro (mín. 99%, Synth), hidróxido de sódio (mín. 97%, Isofar), hidróxido de potássio (mín. 85%, Cromoline), acetona (mín. 99,5%, Cinética) e iso-octano (99,0%,

Synth), glicerol (85%, Merck). Azeite de oliva com baixa acidez (Carbonell, adquirido em mercado local). Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

## 4.2. Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1.** – Principais equipamentos utilizados durante a realização do trabalho

<b>Tipo de análise e/ou ensaio</b>	<b>Equipamento</b>	<b>Modelo/ fabricante</b>
Dosagem de ésteres	Cromatógrafo a gás	Modelo GC-3800, Varian (Varian Inc. Corporate Headquarters)
Viscosidade	Viscosímetro	Modelo LVDVIII-CP 520, Brookfield
Centrifugação	Centrífuga	Modelo 206-BL, Excelsa II (Fanem)
Dosagem de mono e diacilgliceróis	Cromatógrafo de alta eficiência	Modelo 1260 Infinity ELSD (Agilent Technologies)
Densidade	Densímetro	Modelo DMA 35N EX (Anton Paar)
Análises texturais	BET	BELSORP-mini II
Raios-X	Raios-X	Shimadzu
Espectrofotometria na região do infravermelho	Espectrômetro no infravermelho	Spectrum GX, Perkin Elmer
Dosagem de glicerol	Espectrofotometria do UV-Visível	Modelo Cary 50 Conc (Varian)

## 4.3. Metodologia Experimental

### 4.3.1. Síntese dos suportes híbridos

Os compostos híbridos constituídos de polissiloxano ( $\text{SiO}_2$ ) e poli (Álcoolvinílico) (PVA),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta\text{CD}$ ), carboximetilcelulose (CMC) ou hidroxietilcelulose (HEC) foram sintetizados, pela mistura de 50 mL tetraetilortossilicato (TEOS), 50 mL etanol 95% e 60 mL de solução do composto orgânico (PVA,  $\beta\text{CD}$ , CMC ou HEC) 2% (m/v). As misturas foram aquecidas a 60°C, sob agitação, com adição de 1,0 mL de ácido clorídrico

(HCl) concentrado (PAULA et al., 2008). Após um período de incubação de 40 min, a preparação foi vertida em moldes de acetato e mantida a 25 °C por 48h até a completa solidificação. Os compostos híbridos foram triturados e classificados, utilizando-se peneiras de análises granulométricas (Bronzinox) com 42 e 60 mesh, sendo utilizado na etapa de ativação, as partículas retidas na peneira com malha de 60 mesh.

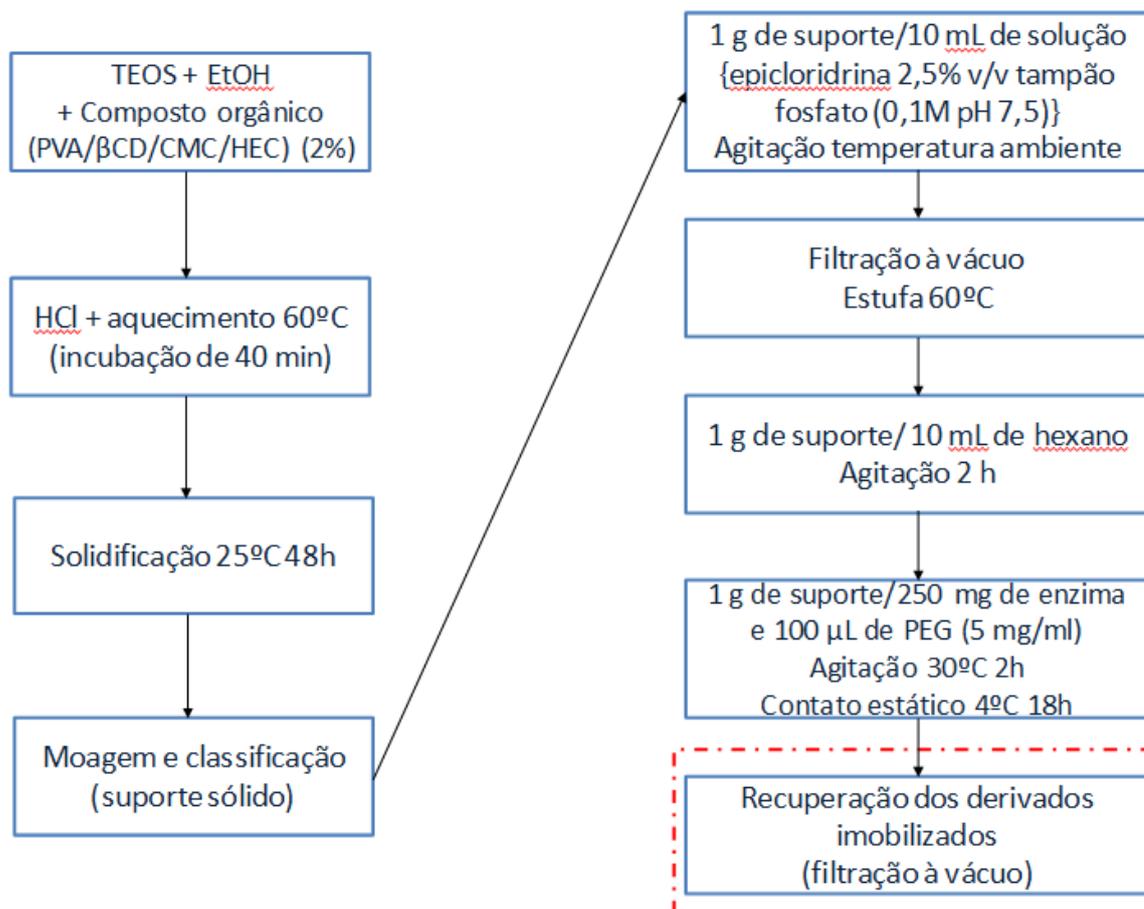
#### **4.3.2. Ativação dos suportes híbridos**

Os suportes foram ativados com solução de epicloridrina 2,5% (v/v) em tampão fosfato de sódio (0,1 M e pH 7,5), na proporção 1g de suporte para 10 mL de solução. Após a homogeneização, as misturas foram mantidas sob agitação por 1h à temperatura ambiente, sendo em seguida submetidas à filtração a vácuo em um funil de Buchner, contendo um papel de filtro (diâmetro 28 µm) no seu interior, para retirar o excesso de umidade. Durante a filtração os suportes foram lavados exaustivamente com água destilada e solução tampão de fosfato, e em seguida levados à estufa (60° C) por 24 h.

#### **4.3.3. Imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em diferentes tipos de suporte**

Os suportes ativados (SiO<sub>2</sub>-βCD, SiO<sub>2</sub>-CMC, SiO<sub>2</sub>-HEC ou SiO<sub>2</sub>-PVA) foram embebidos em hexano numa relação sólido: líquido de 1:10 e mantidos sob agitação branda por 2 h. Após este período, para cada grama de suporte ativado (matéria seca), foram adicionados 250 mg de lipase na sua forma livre, empregando como agente estabilizante da enzima 100 µL de solução aquosa contendo 5 mg/mL de polietilenoglicol (massa molecular 1500). As suspensões contendo enzima e suportes foram mantidas sob agitação a 30°C por 2h, seguido de contato estático por um período adicional de 18h a 4 °C. A recuperação dos derivados imobilizados foi efetuada por filtração a vácuo, com lavagens sucessivas com hexano até a redução da umidade dos derivados imobilizados a valores não superiores a 15% (CARVALHO, 2011). O esquema geral do procedimento é ilustrado na Figura 4.1.

**Figura 4.1.** – Esquema de síntese, ativação dos suportes híbridos e imobilização da lipase *B. cepacia*.



Fonte: Próprio autor

#### 4.3.4. Síntese dos ésteres de alquila

As reações foram efetuadas em reatores de vidro cilíndrico encamisados com capacidade para 70 mL, acoplados com condensador de refluxo e nas seguintes condições fixas: 20 gramas de meio reacional na razão molar óleo/ etanol de 1:8. Foi utilizada uma quantidade de biocatalisador para satisfazer a relação previamente estabelecida de 600 unidades de atividade por cada grama de matéria-prima lipídica (DA RÓS et al, 2011). As sínteses catalisadas pelas lipases imobilizadas foram efetuadas a 45°C por um período total de 72 h e agitação magnética de 150 rpm, conforme ilustrado na Figura 4.2. As concentrações de ésteres de etila foram quantificadas por cromatografia em fase gasosa. O rendimento de transesterificação foi calculado de acordo com metodologia descrita por URIOSTE et al (2008).

### 4.3.5. Separação do biocatalisador e purificação do biodiesel

A separação do biocatalisador foi efetuada por filtração, seguido de lavagem com terc-butanol. O volume do filtrado recolhido foi medido e em seguida adicionado o mesmo volume de água destilada. A mistura foi transferida para um funil de decantação, efetuando-se agitação e deixando a mistura em repouso por 30 minutos para a separação das fases (Figura 4.3). A fase inferior composta por glicerol e água de lavagem foi descartada e a fase superior composta pelos ésteres de etila (biodiesel) foi submetida à centrifugação (1570 g por 15 min) e em seguida à evaporação em rota-evaporador para a retirada de etanol e água remanescentes. Posteriormente, foram adicionadas pequenas quantidades de sulfato de sódio anidro para finalizar a etapa de secagem. A amostra de biodiesel purificada foi submetida à análise dos parâmetros de interesse do projeto.

**Figura 4.2.** – Ilustração do aparato experimental utilizado nas reações de etanólise do óleo de palmiste



Fonte: próprio autor

**Figura 4.3.** – Fases separadas do biodiesel purificado no funil



## 4.4. Métodos de análise

### 4.4.1. Caracterização dos suportes híbridos

#### 4.4.1.1. Área superficial

A medida de área superficial das amostras dos suportes foi realizada em um equipamento da marca BEL, modelo BELSORP-mini II, empregando-se a técnica de adsorção-dessorção física de nitrogênio a  $-196^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram previamente tratadas *in situ* sob aquecimento à  $100^{\circ}\text{C}$  por 3 horas para retirada da água e os gases adsorvidos na

superfície e nos poros do sólido. A massa empregada de cada amostra foi entre 0,17 e 0,21g. Os resultados apresentaram erro máximo de  $\pm 5\%$  do valor de área específica. A área superficial específica dos suportes foi calculada pelo método BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938) de multicamadas do gás nitrogênio adsorvido fisicamente a  $-196^\circ\text{C}$  na amostra. A equação resultante do método de BET é expressa conforme a equação 4.1.

$$\frac{P}{V \cdot (P_0 - P)} = \frac{1}{V_m \cdot c} + \left\{ \frac{(c-1)}{V_m \cdot c} \right\} \cdot \frac{P}{P_0} \quad (4.1)$$

#### 4.4.1.2 Difração de Raios-X (DRX)

A identificação estrutural das amostras foi realizada por medidas de difração de raios X. As análises de raios-X foram realizadas colocando as amostras sobre o suporte de alumínio e as análises foram efetuadas em intervalos angulares de 8 a 70 graus e tempo de contagem de 1 segundo, utilizando o difratômetro da marca Shimadzu, modelo XRD 6000. A técnica utilizada foi a difratometria de pó, a uma tensão de 40kV e uma corrente de 30 mA. A radiação utilizada foi de  $\text{CuK}\alpha$  com monocromador de grafite e comprimento de onda de  $1.5418 \text{ \AA}$ .

#### 4.4.1.3. Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)

A espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi conduzida na faixa de número de onda de  $400$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$  usando cristais de KBr. O espectrômetro utilizado foi o modelo Spectrum GX, Perkin Elmer. As amostras foram analisadas pelo método de Transmissão, sendo medidos os valores de absorbância no intervalo de  $400$ - $4000 \text{ cm}^{-1}$ . Foram feitas 32 varreduras com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de KBr, pesou-se cerca de 2 mg da amostra seca e moída e adicionou-se a 200 mg de KBr grau espectroscópico, seco a  $105^\circ\text{C}$  por 2 h. Essa mistura foi macerada até que fossem eliminados visivelmente todos os cristais, por cerca de 1 min. A amostra macerada foi então transferida para um molde pastilhador e prensada ( $1,5 \text{ kgf cm}^{-2}$ ) sob vácuo por 5 min, formando então a pastilha para análise.

#### 4.4.1.4. Testes de adsorção do glicerol dos suportes híbridos

Os testes de adsorção do glicerol foram realizados utilizando 10 mL de solução alcoólica de glicerol a 5% (v/v) e diferentes suportes (5% massa seca), seguida da incubação em banho de lavadora ultrassônica a 30 °C por 2 horas. O parâmetro avaliado foi a capacidade de adsorção do glicerol e a recuperação mássica. Após o procedimento, as misturas compostas por solução alcoólica de glicerol e os suportes foram centrifugadas a 1570g durante 30 minutos. O sobrenadante foi recuperado e pesado para determinar a recuperação mássica da solução (equação 4.2) e em seguida o teor residual de glicerol quantificado (metodologia descrita no item 4.4.1.5), determinando a porcentagem de glicerol adsorvido (equação 4.3).

$$\text{Recuperação mássica (\%)} = \frac{m_f}{m_i} \cdot 100\% \quad (4.2)$$

Em que:

$m_f$ : massa da solução recuperada ao final do teste (gramas)

$m_i$ : massa da solução inicial (gramas).

$$\text{Glicerol Adsorvido (\%)} = \frac{m_{\text{Glicerol inicial}} - m_{\text{Glicerol final}}}{m_{\text{Glicerol inicial}}} \cdot 100\% \quad (4.3)$$

Sendo a massa de glicerol inicial presente na solução teste igual a 0,50 g e a massa final de glicerol calculada conforme a equação 4.4.

$$\text{Massa de glicerol final (g)} = C_f \cdot v \cdot \frac{R}{100} \quad (4.4)$$

Em que:  $C_f$  é a concentração final de glicerol na amostra (g/mL),  $v$  o volume de solução (igual a 10 mL) e  $R$  a porcentagem de recuperação mássica.

#### 4.4.1.5. Quantificação de glicerina em meio sintético

Para a determinação do teor de glicerina foi utilizado o método de Espectrofotometria do UV-Visível desenvolvido por BONDIOLI; BELLA (2005). O princípio do método é a reação do formaldeído, originado da oxidação da glicerina com o ácido periódico, com a acetilacetona. O composto formado é 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina, um produto de cor esverdeada detectado na leitura no espectrofotômetro

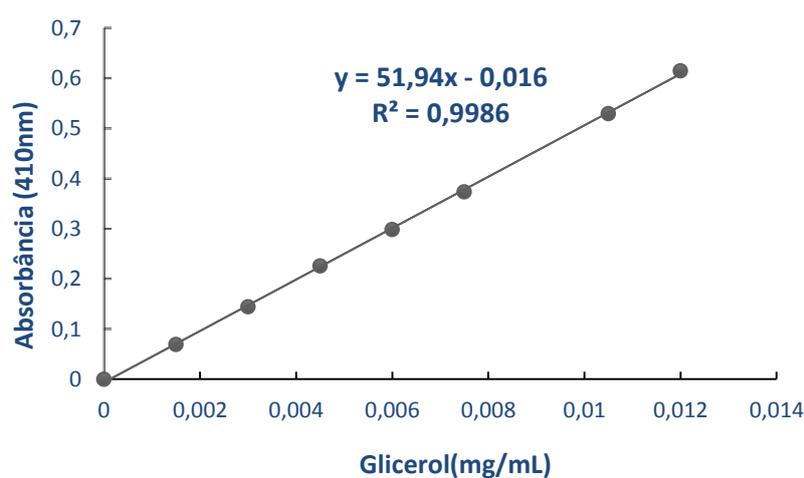
UV/Vis no comprimento de onda de 410 nm. Para o estabelecimento do método foram preparados os reagentes descritos na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2.** – Concentrações dos reagentes utilizados na etapa de dosagem do glicerol

Reagente	Concentração
Ácido acético (stock)	1,6 M
Acetato de amônio (stock)	4,0 M
Acetilacetona	0,2 M
Metaperiodato de sódio	10 mM
Solvente de trabalho	Etanol 96%
Glicerol	0,5M

Na construção da curva de calibração (Figura 4.3) utilizou-se solução padrão de glicerol (0,03 mg/mL) preparada em solvente de trabalho (etanol: água, 1:1), a qual foi diluída entre 2 e 20 vezes para se obter soluções de concentração conhecida entre 0,002 e 0,014 mg/mL.

**Figura 4.3.** – Curva padrão do glicerol



Fonte: próprio autor

Uma alíquota de 2 mL de cada diluição foi transferida para um tudo de vidro e os demais reagentes foram adicionados: 1,2 mL de solução 10mM de metaperiodato de sódio e 1,2 mL de solução 0,2M de acetilacetona. Posteriormente as amostras foram colocadas em banho de água termostaticado (70°C) por 1 min para favorecer a reação de oxidação da glicerina e em seguida os tubos foram resfriados por imersão em água a 20°C por 2 min. A leitura da absorvância foi realizada a 410nm em espectrofotômetro UV-Visível e os valores de absorvância obtidos foram plotados em função da concentração de glicerol (mg/mL).

A curva de calibração (Figura 4.3) apresentou uma ótima correlação linear (0,9986) e por meio da equação da reta  $y = 51,94x - 0,016$  foi possível quantificar o teor de glicerol nas amostras obtidas durante o desenvolvimento do trabalho.

#### 4.4.2. Propriedades dos derivados imobilizados

##### 4.4.2.1 Dosagem de atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada

A atividade enzimática da lipase na forma livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). Foram misturados 5 mL de uma emulsão de azeite de oliva (50% azeite: água) e 4 mL de tampão fosfato (pH 7,0; 0,1 M). A fim de garantir a homogeneização do meio, o sistema reacional foi mantido sob agitação prévia, à 37 °C por 10 min. Em seguida, foi adicionado a massa conhecida da preparação de lipase (cerca de 5 mg da lipase livre ou 500 mg do derivado imobilizado), mantendo-se o sistema reacional sob agitação a 37 °C, por 5 min. Após o período de incubação, foram adicionados 15 mL de uma mistura de etanol e acetona (1: 1) para interromper a reação. Os ácidos graxos liberados foram titulados com uma solução de KOH previamente padronizada (0,02mol/L) utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram calculadas segundo a equação 4.5 e expressas em µmol/g.min (U g<sup>-1</sup>).

$$\text{Atividade hidrolítica} \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{g} \cdot \text{min}} \right) = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot m} \quad (4.5)$$

Em que:  $V_A$  = volume de KOH gasto na titulação da amostra,  $V_B$  = volume do KOH gasto na titulação do branco,  $M$  = molaridade da solução de KOH,  $t$  = tempo de reação em min,  $m$  = massa em gramas.

#### 4.4.2.2. Dosagem da umidade dos derivados imobilizados

A determinação do teor de umidade dos derivados imobilizados foi feita medindo-se a perda de massa do material após secagem de uma quantidade conhecida (cerca de 0,1g) em balança analítica com infravermelho durante 15 min a 100°C.

#### 4.4.2.3 Estabilidade térmica da lipase livre e dos derivados imobilizados

As lipases livre e imobilizada foram incubadas a 50 °C em tampão fosfato (100 mM, pH 7,0) por 180 minutos. Em intervalos pré-determinados, as amostras foram retiradas, resfriadas em banho de gelo para interromper o processo de inativação e em seguida as atividades hidrolíticas residuais foram determinadas empregando o método de hidrólise do azeite de oliva, conforme a metodologia descrita no item 4.4.1.

#### 4.4.2.4. Determinação dos parâmetros cinéticos da lipase livre e imobilizada

No cálculo da constante de Michaelis-Mentem ( $K_m$ ), foram preparados sistemas reacionais contendo ácidos graxos totais em concentrações variando entre 372 – 1860 mM, obtidos a partir de emulsões preparadas com diferentes proporções de azeite de oliva (10 – 50 %) e solução aquosa de goma arábica (7% m v<sup>-1</sup>). As velocidades iniciais das reações de hidrólise catalisadas pela lipase na forma livre e imobilizada foram determinadas de acordo com a metodologia de hidrólise do azeite de oliva descrita anteriormente no item 4.4.1. As constantes cinéticas ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) foram determinadas pelo software Origin 8.

#### 4.4.2.5. Determinação da atividade de esterificação dos derivados imobilizados

As atividades de esterificação das amostras de lipase imobilizada foram determinadas pela formação do butirato de butila na reação de *n*-butanol (0,10 M) com ácido butírico (0,14 M) em heptano a 40 °C empregando 0,5 g de preparação experimental de lipase imobilizada. A reação foi iniciada pela adição da lipase imobilizada ao meio reacional (20 mL), em frasco fechado de 100 mL, em shaker rotatório com agitação de 180 rpm, durante 24 horas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após intervalos pré-determinados. O teor de ácido butírico foi determinado por titulação de alíquotas diluídas em etanol, empregando solução alcoólica de KOH 0,02M e fenolftaleína como indicador. A concentração do ácido butírico foi calculado pela equação 4.6:

$$\text{Ácido graxo (g/L)} = \frac{V \times M \times m}{W} \quad (4.6)$$

Em que: m = massa molecular do ácido graxo titulado (g/mol); M = molaridade da solução de KOH (mol/ L); V = volume gasto de KOH (mL); W = massa da alíquota titulada (g).

As concentrações do butanol residual e butirato de butila formado foram quantificadas por cromatografia de fase gasosa (Varian, Modelo CG 3800), utilizando uma coluna empacotada (6ft S# DEGS WHP 80/100 mesh, HP) e nitrogênio com gás de arraste (30 mL/min). As condições operacionais adotadas são descritas na Tabela 4.3. Uma unidade de atividade (esterificação) foi definida como a quantidade de enzima que conduz à formação de 1 μmol de butirato de butila por minuto nas condições do ensaio.

**Tabela 4.3.** – Condições operacionais para quantificação da concentração de butanol e butirato de butila por cromatografia de fase gasosa.

<b>Padrão Interno (PI):</b>	<b>Hexanol em heptano</b>		
<b>Temperatura da coluna</b>		75°C	
<b>Temperatura do ionizador</b>		190°C	
<b>Temperatura do vaporizador</b>		190°C	
<b>Vazão dos gases</b>		Nitrogênio (30 mL/min)	
		Hidrogênio (27 mL/min)	
		Ar sintético (300 mL/min)	
<b>Preparo da amostra</b>		Misturar 1:1 com PI	

		<b>Minutos</b>	<b>Concentração</b>
<b>Tempos de retenção</b>	PI	10,3	22,17 g/L
	Butanol	3,6	12,71 g/L
	Butirato de butila	5,7	8,30 g/L

#### 4.4.3. Caracterização do biodiesel

##### 4.4.3.1. Determinação dos ésteres de etila

Os ésteres de etila formados foram quantificados nas amostras antes da purificação, empregando cromatógrafo à gás (Modelo Varian CG 3800, Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, USA), equipado com detector ionizante de chama e coluna empacotada de aço inoxidável do tipo 5% DEGS CHR-WHP 80/100 mesh 6ft 2.0mm ID e 1/8"OD (Restek, Frankel Commerce of Analytic Instruments Ltda, SP, Brasil). Nitrogênio foi

usado como gás de arraste com fluxo de 25 mL/min. A coluna foi submetida a uma rampa de temperatura de 90° C (3 min), 120 °C (10 min) e 170° C (15 min), numa taxa de aquecimento de 25°C/min. A coleta de dados foi realizada utilizando o programa Galaxie Chromatography Data System version 1.9. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL em hexano e padrão interno (hexanol) e a quantificação foi realizada pela calibração interna apresentada na Tabela 4.4, conforme estabelecido por Urioste et al. (2008).

**Tabela 4.4.** – Condições de operação para a determinação dos ésteres de etila

<b>Padrão Interno (PI):</b>	<b>Hexanol em hexano</b>	
<b>Programa de Temperatura</b>	90°C/ 3 min, 120 °C/ 10 min e 170 °C/ 15 min	
<b>Taxa de aquecimento</b>	25°C/ min	
<b>Gás de arraste</b>	Nitrogênio	
<b>Atenuação do cromatógrafo</b>	A, B, C = 16	
<b>Preparo da amostra</b>	0,1g de amostra em 0,6g de hexano	
<b>Amostra para injeção</b>	1:1 (amostra: padrão interno)	
		<b>Minutos</b>
	C8 EtOH	3,28
	C10 EtOH	5,26
	C12 EtOH	8,56
	C14 EtOH	12,06
	C16 EtOH	13,96
	C18 EtOH	17,10
	C18:1 EtOH	17,81
	C18:2 EtOH	19,26
<b>Tempos de retenção dos monoésteres de etila</b>		

#### 4.4.3.2. Determinação dos teores residuais monoacilgliceróis e diacilgliceróis.

As amostras purificadas de biodiesel foram submetidas a análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinar os teores residuais de monoacilgliceróis e diacilgliceróis. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo Agilent modelo 1260 Infinity ELSD, com detector evaporativo de espalhamento de luz e coluna de aço inoxidável Phenomenex Gemini 5 µm C18 11HPLC (JT Baker, Avantor Performance Materials). A fase móvel constituiu de acetonitrila (A) e metanol (B), com uma proporção de solventes de 80% de A e 20% de B, por 35 minutos. Uma taxa de fluxo de 1,0mL/min foi mantida por 6 minutos, seguida de 1,5 mL/min por 30 minutos e 3,0 mL/min por 35 minutos.

As amostras de biodiesel foram dissolvidas em acetato de etila/hexano (1:1, v/v), sendo injetadas em volumes de 10 µL. Os padrões utilizados de Monoacilgliceróis e diacilgliceróis foram: monolaurina (C12:0), monomiristina (C14:0), monopalmitina

(C16:0), monoestearina (C18:0), monooleína (C18:1), dilaurina (C12:0), dimiristina (C14:0), dipalmitina (C16:0), diestearina (C18:0) e dioleína (C18:1).

#### 4.4.3.3. Viscosidade

Os valores da viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas foram feitas a 40 °C, empregando aproximadamente 0,5 mL de amostra.

#### 4.4.3.4. Densidade

Os valores de densidade foram determinados utilizando um densímetro digital Modelo DMA 35N EX (Anton Paar). As medidas foram feitas a 20 °C, empregando-se 2,0 mL de amostra.

#### 4.4.3.5. Rendimento de transesterificação

O rendimento (R) das reações de síntese de biodiesel por via enzimática foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (Mt) em relação à massa total teórica esperada de ésteres de etila ( $\Sigma Me$ ).  $M_e$  foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial do óleo de palmiste ( $M_0$ ), da massa molecular correspondente a cada ácido (MMa) e do éster correspondente (MM<sub>e</sub>). Este cálculo é representado pela equação 4.7 (a), em que  $M_0$  corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo (Ca), com a massa inicial de óleo utilizada (Mi) equação 4.7 (b). O rendimento foi calculado dividindo a massa total de ésteres determinada pela análise de cromatografia gasosa (Mt) pela massa total teórica de ésteres de etila (Me), conforme mostrado na equação 4.7 (c).

$$(a) \quad Me = \frac{(M_0 \cdot MM_e)}{MM_a} \quad (b) \quad M_0 = Ca \cdot Mi \quad (c) \quad R = \frac{Mt}{\Sigma Me} \cdot 100 \quad (4.7)$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de substituir a matriz híbrida de SiO<sub>2</sub>-PVA, selecionou-se três compostos orgânicos: β-ciclodextrina (βCD), carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC) para obtenção de compósitos híbridos obtidos pela técnica sol-gel, tendo como motivação do estudo a elevada afinidade do suporte híbrido SiO<sub>2</sub>-PVA pelo glicerol.

Os experimentos consistiram no preparo de diferentes tipos de suportes híbridos e a caracterização de suas propriedades texturais e morfológicas. Testes foram também realizados para avaliar a afinidade dos suportes pelo do glicerol.

Os suportes híbridos obtidos SiO<sub>2</sub>-βCD, SiO<sub>2</sub>-CMC, SiO<sub>2</sub>-HEC foram utilizados para imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia*, tendo a matriz SiO<sub>2</sub>-PVA como base de comparação. Nesta etapa foram avaliados diversos parâmetros como: o rendimento de imobilização, a atividade hidrolítica dos derivados imobilizados, propriedades texturais e morfológicas, os parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) e a estabilidade térmica.

Para todos os biocatalisadores, foi verificada a potencial catalítico para mediar reações em meio orgânico analisando os desempenhos dos derivados imobilizados na reação de esterificação do n-butanol e ácido butírico para a produção de butirato de butila e na reação de transesterificação do óleo de palmiste com etanol. As amostras de biodiesel obtidas foram caracterizadas com relação a alguns parâmetros de qualidade: teor de éster, viscosidade cinemática a 40 °C e teores residuais de mono e diacilglicerol.

Os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento dos ensaios realizados são descritos e discutidos neste capítulo.

### 5.1. Preparo dos suportes híbridos

O preparo dos diferentes tipos de suportes híbridos ocorreu, conforme a metodologia descrita no item 4.3.1. Ao final da etapa de solidificação, a massa obtida em forma de pastilha, em cada batelada foi pesada. Os compostos híbridos foram triturados, pesados e classificados, utilizando-se peneiras de análises granulométricas (Bronzinox) com 42 e 60 mesh. Ao final desta etapa, pesaram-se as massas obtidas nas granulometrias de 42, 60 e maior do que 60 mesh. Os valores obtidos em todas essas etapas são mostrados na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1.** – Rendimentos de sólidos obtidos em todas as etapas envolvidas no preparo dos suportes híbridos

<b>Suporte</b>	<b>Massa (g) das pastilhas</b>	<b>Massa (g) do moído</b>	<b>Massa (g) Mesh 42</b>	<b>Massa(g) Mesh 60</b>	<b>Massa(g) &gt; Mesh 60</b>
SiO <sub>2</sub> -βCD	20,75±0,17	19,03±0,24	4,20±0,78	4,68±0,21	10,16±0,72
SiO <sub>2</sub> -CMC	20,50±0,26	18,88±0,62	5,66±0,69	4,79±0,17	8,43±0,13
SiO <sub>2</sub> -HEC	20,90±0,36	18,49±0,44	1,31±0,40	4,87±0,18	12,31±0,19
SiO <sub>2</sub> -PVA	22,76±0,05	20,70±0,07	4,14±1,31	5,44±0,22	11,12±1,30

Conforme mostrado na Tabela 5.1, todos os suportes híbridos forneceram massas semelhantes ao final de cada batelada, tanto na forma de pastilha, quanto após a etapa de moagem. A diferença mais marcante foi verificada com relação ao suporte SiO<sub>2</sub>-HEC que forneceu menor massa na granulometria de 42 mesh e maior massa na granulometria superior a 60 mesh quando comparado aos outros 3 suportes, sugerindo maior fragilidade desse compósito em relação aos outros suportes.

Apesar desta diferença, todos os suportes apresentaram proporções similares no valor granulométrico de interesse, que é a porção retida na granulometria de 60 mesh, sugerindo que a substituição do PVA pelos outros compostos orgânicos não interferiu no rendimento em massa do preparo dos suportes híbridos.

## **5.2. Caracterização dos suportes híbridos preparados**

### **5.2.1. Análise morfológica dos suportes**

As características texturais derivadas dos experimentos de adsorção/dessorção dos suportes de SiO<sub>2</sub>-βCD, SiO<sub>2</sub>-CMC, SiO<sub>2</sub>-HEC e SiO<sub>2</sub>-PVA pelo método BET estão apresentadas na Tabela 5.2.

Observa-se que os valores de área superficial específica, volumes específicos dos poros e diâmetro médio dos poros para todos os suportes híbridos apresentaram valores próximos. Desta forma, em termos de propriedades texturais, conclui-se que os suportes de SiO<sub>2</sub>-βCD, SiO<sub>2</sub>-CMC e SiO<sub>2</sub>-HEC podem ser uma alternativa promissora para imobilização de enzimas em substituição ao SiO<sub>2</sub>-PVA, com regular sucesso.

**Tabela 5.2.** – Área superficial específica, volume de poros e diâmetro médio de poro para os suportes de SiO<sub>2</sub>-βCD, SiO<sub>2</sub>-CMC, SiO<sub>2</sub>-HEC e SiO<sub>2</sub>-PVA.

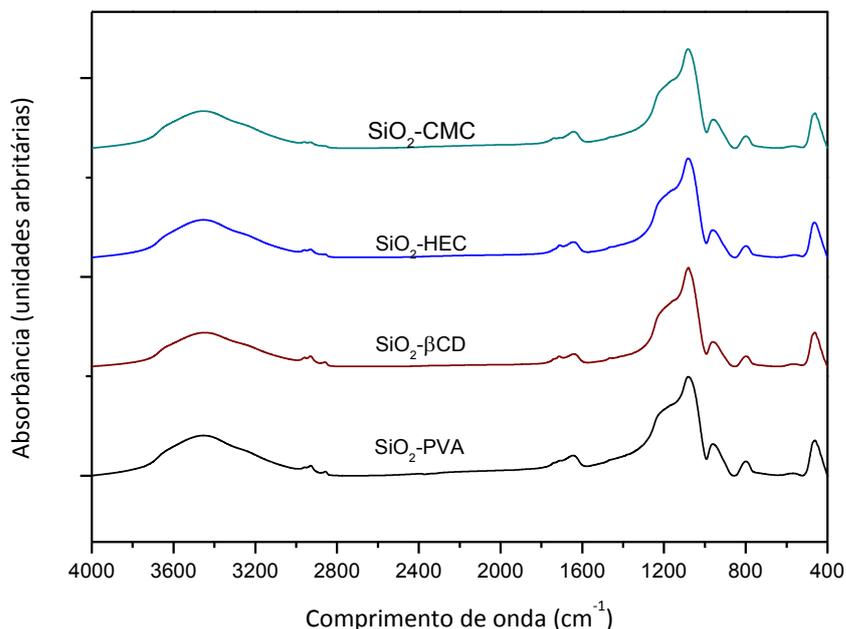
Suporte	Área superficial específica (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Volume específico dos poros (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	Diâmetro médio dos poros (Å)
SiO <sub>2</sub> -βCD	450,5	0,3614	32,087
SiO <sub>2</sub> -CMC	361,6	0,2492	27,568
SiO <sub>2</sub> -HEC	490,5	0,3522	28,718
SiO <sub>2</sub> -PVA	529,7	0,4391	33,161

### 5.2.2. Análise na região do infravermelho dos suportes

Informações sobre a orientação das moléculas dos suportes foram obtidas por espectroscopia na região do infravermelho, e são demonstradas na Figura 5.1.

Os espectros apresentaram uma banda larga na região de 3400 cm<sup>-1</sup> com um ombro em 3250 cm<sup>-1</sup>, assim como um pico em 1640 cm<sup>-1</sup>, que foram atribuídas ao grupamento O-H de hidroxilas ligadas às cadeias poliméricas dos suportes. O grupamento O-H é proveniente da água de hidratação e de cristalização. Outros picos intensos em 450 cm<sup>-1</sup>, assim como em 1090 cm<sup>-1</sup> estão associadas com as vibrações de estiramento simétricas e assimétricas da sílica, respectivamente. A presença das ligações características de Si-O-Si mostraram a formação bem sucedida do material híbrido a base de sílica. A existência de grupos livres de Si-OH associados com o pico a 950 cm<sup>-1</sup> são devidos à reação incompleta de condensação das unidades disponíveis de silanol. Esses grupos de hidroxila livres atuam de maneira efetiva na funcionalidade do material híbrido preparado a base de sílica. As deformações simétricas dos grupos -CH<sub>3</sub> e -CH<sub>2</sub> são mostradas no pico de 2980 cm<sup>-1</sup>. A presença de grupos livres reativos (N-H e -OH) estão associadas a região de 3400 cm<sup>-1</sup>. Ligações específicas de C = C estão associadas ao pico em 1640 cm<sup>-1</sup> (TODOROVA; CHERNEV; DJAMBAZOV, 2014; NYQUIST; KAGEL, 1997).

**Figura 5.1.** – Espectros na região do infravermelho das matrizes híbridas



Fonte: próprio autor

### 5.2.3. Difração de raios-X dos suportes

A caracterização estrutural foi realizada a partir da difração de raios-X, nesta técnica uma frente de ondas passa através de fendas cuja separação é comparável ao comprimento de onda  $\lambda$  da radiação. A técnica de medida difração de raios-X é baseada na interação da radiação eletromagnética de comprimento de onda  $\lambda$  ( $\approx 0,1$  nm) com planos de átomos do sólido cristalino.

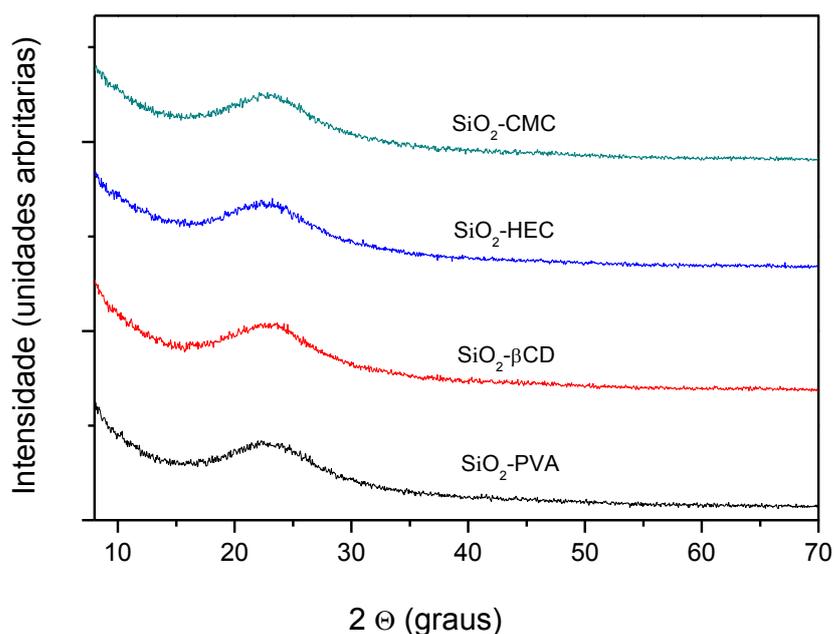
Os materiais com arranjo cristalino e repetitivo apresentam difratogramas contendo picos e reflexões bem definidas. Por outro lado, os materiais amorfos não possuem um arranjo cristalino regular e, portanto não apresentam difratogramas com reflexões definidas (CULLITY, 2001).

Os difratogramas ilustrados na Figura 5.2 são referentes aos suportes híbridos de SiO<sub>2</sub>-CMC, SiO<sub>2</sub>-HEC, SiO<sub>2</sub>- $\beta$ CD e SiO<sub>2</sub>-PVA. Os difratogramas obtidos a partir dos suportes híbridos apresentam uma expressiva largura em 23° (2 $\theta$ ), indicando formação de estruturas predominantemente amorfas pela presença da sílica (KIM et al., 2003). A formação de um microambiente amorfo mostra que os suportes são formados por uma rede não uniforme e com um número considerável de interstícios, ideal para o processo de imobilização de enzimas (FAN et al., 2006). Uma distribuição homogênea do componente

orgânico na matriz inorgânica evita a formação de agregados de enzima, conforme constatado por Abbehausen et al., 2011.

De forma generalizada, os difratogramas mostraram o mesmo perfil e as resoluções das linhas espectrais apresentaram pouco ruído. A forma e largura dos picos indicaram que há fase amorfa em todas as matrizes híbridas.

**Figura 5.2.** – Difratometria de Raios X das matrizes híbridas



Fonte: próprio autor

#### 5.2.4. Testes de afinidade do suporte pelo glicerol

Os suportes foram avaliados quanto à capacidade de adsorção do glicerol e a recuperação mássica. Os ensaios de adsorção foram realizados em banho ultrassônico a 30 °C por 2 horas, utilizando uma solução alcoólica de glicerol 5% (m/v) e uma proporção fixa de adsorventes de 5% em massa seca. A Tabela 5.3 apresenta os valores gerados pela atuação dos suportes na remoção do glicerol e na recuperação mássica.

**Tabela 5.3.** – Adsorção de glicerol e porcentagens de recuperação mássica de solução empregando diferentes matrizes híbridas

<b>Suporte</b>	<b>Glicerol adsorvido (%)</b>	<b>Recuperação mássica (%)</b>
SiO <sub>2</sub> -βCD	4,13±0,31	91,41
SiO <sub>2</sub> -CMC	14,45±0,80	91,86
SiO <sub>2</sub> -HEC	8,98±1,16	92,32
SiO <sub>2</sub> -PVA	10,92±0,19	92,66

Como demonstrado na Tabela 5.3 todos os suportes testados apresentaram elevado percentual de recuperação mássica, variando entre 91,41 a 92,66 %, tendo este parâmetro menor importância na escolha de uma determinada matriz híbrida. Entretanto, os valores de glicerol adsorvido variaram numa ampla faixa, apresentando valores de 4,13 a 14,45 %.

De acordo com a literatura (COSTA-SILVA, 2013), o glicerol forma uma camada na superfície da lipase imobilizada. Os resultados obtidos mostraram que a matriz híbrida de SiO<sub>2</sub>-CMC apresentou comparativamente maior afinidade pelo glicerol, em razão das propriedades hidrofílicas do composto de carboximetilcelulose. Por outro lado, a matriz híbrida de SiO<sub>2</sub>-βCD demonstrou a menor afinidade, sugerindo que a β-ciclodextrina aumentou o caráter hidrofóbico da matriz híbrida, em função de possíveis grupos apolares presentes neste composto.

Verifica-se, portanto, que a substituição do poli (Álcoolvinílico) por β-ciclodextrina reduziu em até 50% a habilidade do suporte híbrido em absorver glicerol. Os componentes derivados de celulose apresentaram resultados similares aos obtidos com o poli (Álcoolvinílico). Em termos de afinidade pelo glicerol os resultados obtidos permitiram a classificação dos suportes híbridos na seguinte ordem crescente: SiO<sub>2</sub>-CMC > SiO<sub>2</sub>-PVA > SiO<sub>2</sub>-HEC > SiO<sub>2</sub>-βCD.

### **5.3. Caracterização dos derivados imobilizados preparados**

#### **5.3.1. Imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em diferentes suportes híbridos**

Adotando o procedimento descrito no item 4.3.3, os suportes híbridos previamente ativadas com epícloridrina, foram utilizados para imobilizar a lipase de *B. cepacia*. Especial atenção foi dada ao procedimento experimental de imobilização para se obter derivados imobilizados com teores de umidade inferiores a 10%, tendo em vista que

elevados teores de água podem favorecer a reação de hidrólise, reduzindo assim a eficiência das reações de síntese.

A Tabela 5.4 apresenta os resultados de atividade hidrolítica dos derivados imobilizados obtidos, bem como os valores de rendimento de imobilização.

**Tabela 5.4.** – Parâmetros obtidos da imobilização da lipase *B. cepacia* em diferentes suportes híbridos.

<b>Suporte</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Atividade hidrolítica (Ug<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rendimento de imobilização (%)</b>
SiO <sub>2</sub> -βCD	9,78	1636,8 ± 106,3	63,4± 6,9
SiO <sub>2</sub> -CMC	8,73	1457,4 ± 129,7	56,2± 0,2
SiO <sub>2</sub> -HEC	8,33	1451,0 ± 132,7	56,0± 4,6
SiO <sub>2</sub> -PVA	9,09	1661,26±120,2	67,9± 0,7

Atividade da lipase livre 10296±255 Ug<sup>-1</sup>

Nas condições adotadas verifica-se uma pequena variação entre a interação da enzima de *Burkholderia cepacia* e os suportes testados, devido provavelmente à diferença da conformação estrutural de cada suporte. Os valores de atividade hidrolítica variaram entre 1451 a 1661,26 U g<sup>-1</sup>, correspondendo a rendimentos de imobilização entre 56,0 a 67,9%. Os rendimentos mais elevados foram obtidos para os sistemas imobilizados nos suportes SiO<sub>2</sub>-βCD (63,4± 6,9 %) e SiO<sub>2</sub>-PVA (67,9± 0,7%).

### 5.3.2. Análise morfológica dos derivados imobilizados

As características texturais derivadas dos experimentos de adsorção/dessorção dos derivados imobilizados em SiO<sub>2</sub>-βCD, SiO<sub>2</sub>-CMC, SiO<sub>2</sub>-HEC e SiO<sub>2</sub>-PVA pelo método BET estão apresentadas na Tabela 5.5.

Observa-se que para os derivados imobilizados os valores obtidos de área superficial específica, volumes específicos dos poros e diâmetro médio dos poros apresentaram valores próximos. Verifica-se ainda que a lipase imobilizada na matriz SiO<sub>2</sub>-βCD apresentou os resultados mais próximos em termos de área superficial específica e volume específico dos poros com relação a lipase imobilizada matriz SiO<sub>2</sub>-PVA, e um valor maior de diâmetro médio dos poros.

O diâmetro médio dos poros dos derivados imobilizados é considerado um dos parâmetros mais importantes, podendo afetar a eficiência catalítica, isto é, quanto maior for

o diâmetro médio dos poros maior será o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada no suporte, minimizando assim defeitos difusionais e impedimentos estéricos do biocatalisador.

**Tabela 5.5.** – Área superficial específica, volume de poros e diâmetro médio de poro para a lipase de *B. cepacia* imobilizada nos suportes híbridos SiO<sub>2</sub>-βCD, SiO<sub>2</sub>-CMC, SiO<sub>2</sub>-HEC e SiO<sub>2</sub>-PVA.

Biocatalisador	Área superficial específica (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Volume específico dos poros (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	Diâmetro médio dos poros (Å)
Lipase-SiO <sub>2</sub> -βCD	312,3	0,2780	35,617
Lipase-SiO <sub>2</sub> -CMC	209,5	0,1326	25,319
Lipase-SiO <sub>2</sub> -HEC	206,1	0,1573	30,516
Lipase-SiO <sub>2</sub> -PVA	309,4	0,2010	25,987

Dessa forma, em termos de propriedades texturais, conclui-se que as matrizes de SiO<sub>2</sub>-βCD, SiO<sub>2</sub>-CMC e SiO<sub>2</sub>-HEC podem ser uma alternativa promissora a matriz de SiO<sub>2</sub>-PVA para a imobilização de lipases.

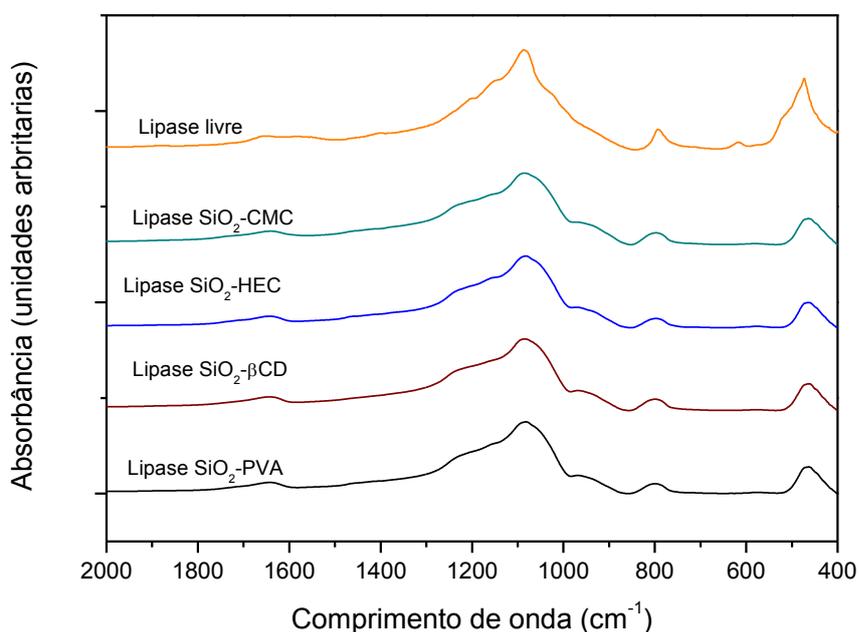
### 5.3.3. Análise de infravermelho dos derivados imobilizados

A espectroscopia no infravermelho foi utilizada para verificar a eficiência do método de imobilização da lipase *B. cepacia* nos diferentes tipos de suportes testados. Os espectros no infravermelho obtidos para a lipase *B. cepacia* livre e os derivados imobilizados são mostrados na Figura 5.3.

O pico característico da lipase *B. cepacia* livre, que envolve a banda de 1640 cm<sup>-1</sup> (grupo aminos primários), esta exibido na Figura 5.3, e de acordo com as bandas descritas na literatura (BOSLEY; PELLOW, 1997). Estes picos também se encontram presentes nos espectros dos derivados imobilizados, apresentando um comportamento semelhante para todos os suportes utilizados. Pode-se ainda observar a presença de bandas que indicam a deformação axial Si-O-Si (810 cm<sup>-1</sup> e 950 cm<sup>-1</sup>).

Verifica-se nas curvas um comportamento semelhante para todos os derivados imobilizados. Observa-se, porém, que ocorre um decaimento nos picos de 480 cm<sup>-1</sup> e 1090 cm<sup>-1</sup> da lipase *B. cepacia* para todos os derivados imobilizados mostrando uma conformação estrutural um pouco diferente na orientação das moléculas após a imobilização.

**Figura 5.3.** – Espectros na região do infravermelho da lipase de *B. cepacia* na forma livre e imobilizada nos suportes híbridos



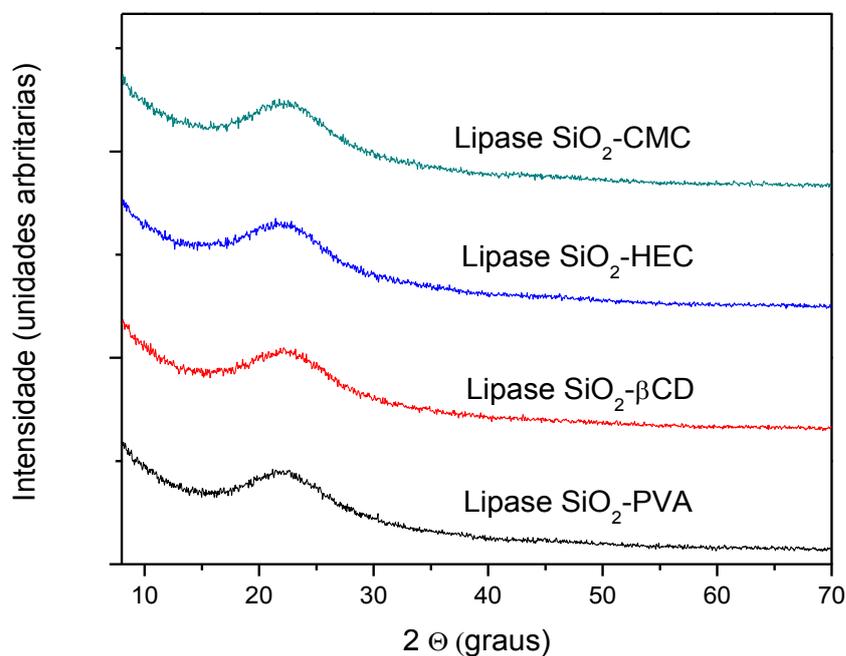
Fonte: próprio autor

#### 5.3.4. Difração de raios-X dos derivados imobilizados

A caracterização estrutural a partir da difração de raios-X também foi utilizada para verificar a eficiência do método de imobilização da lipase *B. cepacia* nos diferentes tipos de suportes testados. Os espectros no infravermelho obtidos para a lipase *B. cepacia* para os derivados imobilizados são mostrados na Figura 5.4.

Os difratogramas obtidos a partir dos derivados imobilizados apresentaram os mesmos perfis que os difratogramas obtidos para os suportes híbridos, indicando que não ocorreu alteração no arranjo estrutural após a etapa de imobilização. De forma generalizada, os difratogramas mostraram o mesmo perfil e as resoluções das linhas espectrais apresentaram pouco ruído. A forma e largura dos picos indicaram que há fase amorfa em todos os derivados imobilizados.

**Figura 5.4.** – Difratometria de Raios X da lipase de *B.cepacia* immobilizada nos suportes híbridos



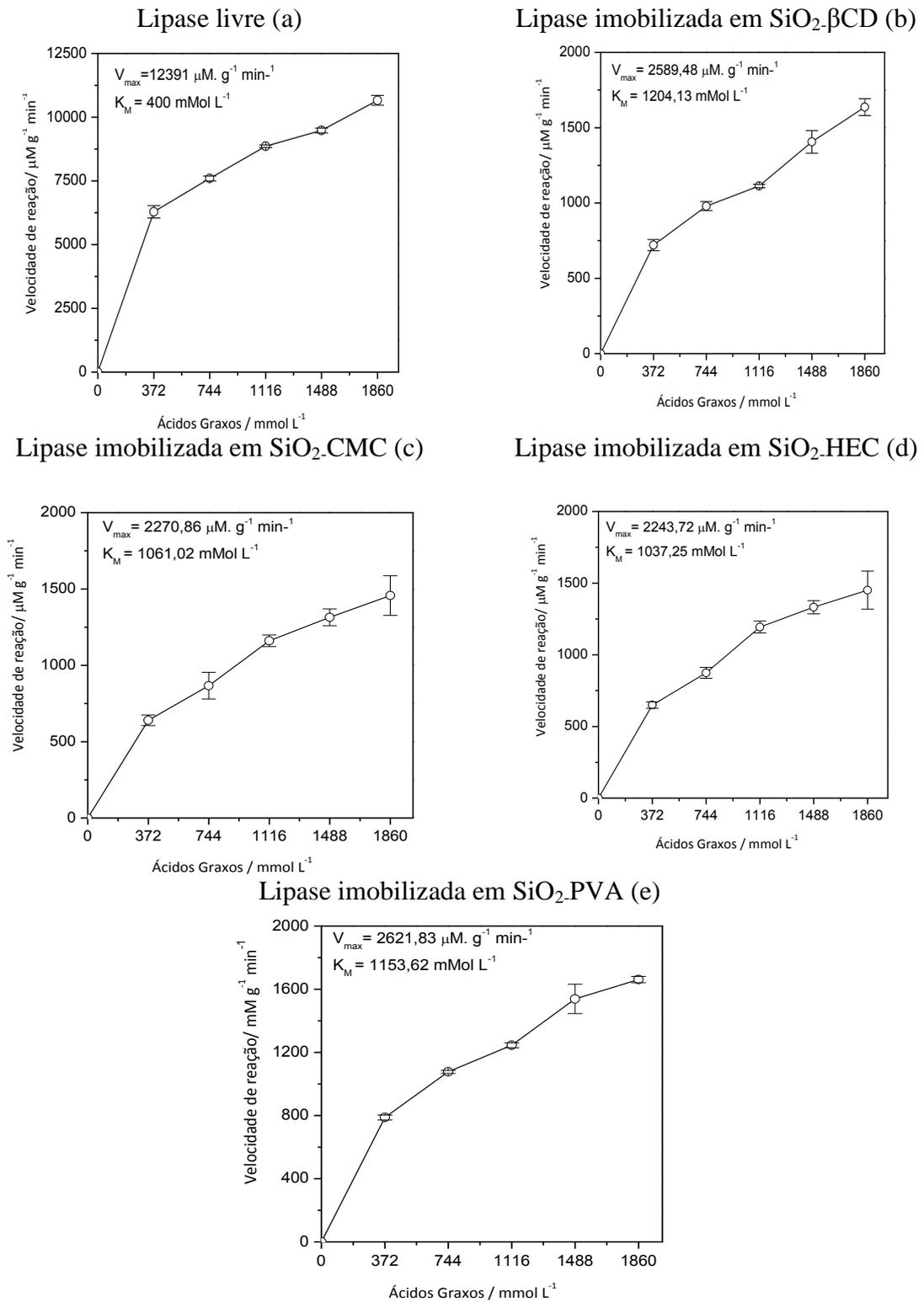
Fonte: próprio autor

### 5.3.5. Parâmetros cinéticos dos derivados immobilizados

O efeito da concentração do substrato sobre a atividade das preparações de lipase immobilizada foi investigado e comparado com o da lipase livre, sob as mesmas condições de reação, empregando emulsões de azeite de oliva em diferentes proporções (10-50% m/v), correspondendo a concentrações em ácidos graxos variando entre 372 a 1860 mM/L. Os ensaios foram realizados em pH 7,0 e temperatura de 37 °C, e os valores obtidos são fornecidos no Apêndice B. Os perfis das curvas de velocidade de reação das preparações de lipase livre e immobilizada em função da concentração de ácido graxo são apresentados na Figura 5.5.

Verifica-se que o aumento na concentração do substrato de 372 para 1116 mM resultou em um incremento significativo nas velocidades de reação para todas as preparações de lipase ensaiadas. Para concentrações de substrato superiores a 1488 mM, a atividade enzimática da lipase tornou-se essencialmente independente da concentração do substrato, seguindo uma cinética do tipo Michaelis-Menten. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  aparentes foram calculados com o auxílio do programa Origin 8, conforme apresentados na Tabela 5.6.

**Figura 5.5.** – Perfis das curvas de velocidade de reação da lipase *B. cepacia* livre (a) e dos derivados imobilizados em (b) SiO<sub>2</sub>-βCD, (c) SiO<sub>2</sub>-CMC, (d) SiO<sub>2</sub>-HEC e (e) SiO<sub>2</sub>-PVA



Fonte: próprio autor

Os valores de  $K_m$  das preparações de lipase imobilizada foram entre 2,5 a 3 vezes superior ao obtido pela lipase livre, indicando mudança da afinidade da lipase pelo substrato, na forma imobilizada, independentemente do tipo de suporte testado.

O aumento dos valores de  $K_m$  e a diminuição dos valores de  $V_{max}$  dos derivados imobilizados quando comparados aos da enzima livre pode ser explicado pelo fato de que enzimas imobilizadas normalmente dificultam a transferência de massa dos reagentes para a superfície (difusão externa) e para os poros (difusão interna) provocando assim a perda de afinidade com o substrato quando comparados à enzima livre (VILLEUNEVE et al., 2000).

Esse comportamento é geralmente observado para enzimas imobilizadas em função dos efeitos de interação enzima e suporte e dependem do processo de imobilização. Segundo Georgio; Hubbell (1993), três formas de interação podem ser distinguidas: (1) a ligação da proteína na matriz pode resultar em mudanças conformacionais que afetam a função catalítica; (2) o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima pode ser afetado por impedimento estérico do suporte e; (3) as propriedades do suporte, como sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica, ou a presença de cargas fixas que afetam o modo de ação da enzima.

**Tabela 5.6.** – Parâmetros cinéticos da lipase *B. cepacia* livre e imobilizada nos diferentes suportes híbridos

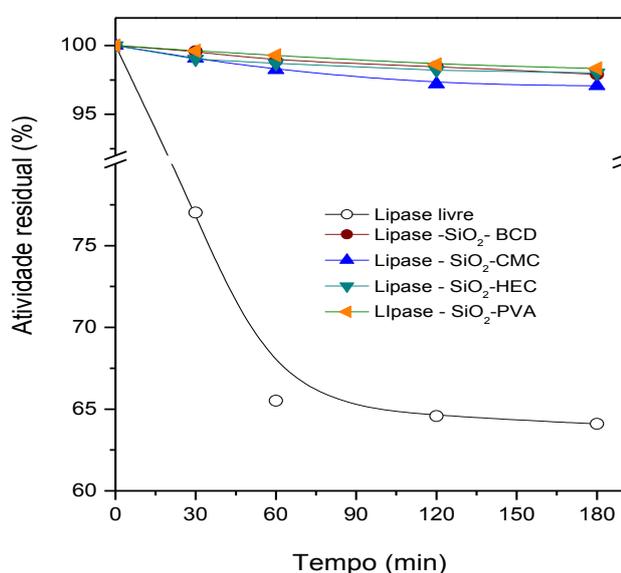
<b>Biocatalisador</b>	<b><math>K_m</math> (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>V_{max}</math> U/g</b>
Lipase livre	400	12391
Lipase-SiO <sub>2</sub> -βCD	1204	2590
Lipase-SiO <sub>2</sub> -CMC	1061	2271
Lipase-SiO <sub>2</sub> -HEC	1037	2244
Lipase-SiO <sub>2</sub> -PVA	1153	2622

Entre todos os derivados imobilizados testados, a lipase imobilizada na matriz SiO<sub>2</sub>-HEC foi que forneceu o menor valor de  $K_m$  de 1037,25 mmol L<sup>-1</sup> apresentando assim maior afinidade da enzima pelo substrato, quando comparado as outras matrizes.

### 5.3.6. Estabilidade térmica da lipase de *B. cepacia* livre e imobilizada nos diferentes tipos de suporte

Experimentos foram ainda efetuados para estimar a constante de inativação térmica ( $k_d$ ) e o tempo de meia-vida da *B. cepacia* livre e imobilizada nos diversos suportes híbridos. Os testes de estabilidade térmica foram efetuados conforme a metodologia descrita no item 4.4.3 e os valores obtidos são fornecidos no Apêndice C. Os perfis das curvas de estabilidade térmica das preparações de lipase livre e imobilizada estão ilustrados na Figura 5.6.

**Figura 5.6.** – Estabilidade térmica da lipase *B. cepacia* livre e dos derivados imobilizados nos suportes híbridos SiO<sub>2</sub>-βCD, SiO<sub>2</sub>.CMC, SiO<sub>2</sub>.HEC e SiO<sub>2</sub>-PVA



Fonte: próprio autor

Verifica-se pelo perfil das curvas, que a atividade residual da lipase na forma solúvel foi reduzida bruscamente em 60 min de incubação, resultando numa perda total de 35 % da sua atividade inicial ao final de 180 min. Por outro lado, os valores de atividade residual dos derivados imobilizados permaneceram praticamente constantes, apresentando perdas mínimas de aproximadamente 2-3% das atividades iniciais, pelo mesmo período de tempo. Esses dados indicam que o procedimento de imobilização atuou no sentido de aumentar a estabilidade térmica da lipase *B. cepacia*.

A partir desses resultados, calculou-se a constante de inativação térmica ( $k_d$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ). O tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial da enzima (Tabela 5.7).

**Tabela 5.7.** – Estabilidade térmica dos derivados de *B. cepacia* imobilizados em diferentes tipos de suporte

<b>Biocatalisador</b>	<b>Atividade relativa (%)</b>	<b><math>K_d</math> (<math>h^{-1}</math>)</b>	<b>Tempo de meia-vida (h)</b>	<b>Aumento da estabilidade térmica</b>
Lipase-SiO <sub>2</sub> -βCD	97,90	0,007	97,6	21
Lipase-SiO <sub>2</sub> -CMC	97,07	0,01	70,0	15
Lipase-SiO <sub>2</sub> -HEC	98,01	0,007	103,5	22
Lipase-SiO <sub>2</sub> -PVA	98,33	0,006	123,8	26

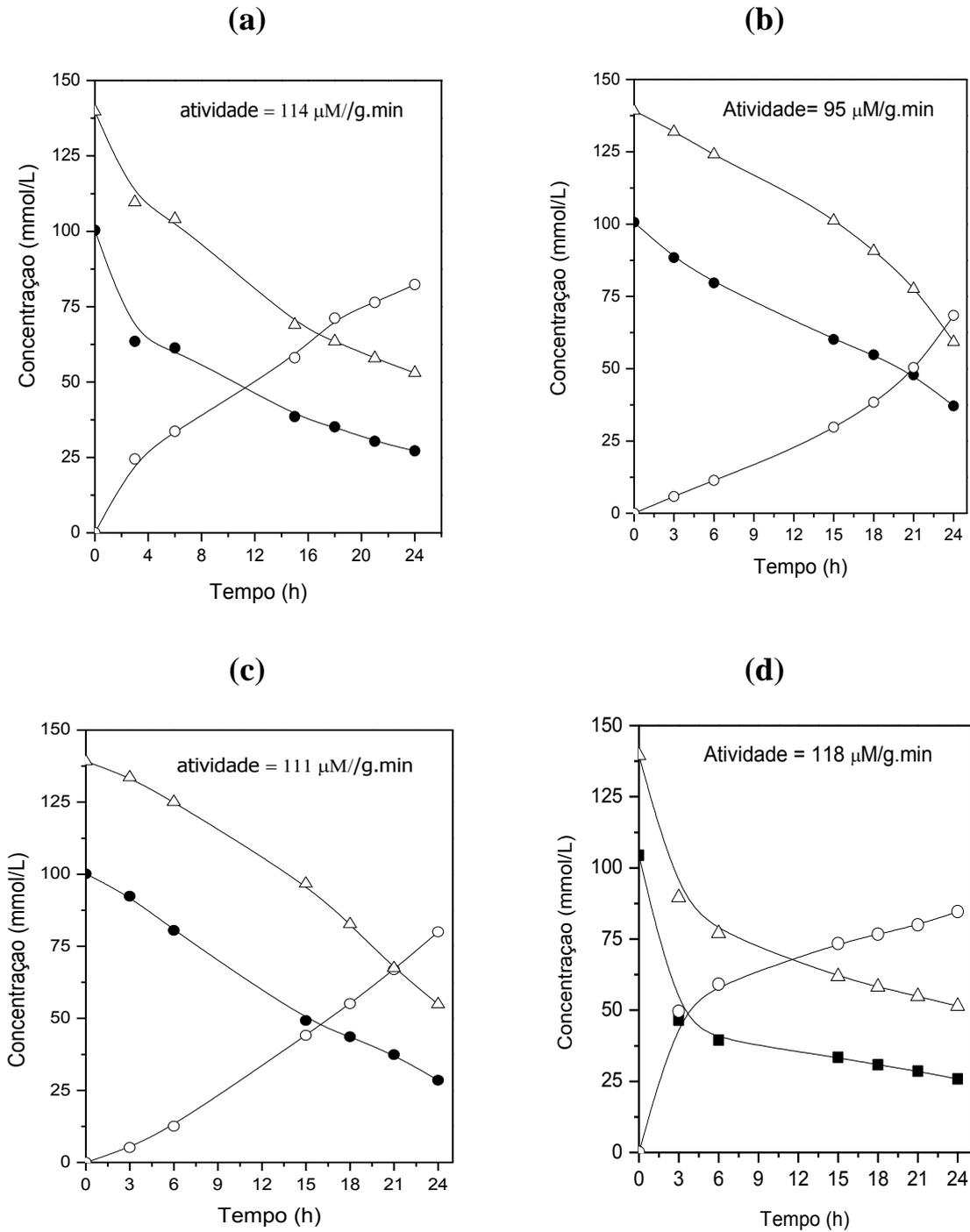
Lipase livre:  $K_d = 0,15 h^{-1}$  e  $t_{1/2} = 4,67 h$

Esses parâmetros confirmam a influência positiva do método de imobilização na estabilização térmica da lipase, revelando aumentos da estabilidade térmica entre 15 a 26 das preparações de lipase imobilizada nos suportes híbridos em relação a lipase na forma livre. A estabilidade térmica mais elevada foi constatada para a lipase imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA ( $t_{1/2} = 123,8 h$ ) e a menor para o derivado imobilizado em SiO<sub>2</sub>-CMC ( $t_{1/2} = 70,0 h$ ). Entretanto, verifica-se que a lipase imobilizada nas matrizes híbridas SiO<sub>2</sub>-HEC e SiO<sub>2</sub>-βCD também apresentaram elevada estabilidade térmica.

#### 5.4. Aplicação das preparações de lipases imobilizadas em meio orgânico

Para testar a atividade catalítica dos derivados imobilizados em meio orgânico, utilizou-se a síntese do butirato de butila a partir do *n*-butanol e ácido butírico, avaliando a cinética de conversão dos materiais de partida em éster. As sínteses foram realizadas conforme metodologia descrita no item 4.4.2.5. O perfil de formação do butirato de butila e consumo dos materiais de partida estão apresentados na Figura 5.7 (a-d), tomando por base os dados descritos no Apêndice D.

**Figura 5.7.** – Perfil do consumo do butanol (●) e ácido butírico (▽) e formação do butirato de butila (○) na reação de esterificação mediada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada nos suportes híbridos: (a) SiO<sub>2</sub>-βCD, (b) SiO<sub>2</sub>-CMC, (c) SiO<sub>2</sub>- HEC, (d) SiO<sub>2</sub>-PVA (40 °C, 180 rpm).



Fonte: próprio autor

As reações apresentaram conversões satisfatórias, e em 24h de reação o álcool (reagente limitante) foi consumido parcialmente, sendo o éster formado na mesma proporção molar, como esperado pela estequiometria da reação. A menor concentração de butirato de butila foi alcançada na reação catalisada pelo derivado imobilizado em SiO<sub>2</sub>-CMC (9,8 g L<sup>-1</sup>). Nas reações catalisadas pelos derivados imobilizados em SiO<sub>2</sub>-βCD, SiO<sub>2</sub>-HEC e SiO<sub>2</sub>-PVA [Figuras 5.4 (b), (c) e (d)] o teor de éster formado foi incrementado para valores superiores a 11,5 g L<sup>-1</sup>.

A Tabela 5.8 apresenta os valores de atividades de esterificação, conversão molar de butanol e produtividade obtidos nas reações catalisadas pelos quatro derivados imobilizados testados.

**Tabela 5.8.** – Atividade de esterificação, conversão molar de butanol e produtividade na síntese do butirato de butila mediada por diferentes derivados imobilizados.

<b>Biocatalisador</b>	<b>Atividade de esterificação (μM g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Conversão molar butanol (%)</b>	<b>Produtividade (g<sub>éster</sub>. L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>
Lipase-SiO <sub>2</sub> -βCD	114	73,3	0,5
Lipase-SiO <sub>2</sub> -CMC	95	63,1	0,4
Lipase-SiO <sub>2</sub> -HEC	111	71,5	0,5
Lipase-SiO <sub>2</sub> -PVA	118	75,2	0,5

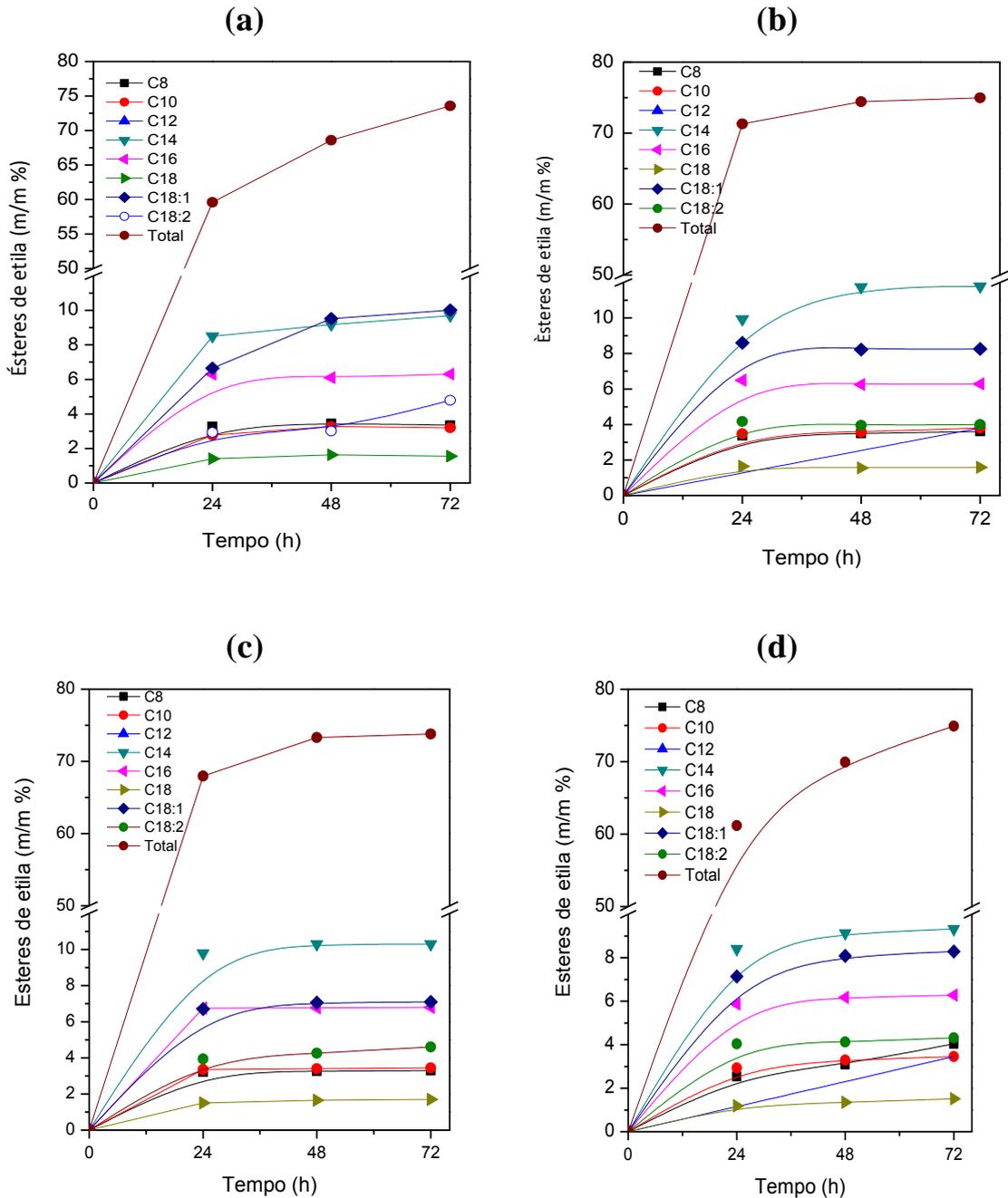
Como demonstrado na Tabela 5.8, todos os derivados imobilizados tem potencial para catalisar a reação de esterificação, porém com diferentes velocidades de reação. A lipase de *B. cepacia* imobilizada no suporte de SiO<sub>2</sub>-PVA apresentou o melhor resultado, obtendo uma atividade de esterificação de 118 μM g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> enquanto que a mesma enzima quando imobilizada em SiO<sub>2</sub>-CMC forneceu uma atividade de esterificação de 95 μM g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, indicando diferente afinidade da lipase pelo substrato, na forma imobilizada para os diferentes tipos de suportes utilizados.

### 5.5. Síntese de ésteres de etila por transesterificação

Os ensaios de transesterificação foram efetuados de acordo com as condições descritas no item 4.3.3 empregando-se as preparações de *B. cepacia* imobilizada nos diferentes tipos de suporte híbrido e os valores obtidos são fornecidos no Apêndice E. Nesta série de ensaios, as reações foram monitoradas em termos de ésteres de etila

formados em função do tempo de reação, conforme mostrado na Figura 5.8 (a-d) e Tabela 5.9.

**Figura 5.8.** – Perfil de formação dos ésteres de etila a partir da reação de transesterificação do óleo de palmiste com etanol, catalisada pela lipase *B. cepacia* imobilizada em diferentes suportes híbridos: (a) SiO<sub>2</sub>-βCD, (b) SiO<sub>2</sub>-CMC, (c) SiO<sub>2</sub>-HEC, (d) SiO<sub>2</sub>-PVA



Fonte: próprio autor

Os rendimentos de transesterificação foram calculados com base nos dados obtidos por cromatografia de fase gasosa e confirmados por cromatografia líquida de alta eficiência (tomando por base os teores de mono, diacilgliceróis). Os valores de viscosidade e a densidade das amostras purificadas foram também determinados (Tabela 5.10).

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que independente do derivado imobilizado as reações apresentaram perfil cinético semelhante com relação à formação dos principais ésteres de ácidos graxos presentes no óleo de palmiste, com destaque para os ésteres de laurato e miristato de etila, que são os ácidos graxos presentes em maior proporção nessa matéria-prima lipídica (Tabela 5.9). Entretanto, a velocidade de reação sofreu interferência do tipo de suporte híbrido empregado na imobilização da lipase de *B. cepacia*.

**Tabela 5.9.** – Perfil dos ésteres de etila nas amostras de biodiesel obtidas por catálise

Biocatalisador	%g éster/g amostra								m/m éster (%)
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	
Lipase-SiO <sub>2</sub> -βCD	3,3	3,2	35,7	9,7	6,3	1,6	9,0	4,8	73,56
Lipase-SiO <sub>2</sub> CMC	3,5	3,5	35,3	9,8	6,8	1,6	9,1	4,8	73,87
Lipase-SiO <sub>2</sub> -HEC	3,3	3,4	35,7	10,3	6,8	1,7	7,1	4,3	73,80
Lipase-SiO <sub>2</sub> -PVA	3,5	3,4	35,9	9,6	6,3	1,5	8,3	4,3	73,90

As velocidades de reação mais elevadas foram observadas para lipase imobilizada no suporte híbrido composto de sílica e derivados de celulose, alcançando em ambos os casos conversões máximas do óleo de palmiste em ésteres de etila em 48 horas, enquanto os derivados imobilizados nos suportes SiO<sub>2</sub>-βCD e SiO<sub>2</sub>-PVA requereram 72 horas para atingir o mesmo grau de conversão.

Tomando por base os resultados alcançados na transesterificação etanólica do óleo de palmiste, foi possível realizar uma avaliação comparativa da atuação dos biocatalisadores tomando como parâmetros: conversão em ésteres (CE%), teores residuais de MAG e DAG, bem como os valores de viscosidade e densidade do biodiesel. Essas propriedades das amostras de biodiesel purificadas são apresentadas na Tabela 5.10. A concentração de ésteres (CE) e os níveis de mono, diacilgliceróis (MAG, DAG) foram quantificados pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Com relação à viscosidade cinemática obtida no produto final de cada reação (Apêndice F), verifica-se que quanto maior o rendimento de transesterificação maior a redução da viscosidade da matéria-prima lipídica precursora.

**Tabela 5.10.** – Propriedades das amostras de biodiesel purificadas

<b>Biocatalisador</b>	<b>Densidade (kg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>Viscosidade (mm<sup>2</sup>/s)</b>	<b>MAG (%)</b>	<b>DAG (%)</b>	<b>CE (%)</b>
Lipase-SiO <sub>2</sub> -βCD	870	4,01	2,7	0	97,29
Lipase-SiO <sub>2</sub> -CMC	870	4,01	2,8	0	97,15
Lipase-SiO <sub>2</sub> -HEC	869	3,92	2,1	0	97,93
Lipase-SiO <sub>2</sub> -PVA	870	3,84	1,7	0	98,30

Os valores de viscosidade cinemática das amostras geradas nas reações catalisadas pelas lipases imobilizadas em SiO<sub>2</sub>-PVA, SiO<sub>2</sub>-CMC, SiO<sub>2</sub>-HEC e SiO<sub>2</sub>-βCD encontram-se dentro da faixa limite especificada pela legislação da ANP (3,0-6,0 mm<sup>2</sup>/s), com valores que variaram de 3,84 a 4,01 mm<sup>2</sup>/s. Os valores de densidade das amostras geradas também se encontram dentro da faixa limite especificada pela legislação da ANP (850-900 kg/m<sup>3</sup>), com valores muito próximos de 869 a 870 kg/m<sup>3</sup>.

Entretanto, os níveis obtidos de MAG gerados nas reações catalisadas pela lipase imobilizadas em SiO<sub>2</sub>-PVA, SiO<sub>2</sub>-CMC, SiO<sub>2</sub>-HEC e SiO<sub>2</sub>-βCD são superiores ao limite especificada pela legislação da ANP (max 0,8), tendo apresentado valores entre 1,7 e 2,85.

È provável que a maior habilidade do sistema imobilizado em SiO<sub>2</sub>-PVA em adsorver o glicerol tenha auxiliado na redução do teor de MAG no produto purificado.

## 6. CONCLUSÕES

Em decorrência da elevada afinidade do suporte híbrido SiO<sub>2</sub>-PVA pelo glicerol, o presente trabalho teve como objetivo selecionar componentes orgânicos para obtenção de compósitos híbridos pela técnica sol-gel visando avaliar o efeito do agente orgânico na evolução do sol para gel e nas propriedades finais dos suportes para imobilizar a lipase microbiana de *Burkholderia cepacia*. Foram testados três compostos orgânicos β-ciclodextrina (βCD), carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC) e os resultados obtidos foram comparados com o comportamento já estabelecido para o poli (Álcoolvinílico) (PVA). Os resultados obtidos foram promissores e permitiram concluir que:

- ✓ Todos os compostos orgânicos testados em presença do precursor (TEOS) formaram géis em meio ácido, resultando em géis poliméricos, que após a secagem deram origem a uma matriz compacta (SiO<sub>2</sub>-βCD, SiO<sub>2</sub>-CMC e SiO<sub>2</sub>-HEC) com propriedades morfológicas (FTIR, BET e Raio-X) similares as características do híbrido de SiO<sub>2</sub>-PVA.
- ✓ A afinidade das matrizes híbridas pelo glicerol variou numa ampla faixa e foi diretamente dependente do tipo de composto orgânico empregado, permitindo a classificação dos suportes híbridos na seguinte ordem crescente: SiO<sub>2</sub>-CMC > SiO<sub>2</sub>-PVA > SiO<sub>2</sub>-HEC > SiO<sub>2</sub>-βCD.
- ✓ O desempenho dos híbridos de SiO<sub>2</sub>-βCD, SiO<sub>2</sub>-CMC e SiO<sub>2</sub>-HEC como matrizes de imobilização da lipase *B. cepacia* foi altamente satisfatório e forneceu derivados imobilizados ativos tanto em meio aquoso quanto meio não aquoso, e similar ao derivado imobilizado em SiO<sub>2</sub>-PVA.
- ✓ O conjunto de dados obtidos permitiram selecionar o composto orgânico βCD para substituir com vantagens o poli (Álcoolvinílico) no preparo de matrizes híbridas para imobilização da enzima lipase. O menor poder hidrofílico desta matriz em relação às outras matrizes testadas pode ser creditado a estrutura cíclica da βCD que reduziu a capacidade do suporte SiO<sub>2</sub>-βCD em adsorver glicerol, principal subproduto da reação de transesterificação.
- ✓ Testes em processos conduzidos em fluxo contínuo são sugeridos como trabalho futuro para comprovação da eficiência dessa matriz.

## REFERÊNCIAS

ABBEHAUSEN C.; FORMIGA A. L. B.; SABADINI E.; YOSHIDA I. V. P. A  $\beta$ -Cyclodextrin/ siloxane hybrid polymer: synthesis, characterization and inclusion complexes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, p.1867-1876, 2010.

ABIGOR, R. D.; UADIA, T. A.; HAAS, M. J.; JONES, K. C.; OKPEFA, E.; OBIBUZOR, J. U.; BAFOR, M. E. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, part 6, p. 979-981, 2000.

ABIOVE – **Associação brasileira das indústrias de óleos vegetais**. Disponível em: <<http://www.abiove.org.br/>> Acesso em: 28 Maio 2015.

ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Review**, v.42, p. 6406-6436, 2013.

AGROPALMA – **Grupo agropalma**. Disponível em: <<http://www.agropalma.com.br/>> Acesso em: 28 Maio 2015.

ALVES, C. T. **Transesterificação de óleos e gorduras residuais via rotas metálica e etélica utilizando o catalisador aluminato de zinco, em presença ou não de CO<sub>2</sub> supercrítico**. 213p. Dissertação (Doutorado) – Escola Politécnica: Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.

AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, v. 1, p. 57-66, 2007.

AMANO – **Amano enzyme inc**. Disponível em: <<https://www.amano-enzyme.co.jp/>> Acesso em: 15 Julho 2015.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes\\_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml)> Acesso em: 28 Maio 2015.

ASTM - American society for testing and materials **D3838-80**: standard test method for pH of activated carbon. 1999. Disponível em: <http://www.astm.org/DATABASE.CART/HISTORICAL/D3838-80R99.htm>. Acesso em: 10 Outubro 2014.

ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; BADRUDDIN, I. A.; MAHLIA, T. M.; MASJUKI, H. H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070-2093, 2012.

AVNIR, D.; CORADIN, A. T.; LEVC, B. O.; LIVAGEB, J. Recent bio-applications of sol-gel materials. **Journal of Materials Chemistry**, v.16, p. 1013-1030, 2006.

BASTOS, T. X.; MÜLLER, A. A.; PACHECO, N. A.; SAMPAIO, M. N.; ASSAD, E. D.; MARQUES, A. F. S. Zoneamento de riscos climáticos para a cultura do dendzeiro no estado do Pará. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 9, n. 3, p. 564-570, 2001. (Nº Especial: Zoneamento Agrícola).

BONDIOLI, P.; BELLA, L. D. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **European Journal of Lipid and Science Technology**, v. 107, p. 153-157, 2005.

BONO, A.; YING, H. O.; YAN, Y. F.; MUEI, L. C.; SARBATLY, R.; KRISHNAIAH, D. Synthesis and characterization of carboxymethyl cellulose from palm kernel cake. **Advances in Natural and Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 5-11, 2009.

BORGES, M. E.; DÍAZ, L. Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil esterification and transesterification reactions: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 2839-2849, 2012.

BOSLEY, J. A.; PELLOW, A. D. Immobilization of lipases on porous polypropylene: Reduction in esterification efficiency at low loading. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 2, p. 107-111, 1997.

BRUN, N.; BABEAU-GARCIA, A.; ACHARD, M-F.; SANCHEZ, C.; DURAND, F.; LAURENT, G., BIROT, M., DELEUZE, H.; BACKOV, R. Enzyme-based biohybrid foams designed for continuous flow heterogeneous catalysis and biodiesel production. **Energy & Environmental Science**, v. 4, p. 2840-2844, 2011.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, p. 309-319, 1938.

BRUNO, L. M.; COELHO, J. S.; MELO, E. H. M.; LIMA-FILHO, J. L. Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 189-192, 2005.

BRUNSCHWIG, C.; MOUSSAVOU, W.; BLIN, J. Use of bioethanol for biodiesel production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 2, p. 283-301, 2012.

CARVALHO, A. K. F. **Síntese de biodiesel por transesterificação pela rota etílica: comparação do desempenho de catalisadores heterogêneos**. 102p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena: Universidade de São Paulo. Lorena, 2011.

CARVALHO, A. K. F.; DA RÓS, P. C. M.; TEIXEIRA, L. F.; ANDRADE, G. S. S.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Assessing the potential of non-edible oils and residual fat to be used as a feedstock source in the enzymatic ethanolysis reaction. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 485-493, 2013.

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química nova**, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2015.

CERRUTTI, B. M.; FROLLINI, E. Carboximetilcelulose como agente de estabilização de suspensões cerâmicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 10., 2009.

CHRISTOPHER, L.P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V.P. Enzymatic biodiesel: challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014.

COSTA-SILVA, W. **Produção enzimática de biodiesel a partir de óleos láuricos em reatores de leito fixo duplo estágio incorporando coluna extratora do glicerol formado como subproduto**. 133p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena: Universidade de São Paulo. Lorena, 2013.

CULLITY, B. D.; STOCK, S.R., STOCK, S. **Elements of X ray Diffraction**. 3rd Ed. New York: Prantice Hall: 2001.664 p. ISBN 10: 0201610914, ISBN-139780201610918.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: a critical overview on the current status and perspectives at the academy and industry. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5508–5516, 2010.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C. Modificação Enzimática de óleos e gorduras para a obtenção de biocombustíveis e produtos de interesse do setor alimentício. In: MARSAIOLI, A. J.; PORTO, A. L. M. (Org.). **Biocatálise e Biotransformação: fundamentos e aplicações**. 1 ed. São Paulo: Schoba, 2010. v. 1, p. 275-337.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

DE CASTRO, H.F.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F.; PEREIRA, P.S. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Cap. 6, p. 123-147.

DORS, G.; FREITAS, L.; MENDES, A. A.; FURIGO JR, A.; DE CASTRO. Transesterification of palm oil catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* lipase in a packed-bed reactor. **Energy Fuels**, v. 26, p. 5977-5982, 2012.

DUPONT, J.; SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, M. R.; MENEGHETTI, S. M. P. Catalytic production of biodiesel and diesel-like hydrocarbons from triglycerides. **Energy & Environmental Science**, v. 2, p. 1258-1265, 2009.

EŞ, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2065-2082, 2015.

FAN, L.; DU, Y.; ZHANG, B.; YANG, J.; ZHOU, J.; KENNEDY, J. F. Preparation and properties of alginate/carboxymethyl chitosan blend fibers. **Carbohydrate Polymers**, v.65, p. 447–452, 2006.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Small-scale palm oil processing in Africa**. FAO agricultural services bulletin 148, 2002.

FARAJI, H.; HUSAIN, S. W.; HELALIZADEH, M.  $\beta$ -Cyclodextrin-bonded silica particles as novel sorbent for stir bar sorptive extraction of phenolic compounds. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, p. 482-487, 2011.

FICANHA, A. M. M.; NYARI, N. L. D.; LEVANDOSKI, K.; MIGNONI, M. L.; DALLAGO, R. Estudo da imobilização de lipase em sílica obtida pela técnica sol-gel. **Química nova**, v. 38, n. 3, p. 364-369, 2015.

FIDALGO, W. R. R. **Produção enzimática de biodiesel em reator de leito fluidizado a partir da etanólise do óleo de babaçu**: estabelecimento das condições reacionais e operacionais. 158p. Dissertação (Doutorado) – Escola de Engenharia de Lorena: Universidade de São Paulo. Lorena, 2014.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K.V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 1298–1315, 2009.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya* sp). **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1068-1074, 2009.

FREITAS, L.; PAULA, A. V.; SANTOS, J. C.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO<sub>2</sub>-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 78-90, 2010.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils- Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI, Y. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 335-363, 2004.

GEORGIO, G.; HUBBELL, J. A. **Encyclopedia of chemical processing and design**; New York: Marcel Dekker, 1993. v. 45, p. 142-176.

GLOOR, W. E.; MAHLMAN, B. H.; ULLRICH, R. D. Hydroxyethylcellulose and its uses. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 2150-2153, 1950.

GOMES, F.M.; PEREIRA, E.B.; DE CASTRO, H.F. Immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 2, p. 17-23, 2004.

GUISÁN, J. M. Immobilization of enzymes for use in organic media, In: GUI SAN, J. M. Editor. **Immobilization of Enzymes and Cells**, 449p. Totowa: Humana Press, 2006. ISBN 1-58829-290-8.

HAMA, S.; KONDO, A. Enzymatic biodiesel production: an overview of potential feedstocks and process development. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 386-395, 2013.

HASSAN C. M., PEPPAS N. A.; Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods; **Advances in polymer Science**, 153, p. 37-65, 2000.

INGERSOLL, C.M.; BRIGHT, F.V. Using sol-gel based platforms for chemical sensors. **Chemtech**, v. 27, p. 26-31, 1997.

Instituto Adolfo Lutz – **Laboratório de saúde pública**. Disponível em: <<http://www.ial.sp.gov.br/>> Acesso em: 28 Maio 2015.

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

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. A. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 281-288, 2005.

KAPSABELIS, S.; PRESTIDGE, C. A. Adsorption of ethyl(hydroxyethyl)cellulose onto silica particles: the role of surface chemistry and temperature. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 288, p. 297-305, 2000.

KIM, K.D.; MIKHAYLOVA, M.; ZHANG, Y.; MUHAMMED, M. Protective coating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles, **Chemistry Materials**, v.15; p.1617-1627, 2003.

KIM, K.; SONG, H. K.; SHIN, D. H.; WANG, K. Y.; SUH, S. W. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. **Structure**, v. 5, p. 173-185, 1997.

KNOTHE, G. Structure indices in FA chemistry. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 9, p. 847-854, 2002.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blucher, 2006. 352p.

KOH, M.Y.; MOHD-GHAZI, T.I. A Review of biodiesel production from *Jatropha curcas* oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n.5, p. 2240–2251, 2011.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083-1095, 2010.

MACHADO, G. O.; PAWLICKA, A.; HILLING, E.; SCHIRMER, W. N. Eletrólitos sólidos poliméricos a partir da hidroxietilcelulose. In: SEMANA DE ESTUDOS FLORESTAIS E I SEMINÁRIO DE ATUALIZAÇÃO FLORESTAL, 10., 2009.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL, C. G.; AMUNDSON, C.H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils- A review. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 67, n. 12, p. 890-910, 1990.

MAURITZ, K. **Sol-gel technology**. Chemat Technology, Inc. 1998. Disponível em: <<http://www.solgel.com>> Acesso em: 01 Julho 2015.

MEHER, L. C.; VIDYA-SAGAR, D.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, p. 248-268, 2006.

MENDES, A. A.; FREITAS, L.; CARVALHO, A. K. F.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Immobilization of a commercial lipase from *Penicillium camembertii* (Lipase G) by different strategies. **Enzyme Research**, v. 2011, 2011.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205-220, 2015.

MOREIRA, A. B. R.; PEREZ, V.H.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy and Fuels**, v. 21, p. 3689-3694, 2007.

MOREIRA, A. B. R. **Seleção de fonte de lipase para síntese de biodiesel por transesterificação enzimática do óleo de palma com etanol**. 120p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena: Universidade de São Paulo. Lorena, 2007.

MPOC – MALAYSIAN PALM OIL COUNCIL. Disponível em: <<http://www.mpoc.org.my/>> Acesso em: 28 maio 2015.

NOUREDDINI, H.; GAO, X. Characterization of sol-gel immobilized lipases. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v.41, p. 31-41, 2007.

NYQUIST, R.A.; KAGEL, R.O. **Infrared spectra of inorganic compounds**: (3800-45  $\text{cm}^{-1}$ ). 3<sup>rd</sup> Ed. New York, United States of America: Academic Press, 1997. ISBN 0-12-523447-3.

OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Kinetics of the enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in supercritical  $\text{CO}_2$ . **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39, p. 4450-4454, 2000.

OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and SCCO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 19, p. 141-148, 2001.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 742-756, 2009.

OZMEN, E. Y.; SEZGIN, M.; YILMAZ. Synthesis and characterization of cyclodextrin-based polymers as a support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, p. 109-114, 2009.

PADILHA, G. S.; **Caracterização, purificação e encapsulamento de lipase de *Burkholderia cepacia***, 126 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

PADULA, A. D.; SANTOSA, M. S.; FERREIRA, L.; BORENSTEIN, D. The emergence of the biodiesel industry in Brazil: current figures and future prospects. **Energy Policy**, v.44, p. 395–405, 2012.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de latex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J.C.; DE CASTRO, H.F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane–polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 281-288, 2007.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; BRUNO, L. M.; CASTRO, H. F. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 35-40, 2008.

PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; SILVA, J. L.; DE CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Screening of food grade lipases to be used in esterification and interesterification reactions of industrial interest. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 4, p. 1146-1156, 2010.

PEREIRA, E. B.; DE CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa* A comparative study of the free and the immobilized enzyme on porous chitosan beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, 739-752, 2001.

PEREZ, V. H.; SILVA, G. S.; GOMES, F.M.; DE CASTRO, H. F. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 13-19, 2007.

POLSHETTIWART, V.; LUQUE, R.; FIHRI, A.; ZHU, H.; BOUHRARA M.; BASSET, J. M. Magnetically recoverable nanocatalysts. **Chemical Reviews**, v.111, p. 3036-3075, 2011.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-16, 2011.

ROBLES-MEDINA, A.; GONZALEZ-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDAN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 398-408, 2009.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. **Handbook of pharmaceutical excipients**, 5<sup>th</sup> ed. Pharmaceutical Press: Great Britain, 2006. 918 p.

RUFINO, A. R.; BIAGGIO, F. C.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Screening of lipases for the synthesis of xylitol monoesters by chemoenzymatic esterification and the potential of microwave and ultrasound irradiations to enhance the reaction rate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 5-9, 2010.

SALAMA, A.; ABOU-ZEID, R. E.; EL-SAKHAWY, M.; EL-GENDY, A. Carboxymethyl cellulose/silica hybrids as templates for calcium phosphate biomimetic mineralization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 155-161, 2015.

SALIS, A.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. **Use of lipases for the production of biodiesel**. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial enzymes: structure, function and application**. Valencia: Springer, 2007, cap. 19, p. 317-339.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 1, 2001.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G.M; DE CASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. **Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic**, v. 52-53, p. 49-57, 2008a.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; ROCHA, C. G. F.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. Morphological and mechanical properties of hybrid matrices of polysiloxane-polyvinyl alcohol prepared by sol-gel technique and their potential for immobilizing enzyme. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 354, p. 4823-4286, 2008b.

SAPUTRA, A. H.; QADHAYNA, L.; PITALOKA, A. B. Synthesis and characterization of carboxymethyl cellulose (CMC) from water hyacinth using ethanol-isobutyl alcohol mixture as the solvents. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 5, n. 1, p. 36-40, 2014.

SCHMID, A.; HOLLMAN, F.; PARK, J. B.; BUHLER, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 359-366, 2002.

SCHRAG, J. D.; LI, Y., CYGLER; M., LANG, D.;BURGDORF, T.; HECHT, H. J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T. J.; OLIVER, J. D.; STRICKLAND, L. C.;

DUNAWAY, C. M.; LARSON, S. B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**, v. 5, p. 187–202, 1997.

SEMWAL, S.; ARORA, A.K.; BADONI, R.P.; TULI, D.K. Biodiesel production using heterogeneous catalysts. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2151–2161, 2011.

SHAHID, E. M.; JAMAL, Y. Production of biodiesel: a technical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4732-4745, 2011.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHARMA, Y. C.; SINGH, B. Development of biodiesel: current scenario. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 6-7, p. 1646-1651, 2009.

SHCHIPUNOV, Y.A. Sol-gel derived biomaterials of silica and carrageenans. **Journal of Colloidal and Interfaces Science**, v. 268, p. 68-76, 2003.

SILVA, D. M.; MUSIAL, D. C.; ALTMAYER, C.; VALENTINI, S. A. Obtenção de derivado de celulose a partir do bagaço de cana-de-açúcar com potencial aplicação nas industriais farmacêutica e cosmética. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 41-45, 2011a.

SILVA, G. S.; OLIVEIRA, P. C.; GIORDANI, D. S.; DE CASTRO, H. F. Chitosan/siloxane hybrid polymer: synthesis, characterization and performance as a support for immobilizing enzyme. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1407-1417, 2011b.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: O ônus e o bônus de produzir combustível. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 843-851, 2008.

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

SIMÕES, A. S.; RAMOS, L.; FREITAS, L.; SANTOS, JÚLIO C.; ZANIN, G. M.; De Castro, H.F. Performance of an enzymatic packed bed reactor running on babassu oil to yield fatty ethyl esters (FAEE) in a solvent-free system. **Biofuel Research Journal**, v. 6, p. 242-247, 2015.

SMITHA, S.; SHAJESH, P.; MUKUNDAN, P.; WARRIER, K.G.K. Sol-gel synthesis of biocompatible silica-chitosan hybrids and hydrophobic coatings. **Journal of Materials Research**, v. 23, p. 2053-2060, 2008.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-9, p. 745-757, 1999.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 656-660, 2003.

SOUZA, H. A cadeia produtiva da palma de óleo no Brasil, 2012. Disponível em: < [http://cbmamona.com.br/palestras/17\\_GERGELIM\\_14h45\\_HOMERO.pdf](http://cbmamona.com.br/palestras/17_GERGELIM_14h45_HOMERO.pdf)> Acesso em: 28 Maio 2015.

SOUZA, S. P.; SEABRA, J. E. A. Environmental benefits of the integrated production of ethanol and biodiesel. **Applied Energy**, v. 102, p. 5-12, 2013.

STAMENKOVIC, O. S.; VELICKOVIC, A. V.; VELJKOVIC, B. V. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, p. 3141–3155, 2011.

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, B. M. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, p.768-775, 2009.

SZEJTLI, J. Cyclodextrins: properties and applications. **Drug Invest.**, v. 2, suppl. 4, p. 11-21, 1990.

SZEJTLI, J. Cyclodextrins. In: FRÖMMING, K., SZEJTLI, J. **Cyclodextrins in Pharmacy**. London: Kluwer Academic Publishers, 1994, v. 5, p. 1-18.

TALEBIAN-KIAKALAEH, A.; AMIN, N.A.S.; MAZAHERI, H. A review on novel process of biodiesel production from waste cooking oil. **Applied Energy**, v. 104, p. 683-710, 2013.

TEIXEIRA, N. M. **Aplicação de ultrassom na etanolise do óleo de babaçu mediada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-βCD**. 110p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena: Universidade de São Paulo. Lorena, 2011.

TODOROVA, E. V.; CHERNEV, G. E.; DJAMBAZOV, S. T. Structure and properties of functionalized porous silica hybrid materials. **Open Journal of Inorganic Non-Metallic Materials**, v. 4, p. 35-43, 2014.

TORRELO, G.; HANEFELD, U.; HOLLMANN, F. Biocatalysis. **Catalysis Letters**, v. 145, n. 1, p. 309-345, 2015.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em: < <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>> Acesso em: 28 Maio 2015.

URIOSTE, D.; CASTRO, M. A. B.; BIAGGIO, F. C.; DE CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de métodos para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, v.31, p. 407-412, 2008.

VASUDEVAN, P. T.; BRIGGS, M. Biodiesel production—current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiology Technology**, v. 35, p. 421-430, 2008.

VUJCIC, Z.; MILORADOVIC, Z.; MILOVANOVIC, A.; BOZIC, N. Cell wall invertase immobilization within gelatin gel. **Food chemistry**, v. 126, p. 236-240, 2011.

WANG, T.; TURHAN, M.; GUNASEKARAN, S. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly (vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, v. 53, p. 911-918, 2004.

XIE, K.; YU, Y.; SHI, Y. Synthesis and characterization of cellulose/silica hybrid materials with chemical crosslinking. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 799-805, 2009.

YAHYA, A.R.M.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 438-450, 1998.

YANO, S.; IWATA, K.; KURITA, K. Physical properties and structure of organic-inorganic hybrid materials produced by sol-gel process. **Materials Science and Engineering: C**, v. 6, n. 2-3, p. 75-90, 1998.

ZANIN, G. M.; MORAES, F.F. Enzimas imobilizadas. In SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**, Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004, cap. 4, p. 35-85.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - Propriedades do óleo de palmiste

Algumas propriedades físico-químicas do óleo de palmiste foram determinadas, como: índice de acidez e viscosidade, as demais características foram adotadas tomando por base o laudo técnico fornecido pela Agropalma, conforme apresentados na Tabela A1.

**Tabela A.1.** – Propriedades do óleo de palmiste

Índice de acidez (mg KOH/g)	Índice de peróxido (mEq/ kg)	Índice de iodo (g I <sub>2</sub> /100g)	Índice de saponificação (mgKOH/g)	Viscosidade cinemática (mm <sup>2</sup> /s)
0,09±0,01	1,00	16-21	230-254	32,27

A viscosidade foi determinada adotando metodologia descrita no item 4.4.3.3.

O índice de acidez da matéria-prima foi determinado de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para esta determinação, uma massa conhecida das amostras (cerca de 2,0 g da amostra) foi pesada em frascos Erlenmeyers. Em seguida, foram adicionados 25mL de uma mistura de éter etílico e álcool etílico (95%) preparada na proporção 2:1 em volume. Os ácidos livres foram titulados com solução de hidróxido de potássio (KOH) de concentração 0,01M previamente padronizada, utilizando-se fenolftaleína como indicador. O índice de acidez foi calculado pela relação entre a massa em miligramas de hidróxido de potássio consumidos por grama de amostra analisada, conforme a equação.

$$\text{Índice de acidez} = \frac{(V_{\text{amostra}} - V_{\text{branco}}) \cdot MM_{\text{KOH}} \cdot [\text{KOH}]}{M_{\text{amostra}}}$$

Em que:  $V_{\text{amostra}}$  = Volume de solução de KOH gasto na titulação da amostra (mL),  $V_{\text{branco}}$  = Volume de solução de KOH gasto na titulação do branco (mL),  $MM_{\text{KOH}}$  = Massa Molar do KOH (56,1g/mol),  $[\text{KOH}]$  = Concentração molar da solução de KOH (mol/L),  $M_{\text{amostra}}$  = massa de amostra (g).

O índice de acidez influencia diretamente na síntese de biodiesel por transesterificação, sendo considerada como matéria-prima ideal óleos e gorduras com índice de acidez inferior a 2 mg KOH/g óleo (SUAREZ et al., 2009). Sendo assim, a

matéria-prima lipídica está adequada para síntese de biodiesel.

O índice de Iodo de 16-21 g I<sub>2</sub>/100g do óleo de palmiste também atendeu os requisitos para ser utilizado na fabricação de biocombustíveis. Estudos efetuados por KNOTHE (2002) mostraram que valores superiores a 115g I<sub>2</sub>/100g, indicam menor estabilidade oxidativa dos óleos, que prejudica sua aplicação industrial.

O índice de peróxido de 1,0 mEq/kg também encontra-se dentro da faixa estabelecida pela legislação, no qual o máximo permitido é da ordem de 10 mEq/kg (em reações enzimáticas o valor máximo recomendado é da ordem de 5 mEq/kg) (CARVALHO, 2011).

**APÊNDICE B** – Atividade hidrolítica da lipase *B. cepacia* livre e dos derivados imobilizados em SiO<sub>2</sub>-βCD, SiO<sub>2</sub>-CMC, SiO<sub>2</sub>-HEC e SiO<sub>2</sub>-PVA, utilizando diferentes concentrações de azeite de oliva para determinação dos parâmetros cinéticos.

Porcentagem de azeite na emulsão (%)	Porcentagem de água na emulsão (%)	Concentração em ácidos graxos (mM)
10	90	372
20	80	744
30	70	1116
40	60	1488
50	50	1860

AGL (mM)	Lipase livre (U g <sup>-1</sup> )	Lipase-SiO <sub>2</sub> -βCD (U g <sup>-1</sup> )	Lipase-SiO <sub>2</sub> -CMC (U g <sup>-1</sup> )	Lipase-SiO <sub>2</sub> -HEC (U g <sup>-1</sup> )	Lipase-SiO <sub>2</sub> -PVA (U g <sup>-1</sup> )
372	6289±242	721±37	640±35	650±22	788±15
744	7596 ±97	979±30	867±86	874±38	1077±10
1116	8860±48	1113±11	1161±38	1194±42	1245±15
1488	9483±97	1406±75	1314±55	1332±46	1539±93
1860	10644±187	1637±56	1457±130	1451±133	1661±20

**APÊNDICE C** – Estabilidade térmica da lipase B. cepacia livre e dos derivados imobilizados em SiO<sub>2</sub>-βCD, SiO<sub>2</sub>-CMC, SiO<sub>2</sub>-HEC e SiO<sub>2</sub>-PVA.

Atividade residual da lipase PS livre e dos derivados imobilizados: Lipase-SiO<sub>2</sub>-βCD, Lipase-SiO<sub>2</sub>-CMC, Lipase-SiO<sub>2</sub>-HEC e Lipase-SiO<sub>2</sub>-PVA submetidos a tratamento térmico (50°C), mediada em meio aquoso (tampão fosfato 0,1M, pH 7,0).

Atividade hidrolítica determinada a 37°C, tempo de 5 min.

Lipase PS livre		
Tempo (h)	Atividade hidrolítica (U g <sup>-1</sup> )	% de atividade referente à atividade inicial (t=0)
0	10296,1	100
30	7929,9	77,02
60	6744,9	65,51
120	6647,9	64,57
180	6598,4	64,09

Lipase-SiO <sub>2</sub> -βCD		
Tempo (h)	Atividade hidrolítica (U g <sup>-1</sup> )	% de atividade referente à atividade inicial (t=0)
0	951,14	100
30	947,15	99,58
60	940,49	98,88
120	936,68	98,48
180	931,17	97,90

Lipase-SiO <sub>2</sub> -CMC		
Tempo (h)	Atividade hidrolítica (U g <sup>-1</sup> )	% de atividade referente à atividade inicial (t=0)
0	890,03	100
30	881,66	99,06
60	874,37	98,24
120	865,20	97,21
180	863,95	97,07

Lipase-SiO <sub>2</sub> -HEC		
Tempo (h)	Atividade hidrolítica (U g <sup>-1</sup> )	% de atividade referente à atividade inicial (t=0)
0	968,5	100
30	958,91	99,01
60	955,90	98,70
120	951,16	98,21
180	949,23	98,01

Lipase-SiO <sub>2</sub> -PVA		
Tempo (h)	Atividade hidrolítica (U g <sup>-1</sup> )	% de atividade referente à atividade inicial (t=0)
0	888,25	100
30	884,79	99,61
60	881,86	99,28
120	876,08	98,63
180	873,42	98,33

Tempo (min)	Enzima livre	Lipase-SiO <sub>2</sub> - $\beta$ CD	Lipase-SiO <sub>2</sub> -CMC	Lipase-SiO <sub>2</sub> -HEC	Lipase-SiO <sub>2</sub> -PVA
% de atividade referente à atividade inicial (t=0)					
0	100	100	100	100	100
30	77,02	99,58	99,06	99,01	99,61
60	65,51	98,88	98,24	98,70	99,28
120	64,57	98,48	97,21	98,21	98,63
180	64,09	97,90	97,07	98,01	98,33

**APÊNDICE D** – Dados referentes aos testes de esterificação do butanol com ácido butírico para a produção de butirato de butila utilizando diferentes derivados imobilizados.

Perfil da reação de esterificação do butanol com ácido butírico para a produção de butirato de butila utilizando o derivado imobilizado de Lipase-SiO<sub>2</sub>-βCD

Lipase-SiO <sub>2</sub> -βCD						
Tempo (h)	Concentração de butanol		Concentração de butirato de butila		Concentração de ácido butírico	
	mmol/L	g/L	mmol/L	g/L	mmol/L	g/L
0	100,32	7,42	0	0	139,79	12,30
3	63,51	4,70	24,45	3,52	109,67	9,65
6	61,28	4,53	33,62	4,84	104,08	9,16
15	38,49	2,84	58,04	8,36	69,00	6,07
18	35,11	2,59	71,17	10,25	63,53	5,59
21	30,35	2,25	76,44	11,01	57,96	5,10
24	27,16	2,01	82,32	11,85	53,07	4,67

Perfil da reação de esterificação do butanol com ácido butírico para a produção de butirato de butila utilizando o derivado imobilizado de Lipase-SiO<sub>2</sub>-CMC

Lipase-SiO <sub>2</sub> -CMC						
Tempo (h)	Concentração de butanol		Concentração de butirato de butila		Concentração de ácido butírico	
	mmol/L	g/L	mmol/L	g/L	mmol/L	g/L
0	100,58	7,44	0	0	139,20	12,25
3	88,40	6,54	5,81	0,84	131,94	11,61
6	79,66	5,89	11,35	1,63	124,14	10,92
15	60,12	4,45	29,75	4,28	101,26	8,91
18	54,83	4,06	38,40	5,53	90,74	7,99
21	47,83	3,54	50,37	7,25	77,63	6,86
24	37,12	2,75	68,43	9,85	59,29	5,22

Perfil da reação de esterificação do butanol com ácido butírico para a produção de butirato de butila utilizando o derivado imobilizado em Lipase-SiO<sub>2</sub>-HEC

Lipase-SiO <sub>2</sub> -HEC						
Tempo (h)	Concentração de butanol		Concentração de butirato de butila		Concentração de ácido butírico	
	mmol/L	g/L	mmol/L	g/L	mmol/L	g/L
0	100,10	7,41	0	0	139,14	12,24
3	92,34	6,83	5,12	0,74	133,65	11,76
6	80,52	5,96	12,57	1,81	125,11	11,01
15	49,26	3,64	44,08	6,35	96,74	8,51
18	43,60	3,23	55,13	7,94	82,67	7,27
21	37,38	2,77	66,90	9,63	67,45	5,94
24	28,48	2,11	80,01	11,52	54,92	4,83

Perfil da reação de esterificação do butanol com ácido butírico para a produção de butirato de butila utilizando o derivado imobilizado de Lipase-SiO<sub>2</sub>-PVA

Lipase-SiO <sub>2</sub> -PVA						
Tempo (h)	Concentração de butanol		Concentração de butirato de butila		Concentração de ácido butírico	
	mmol/L	g/L	mmol/L	g/L	mmol/L	g/L
0	100,40	7,43	0	0	139,58	12,21
3	46,49	3,44	49,58	7,14	89,59	11,63
6	39,46	2,92	59,10	8,51	77,06	11,02
15	33,38	2,47	73,40	10,57	61,85	9,22
18	30,81	2,28	76,67	11,04	58,13	8,89
21	28,51	2,11	80,00	11,52	54,95	8,40
24	25,81	1,91	84,65	12,19	51,14	7,83

**APÊNDICE E** – Dados referentes aos testes de etanolise do óleo de palmiste, na razão molar de 1:8, empregando diferentes tipos de derivado imobilizado, 600 unidades de atividade/ g de óleo, sob agitação magnética a 45°C.

Massa de enzima=5,57 g

Ésteres	Lipase-SiO <sub>2</sub> -βCD		
	Concentração de ésteres etílicos (% m/m)		
	24h	48h	72h
Octanoato de etila (C8:0)	3,28	3,46	3,35
Decanoato de etila (C10:0)	2,76	3,27	3,19
Laurato de etila (C12:0)	27,80	32,41	35,69
Miristato de etila (C14:0)	8,49	9,18	9,68
Palmitato de etila (C16:0)	6,30	6,10	6,30
Estearato de etila (C18:0)	1,40	1,63	1,56
Oleato de etila (C18:1)	6,65	8,51	9,01
Linoleato de etila (C18:2)	2,92	3,01	4,78
Total	59,61	68,58	73,56
Rendimento (%)	79,73	92,43	99,13

Massa de enzima= 6,1g

Ésteres	Lipase-SiO <sub>2</sub> -CMC		
	Concentração de ésteres etílicos (% m/m)		
	24h	48h	72h
Octanoato de etila (C8:0)	3,36	3,43	3,55
Decanoato de etila (C10:0)	3,18	3,49	3,49
Laurato de etila (C12:0)	33,62	34,29	35,29
Miristato de etila (C14:0)	9,63	9,79	9,81
Palmitato de etila (C16:0)	6,38	6,48	6,78
Estearato de etila (C18:0)	1,54	1,59	1,61
Oleato de etila (C18:1)	8,61	9,09	9,13
Linoleato de etila (C18:2)	4,16	4,78	4,81
Total	71,29	73,44	73,87
Rendimento (%)	96,08	98,97	99,56

Massa de enzima = 6,0 g

Lipase-SiO <sub>2</sub> -HEC			
Ésteres	Concentração de ésteres etílicos (% m/m)		
	24h	48h	72h
Octanoato de etila (C8:0)	3,21	3,25	3,26
Decanoato de etila (C10:0)	3,49	3,40	3,40
Laurato de etila (C12:0)	32,55	35,69	35,70
Miristato de etila (C14:0)	9,79	10,31	10,32
Palmitato de etila (C16:0)	6,75	6,77	6,77
Estearato de etila (C18:0)	1,50	1,65	1,66
Oleato de etila (C18:1)	6,71	7,06	7,09
Linoleato de etila (C18:2)	3,94	4,25	4,27
Total	67,95	73,40	73,80
Rendimento (%)	91,58	98,92	99,46

Massa de enzima= 5,56 g

Lipase-SiO <sub>2</sub> -PVA			
Ácidos graxos	Concentração de ésteres etílicos (% m/m)		
	24h	48h	72h
Octanoato de etila (C8:0)	2,54	3,09	3,54
Decanoato de etila (C10:0)	2,93	3,29	3,45
Laurato de etila (C12:0)	29,00	33,56	35,86
Miristato de etila (C14:0)	8,40	9,13	9,62
Palmitato de etila (C16:0)	5,86	6,16	6,28
Estearato de etila (C18:0)	1,19	1,35	1,51
Oleato de etila (C18:1)	7,13	8,08	8,29
Linoleato de etila (C18:2)	4,04	4,12	4,32
Total	61,19	69,95	73,90
Rendimento (%)	82,47	94,27	99,60

**APÊNDICE F** – Viscosidade do biodiesel catalisado pelos derivados imobilizados Lipase-SiO<sub>2</sub>-βCD, Lipase-SiO<sub>2</sub>-CMC, Lipase-SiO<sub>2</sub>-HEC e Lipase-SiO<sub>2</sub>-PVA, utilizando óleo de palmiste e etanol, na razão molar de 1:8, sob agitação magnética a 45°C.

<b>Biocatalisador utilizado</b>	<b>Viscosidade dinâmica (cP)</b>	<b>Densidade (kg m<sup>-3</sup>)</b>	<b>Viscosidade cinemática (mm<sup>2</sup>/s)</b>
Lipase-SiO <sub>2</sub> -βCD	3,49	870	4,01
Lipase-SiO <sub>2</sub> -CMC	3,49	870	4,01
Lipase-SiO <sub>2</sub> -HEC	3,41	869	3,92
Lipase-SiO <sub>2</sub> -PVA	3,34	870	3,84